

## CLONAGEM, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA PLDR DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* COMO MARCADOR DE INFECÇÃO DE OVINOS E CAPRINOS

Patrícia Rodrigues de Melo<sup>1</sup>; Grácia Maria Soares Rosinha<sup>2</sup>; Lenita Ramires Santos<sup>2</sup>; Flávio Ribeiro Araújo<sup>2</sup>; Cleber Oliveira Soares<sup>2</sup>; Odinéia Forner<sup>3</sup>; Carina Elisei<sup>4</sup>; Stenio Fragoso<sup>5</sup>; Doroty Mesquita Dourado<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Curso de Ciências Biológicas, Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande/MS. patty Melo89@gmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná. Rua XV de Novembro, 1299 | CEP 80.060-000 | Centro | Curitiba | PR | Brasil | Fone: (41) 3360-5000

<sup>4</sup>Bióloga, bolsista DTI/CNPq.

<sup>5</sup>Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-Paraná/PR

### RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa crônica, de ocorrência cosmopolita, sendo caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais, internos e nas vísceras. Macroscopicamente os animais apresentam linfonodos com volumes aumentados, onde uma espessa camada de tecido conectivo envolve o material purulento pastoso ou seco, com uma coloração amarelo esverdeado. A LC é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete principalmente caprinos e ovinos. Esta patogenia causa debilitação progressiva do animal, promovendo o emagrecimento, comprometimento da pele e lã, diminuição na produção de leite e condenação da carne, resultando em uma grande perda econômica. A alta virulência desta bactéria e sua persistência no organismo do animal, deve-se principalmente à ação da exotoxina fosfolipase D (PLD), que é uma proteína codificada a partir do gene pld. Atualmente estão disponíveis no mercado testes para diagnósticos baseados em testes sorológicos, mas que ainda apresentam pouca eficiência. Devido ao crescimento da ovinocapricultura no Brasil e diante da importância da LC, busca-se cada vez mais o desenvolvimento de testes de diagnósticos mais precisos, rápidos, com praticidade e baixo custo para utilização a campo que possam favorecer o produtor. Este trabalho teve como objetivos a clonagem do gene pld pela plataforma Gateway (Invitrogen®), expressar o gene e avaliar o potencial uso da PLDr como marcador de infecção por *C. pseudotuberculosis* por meio de testes sorológicos. Como resultados, a proteína PLDr foi obtida com 31KDa, onde na purificação não foram observados

contaminantes. Por meio do teste sorológico *Western blotting* foi possível identificar animais infectados por *C. pseudotuberculosis*. Portanto a proteína PLDr mostra-se antigênica frente aos soros de animais naturalmente infectados e pode ser sugerida como um bom marcador para testes diagnósticos para a linfadenite caseosa.

**Palavras-chave:** Linfadenite caseosa; diagnóstico; fosfolipase D (PLD).

### ABSTRACT

The caseous lymphadenitis (CLA) is a chronic infectious disease of cosmopolitan distribution, characterized by the formation of abscesses in the both superficial and internal lymph nodes and viscera. Macroscopically, the infected animal has grossly enlarged lymph nodes, with a thick layer of connective tissue surrounding the pasty or dry pus, presenting a yellow-green color. The CLA is caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* and affects mainly goats and sheep. This pathogen may cause serious damage to the sheep and goat economy because it causes a progressive weakening of the animal, promoting weight loss, compromised skin and wool, decreased milk production and condemnation of the flesh, and consequently a large economic loss in production. The high virulence and persistence of the bacterium in the body of the animal is mainly due to the action of the phospholipase D exotoxin (PLD), which is a protein encoded by the *pld* gene. Actually, there are diagnostic tests available on the market, based on serological tests, but they are still inefficient. Due the increase in Brazil of the goats and sheeps culture and important problem of caseous linphadenitis, search more and more the development of the accurate, faster, practical and cheaper test for field utilization that favors the the farmers. The objectives of this study were, the *pld* gene cloning, through the Gateway platform (Invitrogen®), express the gene and evaluate the potential use of PLDr as a marker of infection with *C. pseudotuberculosis* by serological tests. The results of this work, the PLDr was obtained with 31KDa without contaminants and infected animals were indentified with *C. pseudotuberculosis* through *western blotting*. So, the PLDr protein is antigenic to the sera of the naturally infected animals and can be suggests like a good marker to diagnostics tests to caseous linphadenits disease.

**Keywords:** caseous lymphadenitis; diagnostic; phospholipase D (PLD).

## INTRODUÇÃO

O agronegócio de caprinos e ovinos no Brasil está criando novas possibilidades comerciais e industriais, colaborando com desenvolvimento do País. A produção de caprinos e ovinos tem sido afetada pela utilização de manejos inadequados e pela ocorrência de doenças, como a linfadenite caseosa (LC) (ALVES *et. al*, 2007) que é uma doença infectocontagiosa, cujo agente etiológico é bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Trata-se de uma zoonose, pois o homem quando em contato com *C. pseudotuberculosis*, pode se infectar.

Em ovinos e caprinos *C. pseudotuberculosis* causa a formação de abscessos nos linfonodos superficiais, gânglios internos e vísceras (BINNS *et. al*, 2007). A principal causa de contaminação no rebanho dá-se pelo fato de haverem animais infectados e com a ruptura dos abscessos o patógeno é liberado, através de feridas com material purulento na pele do animal. Um dos fatores que caracteriza essa bactéria é a capacidade de sobreviver no ambiente por muito tempo (KABA *et. al*, 2001) . A prevalência e a incidência da LC em rebanhos caprinos e ovinos estão relacionadas às condições inadequadas do ambiente, e à diminuição das defesas orgânicas dos animais, e a falta de um programa sanitário integrado de prevenção e controle. (ALVES *et. al*, 2007)

Esta doença está presente nos rebanhos do mundo todo, causando sérias complicações para os criadores. O impacto na economia resulta em perdas no setor leiteiro, condenação e desperdício de carcaças, devido aos abscessos internos, e a desvalorização da pele e da lã, devido aos abscessos externos. A *C. pseudotuberculosis* tem sido identificada em países que apresentam grande rebanho de caprinos e ovinos, como Austrália, Argentina, África do Sul, Estados Unidos e Nova Zelândia. No Brasil já foi identificada a ocorrência da doença em alguns Estados, como por exemplo, Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul e nos Estados do Nordeste, nos quais existe uma alta prevalência da doença, onde os prejuízos provocados pela linfadenite são muito grandes, uma vez que muitos dos pequenos criadores têm a ovinocaprinocultura como sua principal atividade econômica (COSTA, 2002).

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da LC, foi descrita pela primeira vez por Nocard em 1888, a partir de um caso de linfangite bovina, caracterizando-se como bacilo gram-positivo, podendo apresentar-se na forma cocóide, isolado ou formando agrupamentos irregulares; são imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não esporulam (SANTOS *et. al*, 2009) . Uma importante característica é a camada densa, externa à parede celular, que demonstrou ser composta por lipídeos. Baseado no conteúdo lipídico da parede celular, as bactérias do gênero *Corynebacterium*, são agrupadas com bactérias do gênero *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (ALVES *et. al*, 2007).

A disseminação do agente infeccioso deve-se à ruptura dos abscessos externos, cujo material caseoso e purulento é liberado no ambiente onde estão concentrados os animais. Esta bactéria é capaz de sobreviver no meio ambiente por um período de 4-8 meses, e morre quando exposta a 70°C (SILVA, 2003).

A medida terapêutica mais utilizada é incisão cirúrgica dos abscessos periféricos antes que se rompam espontaneamente. Geralmente o tratamento com antibióticos não é recomendável economicamente, pois esta terapia pode demorar semanas ou até meses, além do mais, os antibióticos não penetram na cápsula dos abscessos (ALVES *et. al*, 2007).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é capaz de produzir uma potente exotoxina, descrita primeiramente por Carne (1940). A fosfolipase D (PLD) é encontrada no citoplasma e, em menor quantidade, na parede celular bacteriana. Seu peso molecular varia de 14.500 a 31.000 Daltons. A PLD catalisa a dissociação de esfingomiélna, fosfato e colina e hidrolisam glicerofosfolípídeos. O desenvolvimento da LC, está relacionado ao alto fator de virulência, enquanto a prevalência da *C. pseudotuberculosis* na célula do animal infectado, se dá pela proteína PLD. Esta teoria é apoiada por evidências experimentais, em que o gene *pld* foi excluído do cromossomo ou inativado por mutação, quando foi verificado que, com essas mudanças a bactéria tornou-se incapaz de causar abscessos nos linfonodos dos animais, característica principal da linfadenite caseosa (BAIRD *et. al.*, 2007).

O diagnóstico da LC é baseado principalmente nos sinais clínicos; nas carcaças é realizado exame pós-morte para a verificação de abscessos internos em órgãos como fígado e pulmão (SILVA, 2003).

Os principais antígenos de superfície foram identificados por meio de vários testes sorológicos dentre eles, teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e *Western blotting*. A técnica de ELISA indireto é utilizada para detecção de *C. pseudotuberculosis*, a qual é baseada na proteína fosfolipase D recombinante, expressa em *Escherichia coli* (MENZIES *et. al*, 2004).

Por meio deste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial de uso da PLDr, como marcador sorológico de infecção por *C. pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1- AMPLIFICAÇÃO DO GENE PLD

O gene *pld* foi amplificado por meio da Reação em cadeia da polimerase (PCR), com um volume final de 50 µL, contendo: 5 µL de tampão (1X), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 2 µL de primer gateway forward (20pmol), 2 µL de primer gateway reverse (20pmol); 1 µL de dNTP (10mM); 37 µL de água ultrapura; 0,5 U/µL de Taq DNA

polimerase; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*. A amplificação ocorreu em termociclador, onde a temperatura inicial foi de 95°C, a desnaturação da dupla fita à 95°C por 4 minutos, logo após, o anelamento dos primers à 55°C por 1 minuto, extensão da fita de DNA à 72°C por 2 minutos. Os ciclos foram repetidos 35 vezes, com extensão à 72°C por 7 minutos finalizado à 4°C.

## 2- PURIFICAÇÃO DA PCR

A PCR foi purificada com Polietileno Glicol (PEG), onde foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  da reação de PCR e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão EDTA 0,1mM (TE) com PEG à 30% pH 8.0. Este foi submetido ao vórtex vigorosamente, centrifugado à 13000 rpm por 10 minutos, e descartado o sobrenadante. O *pellet* este foi seco no termoblock à 65°C e após foi ressuspendido em 10  $\mu\text{L}$  de TE.

### 3- Clonagem do gene

A clonagem do gene *pld* foi obtida pelo método de clonagem por recombinação sítio-específico da plataforma do sistema gateway (Invitrogen®).

## 3.1 RECOMBINAÇÃO BP (SITO ENTRE ATTB E ATTP NO VETOR DE ENTRADA pDONR)

O gene *pld* foi inserido no vetor pDONR por meio da reação de recombinação BP; para isto utilizou-se 7  $\mu\text{L}$  da PCR, 1  $\mu\text{L}$  do plasmídeo pDONR, 10  $\mu\text{L}$  de T.E, e 2  $\mu\text{L}$  da enzima B.P Clonase II, obtendo-se um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . A reação ficou em termoblock por ~15 horas à 25°C, e foi parada com 1  $\mu\text{L}$  de proteinase K por 10 minutos à 37°C. Logo após foi feita uma transformação por choque térmico da reação de recombinação BP em células de *E.coli* linhagem DH5 $\alpha$ ; o produto da transformação foi selecionado em meio Luria-Bertani (LB) Agar com Zeomicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e feita uma miniprep de Kit (mini preparo de plasmídeo) de acordo com o protocolo da Promega.

## 3.2 RECOMBINAÇÃO LR (SÍTIOS ENTRE ATTL E ATTR NO VETOR DE EXPRESSÃO pDEST)

Após realizada a reação BP, foi feita a reação de recombinação L.R, onde utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  da miniprep do pDONR e o gene *pld*, 2  $\mu\text{L}$  do plasmídeo pDEST, 1  $\mu\text{L}$  da enzima L.R Clonase, e 6  $\mu\text{L}$  de T.E, obtendo-se um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . A reação ficou em termoblock por ~15 horas à 25°C, e foi parada com 1  $\mu\text{L}$  de proteinase K por 10 minutos à 37°C. Sucessivamente houve a transformação da reação de recombinação L.R, por choque térmico em células de *E. coli* linhagem

BL21, e feita uma miniprep de acordo com o protocolo da Promega. O produto da transformação foi selecionado em meio Luria-Bertani (LB) Agar com 100mg/ml de ampicilina. A certificação da clonagem foi confirmada por PCR de colônia.

#### 4- EXPRESSÃO DO GENE PLD

A expressão do gene *pld* foi realizada após cultivo de uma colônia transformada em caldo LB ampicilina. Esta cultura foi submetida a agitação à 37°C até atingir a densidade óptica de 0,8, onde foi adicionado 1 mM de isopropil-tio- $\beta$ -galactosídeo (IPTG) para indução da expressão, com duração de aproximadamente 18 horas à 29°C. A expressão do gene foi verificada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida à 15% (SDS-PAGE), corado com azul brilhante de Coomassie.

#### 5- SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA PLD

Para a solubilização da proteína foi utilizado o protocolo de lise com guanidina, onde para 100 mL e adicionado 57,3g de guanidina, 0,76g de Fosfato de Sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2,9g de cloreto de sódio (NaCl), e quantidade suficiente de água para 100 mL. O pH foi ajustado para 7,8 e a amostra ficou incubada por 1 hora à 37°C.

#### 6- PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

A proteína produzida fusionada à cauda de histidina foi purificada por cromatografia de afinidade em resina níquel (ProBond Purification System, Invitrogen®) e a certificação da purificação foi realizada com eletroforese em gel de poliácridamida 15% (SDS-PAGE).

#### 7- WESTERN BLOTTING

##### 7.1 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO

Para comprovar a presença da proteína o clone foi submetido a *Western blotting*, onde inicialmente foi feito um gel (SDS-PAGE), e após as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-histidina (*Sigma*®) que reconhece uma porção de seis histidinas fusionadas à PLD, diluído a 1:4000, incubado sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora, após esse período, foi realizado 5



lavagens com PBST (tampão fosfato salino + tween 20), após foi diluído a 1:3000 o anticorpo anti-mouse peroxidase (*Sigma*®), incubado conforme citado acima, e utilizado DAB- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Sigma*®) como revelador.

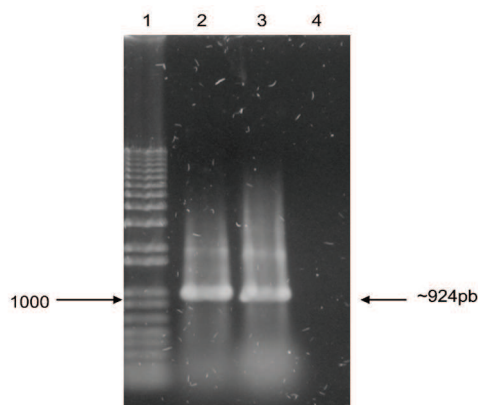
## 7.2 WESTERN BLOTTING COM SOROS DE CAPRINOS E OVINOS

Após a confirmação da expressão da proteína foram realizados *Western blotting* com soros de 40 animais com suspeita de linfadenite caseosa. Como anticorpo primário foram utilizados os soros dos animais, com uma diluição de 1:1000 incubado sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora, após esse período foi lavado procedeu-se 5 vezes com PBST (tampão fosfato salino + tween 20), após foi feita uma diluição de 1:10000 do anticorpo anti-goat peroxidase (*Sigma*®), incubado conforme citado acima, e utilizado DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como revelador.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1- AMPLIFICAÇÃO DO GENE *PLD*

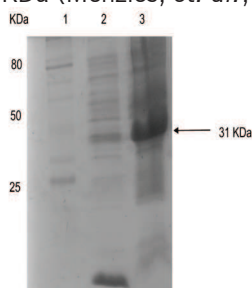
O fragmento que corresponde a região codificante do gene *pld*, amplificado por meio da PCR a partir do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*, apresentou aproximadamente 924 pares de bases (Figura 1).



**Figura 1:** Gel de agarose 0,8% mostrando o produto amplificado pela PCR, e corado com *sybr gold*. A canaleta 1 corresponde ao Marcador Molecular 1 kb DNA Plus (Invitrogen), na canaleta 2 e 3 o produto amplificado, e na canaleta 4 está o controle negativo da PCR, onde não foi adicionado DNA.

## 2- EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PLD

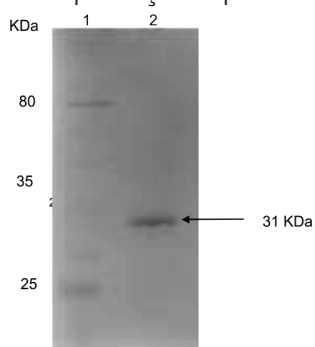
A expressão foi analisada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), e corado com azul de comassie e descorados, revelando uma banda de proteína de aproximadamente 31 kDa que correspondente ao peso molecular esperado para a proteína PLD (Figura 2). Estudos realizados com PLD, apresentaram esta proteína com 31,4 kDa (HODGSON, *et. al.*, 1990) 31,5 kDa (SONGER, *et al.*, 1990) e 35 kDa (Menzies, *et. al.*, 2004).



**Figura 2:** Foto doGel de poliacrilamida à 15%(SDS-PAGE), corado com azul de Comassie. Na canaleta 1 observa-se o marcador molecular (*Broad Range Protein Molecular*), *Promega*. Na canaleta 2 observa-se o perfil das proteínas de *E. coli*, antes da adição de isopropil-tio- $\beta$ -galactosídeo (IPTG), e na canaleta 3 observa-se a produção da proteína PLD após ~18 horas de indução com IPTG.

## 3- PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PLD

A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel (*ProBond Purification System*, *Invitrogen*). Não foram observados apresentou contaminantes, apenas a banda de 31kDa, sem a presença das proteínas de *E. coli*.

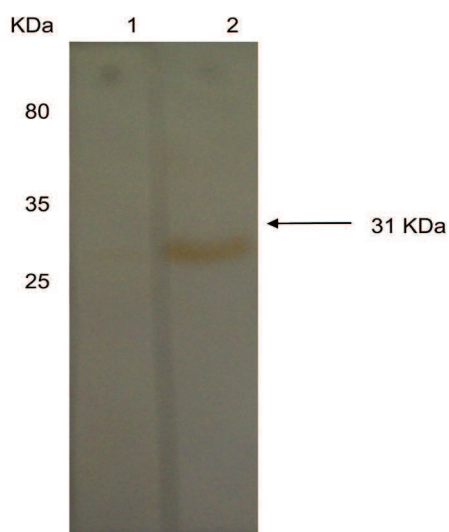


**Figura3:** Proteína submetida à purificação por cromatografia de afinidade em resina níquel (*ProBond Purification System*, *Invitrogen*), e certificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%(SDS-PAGE). Na canaleta 1 está o padrão de peso molecular em kDa (*Broad Range Protein Molecular*,*Promega*) e na canaleta 2 observa-se a proteína purificada com 31 kDa.



#### 4- WESTERN BLOTTING

Após concluído o protocolo de produção e purificação da proteína, a mesma foi analisada quanto a sua reatividade por meio da técnica de *Western Blotting*. O anticorpo monoclonal anti-histidina, usado como anticorpo primário reconheceu a proteína presente na membrana de nitrocelulose (Figura 4).



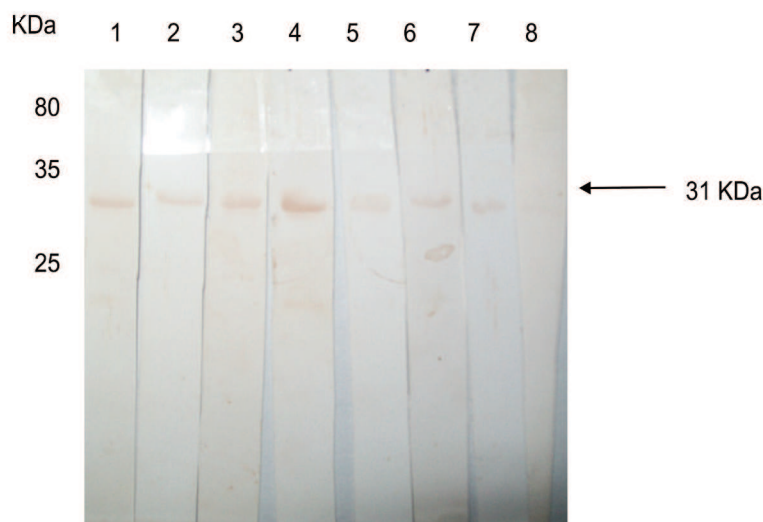
**Figura 4:** Foto mostrando proteína *PLD* por meio de *Western Blotting*. Foi utilizado primeiramente o anticorpo monoclonal anti-histidina que reconhece uma porção de seis histidinas fusionadas à *PLD*, e após foi utilizado o anticorpo anti-mouse peroxidase, e revelado com DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os números ao lado esquerdo da figura correspondem ao padrão de massa molecular de proteína (*Broad Range Protein Molecular, Promega*). Na canaleta 1 observa-se a amostra não induzida com IPTG, na canaleta 2 está o sedimento onde pode ser observada confirmação da expressão da proteína *PLD*.

#### 5- WESTERN BLOTTING COM SOROS DE CAPRINOS E OVINOS

Realizou-se como teste sorológico, *Western blotting* com soros de 40 animais com suspeita de infecção a campo com a bactéria *C. pseudotuberculosis*, dentre caprinos e ovinos. Como anticorpo primário foi utilizado soros de animais naturalmente infectados, o qual reconheceu a proteína *PLD*, e como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo monoclonal *anti-goat*. Dos 40 animais com suspeita da doença *LC*, todos apresentaram-se positivos, como controle negativo utilizou-se soro de animal negativo para a doença *LC*.

Este teste apresentou-se confiável na detecção de animais naturalmente infectados, como podemos observar na figura 5, os soros submetidos a análise reconheceram a porção onde se localiza a proteína *PLD*.

Ellis *et al.* (1991) citado por Alves *et. al.*, (2004), analisaram pelo método de *Western blotting*, soros de animais que foram infectados naturalmente, o qual verificou-se a presença de proteínas entre 12 KDa e 112 KDa reconhecidos pelo soros dos animais. Mas não realizaram os testes especificamente para a proteína *PLD*, o qual foi objeto de estudo do presente trabalho.



**Figura 5:** Foto do *Western blotting* onde pode ser verificado antigenicidade da proteína *PLD* de *C. pseudotuberculosis*. Os números ao lado esquerdo da figura correspondem ao padrão de massa molecular de proteína (*Broad Range Protein Molecular, Promega*). Nas canaletas 1 a 7 observa-se o reconhecimento da proteína *PLD* pelos soros dos animais naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis*. Na canaleta 8 observa-se o controle negativo, onde utilizou-se soro de animal negativo para LC.

Segundo Menzies (2004), experimentou o teste sorológico de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), e concluiu ser um teste confiável na detecção de animais não infectados, e relatou ser um teste pobre em identificar animais infectados experimentalmente.

## CONCLUSÃO

A proteína PLDr mostra-se antigênica frente aos soros de animais naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis*, apresentando-se como um potencial marcador sorológico de infecção por *C. pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos.

## AGRADECIMENTOS

À Dr<sup>a</sup> Grácia Maria Soares Rosinha, pela orientação, à EMBRAPA Gado de corte, pelo espaço e pela oportunidade de estágio, ao CNPq pela bolsa concebida, a Uniderp-Anhaguera pela formação acadêmica, aos colegas de laboratório de Biologia Molecular e às demais pessoas que contribuíram para o trabalho realizado.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, F, S, F.; SANTIAGO, L, B.; PINHEIRO, R, R.; **Linfadenite Caseosa:O Estado da Arte**. Doc 74, EMBRAPA caprinos, 2007, Ceará.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, Amsterdam, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.
- BINNS S.H.; GREEN L. E.; BAILEY M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera . **Veterinary Microbiology**. 123 (1-3): 169-179, 2007.
- COSTA, L. F. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos** . 2002 . Disponível em: < [http://www.cienciasmedicasbiologicas.ufba.br/Pdf\\_1/pdf\\_13.pdf](http://www.cienciasmedicasbiologicas.ufba.br/Pdf_1/pdf_13.pdf)> . Acesso em: 13 abr. 2010.
- ELLIS J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K.W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 28, n. 3/4, p. 289-301, Jul. 1991a.
- HODGSON, A. L. M.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J. ; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. Efficacy of na ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Vaccine**. v.17, p. 802-808, 1999.

KABA J.; KUTSCHKE L.; GERLACH G. Development of an ELISA for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Veterinary Microbiology**. 78 (2): 155-163, 2001.

LANGENEGER, C. H.; LANGENEGER, J.; SHERER, P. **Diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21., 1991, Salvador. Anais... Salvador: 1991.

MENZIES P. I.; HWANG Y-T.; PRESCOTT J. F. **Comparison of an interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats**. *Veterinary Microbiology*. 100(1-2):129-137, 2004.

SANTOS, A. S.; **Caracterização bioquímica e produção da fosfolipase D pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolados de caprinos e ovinos no Estado de Pernambuco**. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0083-1.pdf>> . Acesso em:14 abr. 2010.

SILVA, A. L.; **Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos**. In: Relatório de estágio Multidisciplinar Supervisionado, curso de medicina veterinária, 2003, São Paulo.

SONGER, J. G. et al. **Cloning and expression of the phospholipase D gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli***. *Infect. Immun.*, v. 58, n. 1, p. 131-136, 1990.