

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Expressão e purificação da proteína recombinante rCP0126a de
Corynebacterium pseudotuberculosis e sua utilização em um ELISA
indireto**

Henrique Ramos Angelo

Pelotas, 2014

Henrique Ramos Angelo

**Expressão e purificação da proteína recombinante rCP0126a de
Corynebacterium pseudotuberculosis e sua utilização em um ELISA
indireto**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Bacharelado em Biotecnologia
da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador de estágio: Prof. Dra. Sibeles Borsuk

Orientador acadêmico: Prof. Dra. Sibeles Borsuk

Pelotas, 2014.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111e Angelo, Henrique Ramos

Expressão e purificação da proteína recombinante rcp0126a e sua utilização em um elisa indireto / Henrique Ramos Angelo ; Sibeles Borsuk, orientador. — Pelotas, 2014.
29 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Linfadenite caseosa. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 3. Diagnóstico. 4. Cp1002_0126a. I. Borsuk, Sibeles, orient. II. Título.

CDD : 660.6

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Henrique Ramos Angelo

**Expressão e purificação da proteína recombinante rCP0126a de
Corynebacterium pseudotuberculosis e sua utilização em um ELISA
indireto**

Banca examinadora:

Dra. Sibeles Borsuk, Universidade Federal de Pelotas (Orientadora Acadêmica)

Profa. Dra. Daiane Hartwig, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Francisco Silvestre Bezerra Brilhante, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Karen Silva Leal, Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente e principalmente aos meu pais, Pedro e Ida Maria, por todo o suporte e apoio que me deram durante o curso, e todos esses anos até hoje.

A minha orientadora acadêmica, Prof. Dra. Sibeles Borsuk, pela ampla dedicação e orientação, e principalmente pelos conhecimentos passados.

Aos meus colegas de LPDI, por todos os momentos que estivemos juntos conversando, trabalhando ou nos divertindo falando besteiras, mas principalmente a Andrea que foi quem mais esteve o meu lado durante todo este tempo.

Aos professores da biotecnologia por todo ensinamento que nos passaram, e por sempre estarem a disposição para tirar dúvidas e nos auxiliar em trabalhos.

Aos colegas da biotecnologia por todos momentos em que estivemos juntos.

Aos demais colegas e funcionários do Núcleo de Biotecnologia, pelo bom convívio e aprendizado.

Ao CNPq e FAPERGS pela concessão de bolsas de Iniciação Científica.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

- Albert Einstein

Resumo

ANGELO, Henrique Ramos. **Expressão e purificação da proteína recombinante rCP0126a de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua utilização em um ELISA indireto.** 2014. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

A Linfadenite caseosa (LC) é uma doença causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria intracelular facultativa e gram-positiva. A doença acomete principalmente caprinos e ovinos possuindo duas formas. A forma visceral que é quando a bactéria se aloja nas vísceras do animal, e a forma superficial que causa a formação de abscessos onde se localizam os linfonodos, devido a isso o animal acaba perdendo peso por não conseguir se alimentar ou locomover. Por ser uma doença que não possui uma vacina 100% eficaz e por sua detecção ser difícil quando está em seu estágio inicial, se faz necessário o desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido e eficaz para detectar a doença em seu estágio inicial e evitar uma maior contaminação do rebanho. A proteína CP0126a foi considerada através de técnicas de bioinformática um potencial alvo imunogênico. Assim, o objetivo deste trabalho foi de clonar, expressar a proteína CP0126a e utilizá-la como antígeno em um ELISA indireto. Para isso, o gene *cp1002_0126a* foi amplificado por PCR e clonado nos sítios *KpnI* e *HindIII* do vetor de expressão pAE, a proteína foi expressa na cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star na forma insolúvel, após a solubilização e diálise ela foi utilizada em um ELISA indireto com 46 soros de ovinos, que também foram analisados por um ELISA utilizando proteínas secretadas em cultivo de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados obtidos através do ELISA foram analisados pelo método estatístico que utiliza a curva ROC. O ELISA utilizando a proteína recombinante rCP0126a, teve uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 45,8%, quando um ponto de corte de $DO_{450nm} = 0,078$. A sensibilidade do teste foi alta, no entanto a especificidade foi baixa, pois o mesmo detectou a maioria dos soros positivos, no entanto mais da metade dos soros negativos também foram considerados positivos. Existem limitações na utilização deste antígeno em um teste de diagnóstico, devido a isto mais pesquisas devem ser feitas para tentar melhorar o resultado do teste.

Palavras-chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Diagnóstico, *cp1002_0126a*.

ANGELO, Henrique Ramos. **Expression and purification of rCP0126a recombinant protein and use in an Indirect ELISA**. 2014. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Caseous lymphadenitis (LC) is a disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a facultative and gram-positive intracellular bacterium. The disease affects mainly goats and sheep having two forms. The visceral form that is when the bacterium is lodged in the viscera of the animal, and the superficial form, which causes the formation of abscesses where the lymph nodes are located, due to this the animal ends up losing weight by not being able to feed or to move. Because it is a disease that does not have a 100% effective vaccine and its detection is difficult during initial stage, it makes necessary to develop a fast and effective diagnostic method to detect the disease in initial stage and avoid a greater Contamination of the herd. The CP0126a protein was considered, by bioinformatics techniques, to be an immunogenic target potential. Thus, the objective of this work was to clone and express the CP0126a protein and use it as antigen in an indirect ELISA. For this, the cp1002_0126a gene was amplified by PCR and cloned into the KpnI and HindIII sites of the pAE expression vector, the protein was expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star strain in insoluble form, after solubilization and dialysis it was used in An indirect ELISA with 46 sheep sera, which were also analyzed by an ELISA using proteins secreted in *C. pseudotuberculosis* culture. The results obtained through the ELISA were analyzed by the statistical method that uses the ROC curve. ELISA using the recombinant protein rCP0126a had a sensitivity of 95% and a specificity of 45.8%, when a cutoff of OD450nm = 0.078. The sensitivity of the test was high, however the specificity was low, as it detected most of the positive sera, however more than half of the negative sera were also considered positive. There are limitations in the use of this antigen in a diagnostic test, due to this more research should be done to try to improve the test result.

Key-words: Caseous lymphadenitis , *Corynebacterium pseudotuberculosis* , Diagnosis , cp1002_0126a .

Lista de Abreviaturas e Siglas

µL – Microlitro

ELISA – Ensaio imunoenzimático

LB - Luria bertani

LC – Linfadenite Caseosa

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

H – Hora

ph - Potencial Hidrogeniônico

°C – graus Celsius

q.s.p. – Quantidade suficiente para

CaCl² - Cloreto de cálcio

SDS-PAGE - dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida

E. coli – escheriquia coli

C. pseudotuberculosis - *Corynebacterium pseudotuberculosis*

PBS – Solução Fosfato Salina

PBS-T - Solução Fosfato Salina com Tween-20

Lista de figuras

- Figura 1:** Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do gene cp0126a..... 20
- Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os clones caracterizados enzimaticamente através da digestão com as enzimas *kpnI* e *HindIII*..... 21
- Figura 3:** *Western blot* da expressão da proteína recombinante rCP0126a utilizando anticorpo monoclonal anti-6Xhis..... 22
- Figura 4:** Análise da curva ROC, onde o número 1 representa os soros positivos e o 0 representa os soros negativos..... 23

Sumário:

1. Introdução Geral.....	12
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	13
2.2 Doença e epidemiologia.....	14
2.3 Diagnóstico.....	16
2.4 Gene <i>cp1002_0126a</i>	17
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 Metodologia.....	18
4.1.PCR.....	18
4.2 Digestão enzimática.....	18
4.3 Ligação.....	19
4.4 Transformação.....	19
4.5 Expressão e Purificação da proteína rCP0126.....	19
4.6 Western blot.....	19
4.7 ELISAs.....	20
4.7.1 ELISA com proteínas secretadas de <i>C.pseudotuberculosis</i>	20
4.7.2 ELISA utilizando a r0126 (ELISA-r0126a).....	21
4.8 Análise Estatística.....	21
5 Resultados.....	21
5.1 Obtenção do gene.....	22
5.2 Expressão da proteína CP0126a.....	23
5.3 ELISAs.....	24
6. Discussão.....	25
7. Conclusões.....	26
8. Referências.....	27

1. Introdução Geral

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença que acomete caprinos e ovinos, caracterizada por ser uma doença infectocontagiosa causando um quadro de granulomas nos linfonodos, possuindo material necrótico e cor esbranquiçada (AYERS *et al.* 1977) e seu agente etiológico é o *Corynebacterium pseudotuberculosis* uma bactéria intracelular facultativa e gram positiva (D'AFONSECA *et al.* 2010), são cosmopolitas sobrevivendo bem em todos os climas, e estando principalmente na pele dos animais e mucosa dos animais infectados, e no solo podendo sobreviver de 6 a 12 meses (BINNS *et al.* 2002), devido a fistulação dos abscessos formados pela doença, ocorre a contaminação da água e do alimento, o que ajuda a disseminar a doença entre o rebanho (BAIRD AND FONTAINE 2007).

O Brasil está entre os 10 maiores produtores mundiais de caprinos e ovinos, sendo que a maior parte se concentra na região Nordeste (IBGE 2010), nesta região acredita-se que a prevalência da doença nos rebanhos se aproxime dos 30%, em outros estados como Minas Gerais esta pode chegar em 70% dos rebanhos de ovinos e 80% dos rebanhos de caprinos (SEYFFERT *et al.* 2010).

O tratamento da LC é de alto custo, e atualmente seu diagnóstico é somente clínico, o que causa falsos negativos em animais assintomáticos (MIRIAN *et al.*, 2011), com isso se faz necessário o desenvolvimento de um diagnóstico que possa detectar a doença em sua fase inicial.

Através de técnicas de bioinformática a proteína CP0126a foi considerada um alvo com alto potencial imunogênico (SANTOS *et al.* 2012), e se utilizando de técnicas de biologia molecular, a proteína foi expressa de forma recombinante e posteriormente utilizada como antígeno em um teste de ELISA para diagnosticar a doença.

Este trabalho representa o desenvolvimento de um teste de diagnóstico para detecção da LC utilizando como antígeno a proteína recombinante

rCP0126a. Utilizando um banco de soros ovinos previamente caracterizados, foi testado o potencial da proteína recombinante de detectar a LC utilizando o método ELISA indireto.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi inicialmente detectada em um caso de linfagite por Edmond Nocard no ano de 1888, posteriormente em 1891 uma bactéria similar foi isolada de um abscesso renal de ovelha por Hugo Von Preisz, devido a isso ela foi nomeada como bacilo de “Preisz-Nocard” por muitas décadas. Em 1934 ela foi descrita por Churchward na Austrália, país que atualmente possui o maior rebanho de ovelhas do mundo (BENHAM *et al.*, 1962; COLLETT *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 2010), e em 1948 a nomenclatura atual foi definida no manual de Bergey, o *C. pseudotuberculosis* é caracterizado como patógeno intracelular facultativo, gram-positivo de forma pleomórfica, podendo ser cocoide ou bastonetes possuindo de 0,5 a 0,6 µm de largura e de 1,0 a 3,0 µm de comprimento, também não possui flagelo, capsula ou a capacidade de esporular, porém possui fim brilas. Em sua parede celular os açúcares, arabinose e galactose, são encontrados em grande quantidade, e esta é baseada em ácido meso-diaminopimelico, além de pequenas regiões de ácido mycolico terem sido encontradas (JOLLY *et al.*, 1965; SELIM *et al.* 2001).

C. pseudotuberculosis é um patógeno intracelular facultativo mesofílico, o pH ideal para crescimento é entre 7,0 e 7,2 e a temperatura é de 37°C (BENHAM *et al.*, 1962; MERCHANT *et al.* 1975), podendo também crescer em um pH entre 7,0 e 8,0 (BATEY *et al.*, 1986). Do ponto de vista nutricional o *C. pseudotuberculosis* é um organismo que possui alta demanda crescendo bem em meios de cultivo mais ricos como agar sangue, brain heart Infusion (BHI) ou Luria broth, seu crescimento aumenta quando cultivado em BHI enriquecido com lactalbumina, extrato de levedura ou tryptona (CAMERON *et al.*, 1965). Seu crescimento em meio solido possui uma cor que varia de

creme a amarelo, e é inicialmente esparça e posteriormente se organiza em forma de flocos ou estacas. Suas colônias são opacas e secas, após vários dias de incubação podem chegar até 3 mm de diâmetro (QUINN *et al.*, 1994). Atividade Beta hemolítica pode ser detectada quando cultivada em ágar sangue (CAMERON *et al.*, 1965; QUINN *et al.*, 1994). O crescimento em meio líquido ocorre com a formação de biofilme na superfície do meio, não deixando turvo, formando flocos e precipitando quando agitado (MERCHANT *et al.* 1975; MUCKLE *et al.*, 1982). A formação de biofilme é atribuída a lipídios de superfície, sendo sua quantidade altamente relacionada à virulência da cepa (Jolly *et al.* 1965). Recentemente um meio quimicamente definido (MQD) composto por fosfato dibásico, vitaminas e aminoácidos foi desenvolvido para o cultivo de *C. pseudotuberculosis*, sendo este também um meio livre de macromoléculas possibilitando os pesquisadores de fazerem um estudo do secretoma da bactéria (MOURA-COSTA *et al.*, 2002; PACHECO *et al.* 2011).

C. pseudotuberculosis possui características bioquímicas como a produção de catalase, fosfolipase D, urease e a fermentação de carboidratos como maltose, glucose, mannose e galactose, sendo este último usado ocasionalmente (MERCHANT *et al.*, 1975), não é capaz de fermentar a lactose ou de produzir gás, é uma oxidase negativa, e não possui a capacidade de digerir caseína (MERCHANT *et al.*, 1975; MUCKLE *et al.*, 1982; SONGER *et al.* 1988; QUINN 1994; Costa *et al.*, 1998;), acredita-se que existam dois biovars da *C. pseudotuberculosis* baseados na produção de nitrato redutase, o biovar equi, que acomete equinos e bovinos apresenta a capacidade de reduzir o nitrato em nitrito e sensibilidade a estreptomicina, já o biovar ovis que acomete ovinos e caprinos é em sua maioria nitrato negativa e apresenta resistência estreptomicina (COSTA *et al.*, 1998; BATEY *et al.*, 1986).

2.2 Doença e epidemiologia

A LC é uma doença que afeta pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) sendo causada pela bactéria *C. pseudotuberculosis* (BROWN and OLEANDER, 1987), podendo afetar bovinos, equinos e até mesmo humanos (PEEL *et al.*, 1997; DOHERR *et al.*, 1999; HOMMEZ *et al.*, 1999), a doença é inicialmente introduzida em rebanhos por um animal assintomático vindo de um rebanho

infectado (SCHREUDER *et al.*, 1986). A doença é disseminada no rebanho em consequência do rompimento principalmente dos abscessos superficiais (BROWN and OLEANDER, 1987). A LC causa grandes perdas econômicas na criação de caprinos e ovinos devido a diminuição da produção de leite, condenação das carcaças devido aos abscessos internos (BURRELL, 1981; LLOYD *et al.*, 1990). Esta problemática levou a introdução de um programa de erradicação da LC na Holanda e na Noruega, onde todos os animais positivos dos rebanhos eram removidos evitando o contato com os rebanhos não infectados, (HOLSTAD, 1988; DERCKSEN *et al.*, 1996; NORD *et al.*, 1998). O fato de a *C. pseudotuberculosis* pode ser capaz de sobreviver no ambiente por vários meses, torna a disseminação da doença muito mais fácil nos rebanhos (COLLET *et al.*, 1994).

O Brasil possui cerca de 26 milhões de cabeças de caprinos (34%) e ovinos (66%), o que o torna o 8º maior produtor do mundo. Sendo na região Nordeste onde se localiza a maior parte de seu rebanho, com aproximadamente 9,6 milhões de animais (IBGE 2010), uma alta prevalência de LC foi relatada por Pinheiro *et al.*(2000) com 66,9% de animais com sinais clínicos de LC no estado do Ceará. Em Minas Gerais estudos epidemiológicos demonstram uma prevalência de 75,8% relatada para ovinos e de 78,9% para caprinos (GUIMARAES *et al.* 2011). Na Austrália, 61% dos rebanhos de ovinos apresentaram sinais clínicos da infecção pelo *C. pseudotuberculosis* (EGGLETON *et al.* 1991). Nos EUA, a prevalência pode atingir até 43% (STOOPS *et al.* 1984). No Reino Unido, 45% dos produtores que foram entrevistados relataram abscessos na sua criação de ovinos (UNANIAN *et al.* 1985; BINNS *et al.* 2002).

Ovelhas e cabras são os animais mais afetados pelo *C. pseudotuberculosis*, mas ela é considerada um problema emergente de saúde pública devido a sua capacidade de produzir toxina difterica por lisogenização, fato este mostrado claramente *in vitro* (MAXIMESCO *et al.*, 1974), aumentando os esforços na melhora de serviços de saúde com doenças causadas por *Corynebacterium* que produzam a toxina diftérica, incluindo *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* em diagnósticos de difteria (DEWINTER *et al.*, 2005). Em 1966 o primeiro caso de LC foi diagnosticado em um homem de 37 anos no

Panamá, que trabalhava como cortador de grama, que acabou desenvolvendo linfadenopatia inguinal, a doença foi tratada como um linfo granuloma venéreo por um período de 3 semanas com tetraciclina. Uma excisão no linfonodo mostrou que ele continha características parecidas com a da LC em caprinos e ovinos. A cepa foi então isolada e demonstrou a capacidade de produzir ácido a partir de glicose, galactose, frutose, sacarose, maltose, xilose e dextrina, mas não era capaz de reduzir o nitrato em nitrito e não apresentava uréase (LOPEZ *et al.*, 1966). É importante ressaltar que somente dois casos de LC em humanos apresentaram sintomas que não fossem linfadenopatia, em um dos casos um estudante de veterinária que trabalhava com equinos foi infectado pela *C. pseudotuberculosis* e apresentou pneumonia eosinofílica (KESLIN *et al.* 1979), no segundo caso um homem de 65 anos apresentou uma infecção ocular causada pelo *C. pseudotuberculosis*, este pode ter sido o primeiro caso de infecção ocular por *C. pseudotuberculosis* (LIU *et al.*, 2005).

2.3 Diagnóstico

Atualmente o diagnóstico da LC é realizado de maneira clínica, onde os linfonodos afetados são observados e a *C. pseudotuberculosis* é isolada destes. Animais com infecção subclínica podem ser capazes de transmitir a doença, sendo assim importante se desenvolver um diagnóstico sorológico para a LC, existem vários métodos de detecção utilizando a resposta humoral de anticorpos (MIRIAN *et al.*, 2011).

Atualmente o diagnóstico utilizado é a cultura bacteriológica retirada de material purulento dos abscessos superficiais dos animais, com análise bioquímica posterior através do teste bioquímico API Coryne system (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France), o qual consiste em 21 testes bioquímicos e pode ser realizado entre 24 e 48h.

O teste ELISA tem sido utilizado com muita frequência para diagnóstico da LC em rebanhos, pois tem a capacidade de detectar animais infectados subclínicamente além de apresentar a possibilidade de promover altos níveis de sensibilidade e especificidade (DERCKSEN *et al.* 2000; GUIMARAES *et al.* 2009).

Em um estudo comparativo de exotoxinas de *C. pseudotuberculosis* utilizando diferentes lisados celulares, detectou-se que a exotoxina é mais sensível, ao contrario da de um completo lisado celular (MAAKI *et al.*, 1985), posteriormente uma comparação entre antígeno puro e parece celular purificada como antígeno foi realizada, o que mostrou que a utilização da parede celular tem uma alta sensibilidade (86%) mas possui baixa especificidade (68%) (SUTHERLAND *et al.*, 1987).

Um ELISA indireto foi utilizado para detecção anticorpos para antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* e alcançaram 98,5% de especificidade e 93,5% de sensibilidade (SEYFFERT *et al.* 2010).

Além dos testes sorológicos a detecção do DNA do *C. pseudotuberculosis* é utilizada. Uma análise baseada na reação de PCR multiplex (mPCR), para amplificar simultaneamente três sequencias de genes específicos, como: 16S *rDNA*, gene de escolha no estudo de taxonomia bacteriana; *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), amplamente usado para análises filogenéticas; e PLD (fosfolipase D), que codifica uma exotoxina associada com a virulência de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e *Arcanobacterium haemolyticum*, se mostrou tão específica quanto a cultura bacteriana seguida de testes bioquímicos. Apesar disso, este método não foi capaz de identificar microrganismos em amostras sorológicas (CETINKAYA *et al.* 2002; PACHECO *et al.* 2007).

2.4 Gene *cp1002_0126a*

Novos alvos vacinais de linhagens de *C. pseudotuberculosis* continuam a ser descritos (Lopes *et al.*, 2012; Pethick *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013). Com o resultado do sequenciamento e da análise proteômica foram identificados vários alvos, dentre eles pode-se citar o gene *Cp1002_0126a* que codifica para uma provável proteína secretada, esta foi descrita como potencialmente antigênica por ser reativa em um estudo de exosecretoma de *C. pseudotuberculosis* (Santos *et al.* 2012), e por isso, é considerada um alvo promissor no desenvolvimento de vacinas recombinantes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Utilização da proteína recombinante rCP0126a em um ELISA indireto para diagnóstico de LC.

3.2 Objetivos específicos

- Clonagem do gene *cp0126a* no vetor de expressão pAE.
- Expressão da proteína recombinante rCP0126a
- Utilização da proteína recombinante rCP1026a em um ELISA indireto.

4 Metodologia

4.1.PCR

A PCR do gene *cp0126a* (ADL20032.2) foi realizada utilizando 50 ng de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, 25 µL de MASTEMIX (Promega), 22 µL H₂O, 1 µL (10 µM) de cada primer F5'ATAGGTACCTCGAGCAACCAAGC3' e 1 µL de primer R 5'CGCAAGCTTTTATAGGATGTTAAGG3' para um volume total de 50 µl para realizar a amplificação do gene. A reação da PCR foi realizada com os seguintes ciclos: 1. 5 minutos a 95°C, 2. 1 minuto a 95°C, 3. 1 minuto a 55°C, 4. 1 minuto a 72°C, 5. Ciclos 2, 3 e 4 são repetidos 30 vezes, 6. 7 minutos a 72°C, a amostra foi purificada em kit GFX e eluída em 30 µL, e após são foram armazenados a -20°C.

4.2 Digestão Enzimática

A digestão do gene *cp0126a* e do vetor de clonagem pAE foi realizada durante 2 horas a 37°C utilizando 30 µL de DNA (aproximadamente 1 µg), 10 U das enzimas de restrição *kpnI* e *HindIII*. Além disso, foi adicionado a reação 5 µL de buffer 10x, e q.s.p de água ultrapura para 50 µL.

4.3 Ligação

A ligação do gene *cp0126a* ao vetor de clonagem pAE foi realizada utilizando 3 µL do vetor pAE (200 ng), 0,7 µL do gene (600 ng), 2 µL de buffer, 1 µL (1U) de T4 DNA ligase e 13,3 µL de água ultrapura. A reação foi mantida durante 2 h à temperatura ambiente.

4.4 Transformação

A transformação em *E. coli* TOP10 foi realizada por choque térmico a partir de uma colônia. Para isso uma colônia de *E. coli* TOP10 foi re-suspensa em 100 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂), e mantida no gelo por 15 minutos, após este tempo a reação foi mantida a 42°C por 1 minuto, e posteriormente foi adicionado 0,5 mL de meio LB (Luria bertani). Em seguida as transformações foram mantidas sob agitação a 37°C por 2 horas, e por fim plaqueadas em placa de petri contendo LB e 100 µg/mL de ampicilina. Os clones recombinantes foram selecionados por lise de colônia com fenol clorofórmio (v/v) e posterior eletroforese em gel de agarose 1%. Os clones recombinantes foram denominados de pAE/0126a.

4.5 Expressão e Purificação da proteína rCP0126

O vetor pAE/0126a foi transformado por choque térmico na linhagem de expressão *E. coli* BL21 Star. Para isso uma colônia da cepa de *E. coli* transformada com o vetor pAE/0126a foi inoculada em 25 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina sob agitação a 37°C por 16h. Após, os 25 mL foram transferidos para 500 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, esse cultivo foi mantido sob agitação a 37°C por 3 h até a atingir a DO₆₀₀ de 0,6. Após este tempo o cultivo foi induzido utilizando 1mM de IPTG e após 3h de indução a 37°C sob agitação s. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel. A pureza das mesmas foi determinada através de um SDS-PAGE 12% e a concentração determinada pelo kit BCA (Pierce).

4.6 Western blot

Para determinar a identidade da proteína recombinante rCP0126a foi realizado um Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6Xhistag. Para isso, as amostras contendo rCP0126a foram misturadas com tampão (100-mM

Tris-HCl pH= 6.8, 100-mM 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol) sob condições redutoras e aquecidas a 100°C durante 10 min e em seguida submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. Após as proteínas do gel foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). Para bloquear a membrana foi utilizado PBS contendo 5% de leite desnatado durante 1 h a 37°C. A membrana foi lavada três vezes com PBS tween 0,05% (PBS-T), durante 5 min cada e incubou-se com o anticorpo monoclonal anti-6X-his incubando-se por 1 h a 37°C. Após três lavagens com PBS-T adicionou-se anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluídos 1:4000 em PBS -T incubando-se a 37° durante 1 h. As bandas reativas foram reveladas utilizando 3,3'-tetrahidrocloro (DAB) e H₂O₂.

4.7 ELISAs

4.7.1 ELISA com proteínas secretadas de *C.pseudotuberculosis*

Um ELISA indireto, utilizando proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foi utilizado como teste padrão para definir se os soros eram positivos ou negativos. Este ELISA foi previamente descrito por (Seyffert et al. 2010) com algumas modificações. Os antígenos secretados foram obtidos a partir de culturas de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 após 48 h de cultivo em meio BHI. Para o ELISA, placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas por 16 h a 4°C com 100 µl/cavidade de proteínas secretadas diluídas 100 vezes em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 (pH= 9,6). Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS 1X pH 7.4; 0,1% de Tween 20) e bloqueadas com 100 µl/poço de leite desnatado 5% diluído em tampão PBS por uma hora, a 37°C. Após o bloqueio, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. Amostras de soros de ovinos, controles positivos e negativos, todos em duplicata, foram diluídos 1:100 em PBS-T. Após uma hora de incubação a 37°C e três lavagens com PBS-T, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo anti-ovino conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T. Após uma hora de incubação a 37°C e cinco lavagens com PBS-T, 100 µL/poço de solução reveladora (ortofenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 10 mL de tampão citrato-fosfato

pH=5.0 e 0,05% H₂O₂) foram adicionados. As placas foram incubadas a temperatura ambiente no escuro por 15 min. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placas de ELISA (Mindray Microplate Reader MR-96A).

4.7.2 ELISA utilizando a r0126 (ELISA-r0126a)

Para o ELISA foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades da (Maxisorp-Nunc) A padronização do teste foi realizada da seguinte forma; na etapa de sensibilização das placas várias concentrações da proteína rCP0126a foram testados (50 ng, 100 ng e 200 ng por cavidade) em de tampão carbonato bicarbonato a 4 °C durante 16 h, após este tempo a placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS-T.O bloqueio das placas foi realizado utilizando 200 µL de uma solução de PBS-T e 5% de leite em pó desnatado por cavidade, a reação foi mantida a 37 °C por 2 h e lavada 3 vezes. Em seguida foram adicionados dois soros ovinos positivo para LC e um soro negativo para LC na diluição 1:50, 1:100 e 1:200 diluídos PBS-T a reação foi mantida a 37 °C por 1 h e posteriormente lavada 5 vezes com PBS-T. Em seguida 100 µL o anticorpo anti-ovino conjugado com peroxidase (Sigma) diluídos 1:5000 em PBS-T foram adicionados a placa, a reação foi , Após uma hora de incubação a 37°C e cinco lavagens com PBS-T, 100 µL/cavidade de solução reveladora (200 moles ortofenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 10 mL de tampão citrato-fosfato pH=5 e 0,05% H₂O₂) foram adicionados. A absorbância foi medida a 450nm utilizando um leitor de placas de ELISA (Mindray Microplate Reader MR-96A).

4.8 Análise Estatística

Para uma avaliação da especificidade, sensibilidade e ponto de corte, os resultados dos 46 soros foram analisados sendo submetidos ao Receiver Operating Characteristic (ROC) utilizando o MedCalc estatística (versão 10.3.0). Esta análise traça devidamente os verdadeiros positivos dos verdadeiros negativos a fim de estipular o ponto de corte. Para avaliarmos a sensibilidade e a especificidade utilizamos o teste de ELISA com proteínas secretadas como padrão.

5 Resultados

5.1 Obtenção do gene

A obtenção do gene para expressão da proteína recombinante CP0126a foi realizada através da técnica de PCR, onde utilizando o DNA genômico da *C. pseudotuberculosis* se obteve a sequência referente ao gene que codifica para a proteína CP0126a no tamanho de 684 pb (Figura 1).

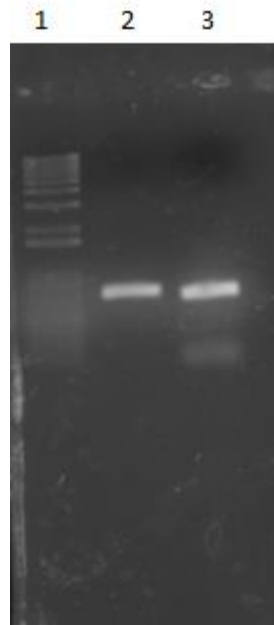


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do gene *cp0126a*. 1. Marcador de DNA 1Kb (Invitrogen); 2 e 3. Gene *cp0126a*

Após a realização da PCR as amostras foram ligadas em vetor pAE e transformadas em *E. coli* TOP10, as colônias recombinantes foram selecionadas por digestão enzimática e o resultado da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose para confirmar os recombinantes (Figura 2). As prováveis colônias recombinantes foram cultivadas afim de propagar o plasmídeo contendo o gene de interesse, denominado de pAE/cp0126a.

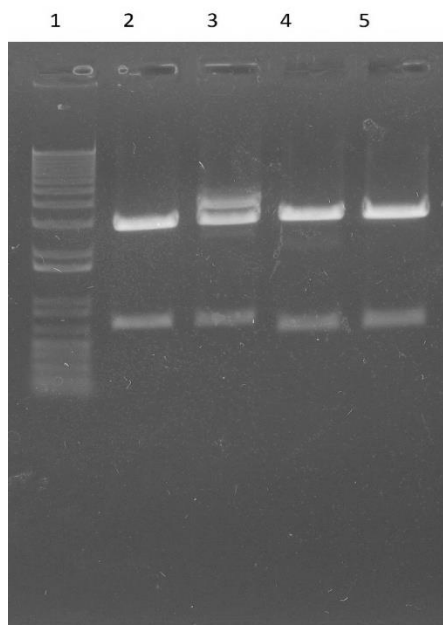


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os clones caracterizados enzimaticamente através da digestão com as enzimas *kpnI* e *HindIII*; 1. Marcador de DNA 1Kb (Invitrogen), 2 a 5. Possíveis clones recombinantes de pAE/0126a.

5.2 Expressão da proteína CP0126a

A proteína recombinante rCP0126a foi expressa de forma insolúvel e solubilizada em solução contendo 8 M de ureia. O massa molecular é de 25 kDa, após a purificação foi possível se obter a proteína pura, porém em pequena quantidade, devido a isso foram realizadas vários processos de expressão. A identidade da proteína foi confirmada através de Western blot utilizando o anticorpo monoclonal ant-6xhis (figura 3),

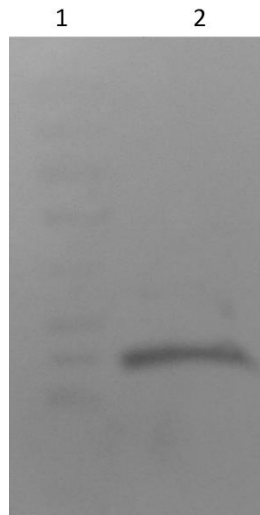


Figura 3: Western blot da expressão da proteína recombinante rCP0126a utilizando anticorpo monoclonal anti-6Xhis; 1. Marcador de massa molecular (invitrogen); 2. rCP0126a.

5.3 ELISAs

A proteína rCP0126a purificada utilizada em um ELISA indireto com 49 soros de ovinos. Para o ELISA foi realizada uma padronização das quantidades de proteína rCP0126a e diluição dos soros. As melhores condições para o ELISA foram 200 ng da proteína recombinante rCP0126a, e os soros ovinos na diluição de 1:50.

O resultado do ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rCP0126a foi comparado ao ELISA que utiliza as proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, conforme descrito por Seyffert et al. (2010) que consideramos como teste padrão. Após a análise estatística dos resultados utilizando a curva ROC, se obteve uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 46% e um ponto de corte de 0,078 (DO_{450nm}) (figura 3) com os 49 soros utilizados

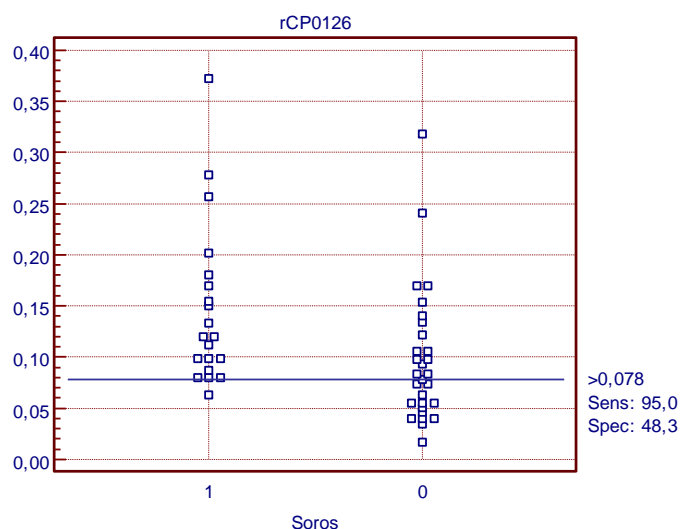


Figura 3: Análise da curva ROC, onde o número 1 representa os soros positivos e o 0 representa os soros negativos pelo ELISA utilizando proteínas secretadas.

6. Discussão

Devido ao fato de atualmente o diagnóstico da LC ser realizado de maneira clínica, se faz necessário o desenvolvimento de um método sorológico para detecção da doença já que animais com sintomas subclínicos da doença são potenciais transmissores (MIRIAN *et al.*, 2011). Valores de sensibilidade baixos podem levar a falsos negativos, e valores de especificidade altos levam a falsos positivos, esses valores podem ser afetados tanto por animais com baixa resposta imune ao *C. pseudotuberculosis*, quanto a antígenos semelhantes de outros patógenos (WILLIAMSON *et al.* 2001; DORELLA *et al.* 2006).

Atualmente um ELISA indireto utilizando as proteínas secretadas da *C. pseudotuberculosis* obteve 98,5% de sensibilidade e 93,5% de especificidade (SEYFFERT *et al.* 2010). Em testes de diagnóstico valores de sensibilidade e especificidade são os elementos mais importantes pois são eles que demonstram a eficiência do teste, uma combinação entre testes *in vitro* da resposta imune celular aos antígenos da *C. pseudotuberculosis* e testes de ELISA, são uma boa alternativa para o melhoramento do imunodiagnóstico da LC (BASTOS *et al.* 2011)

No presente trabalho a proteína CP0126a descrita como potencialmente promissora por análises de bioinformática, onde se avaliou a densidade de epitopos (SANTOS *et. al* 2012) foi expressa em *E. coli* para sua utilização em um teste de imunodiagnóstico (ELISA) para a detecção da LC, mesmo obtendo um valor de sensibilidade de 95%, o que, faz com que o teste obtenha um baixo número de falsos negativos, ele também obteve um valor de especificidade de 48,3% fazendo com que este apresente uma grande quantidade de falsos positivos, isto acarretaria em gastos com isolamento dos animais falso positivos e a sua possível contaminação, já que estes estariam sendo tratados como animais infectados e seriam postos em contato com animais que realmente estejam contaminados.

7. Conclusões

- A proteína rCP0126 foi expressa e purificada, e pode ser utilizada em um ELISA indireto

-O teste de ELISA utilizando a proteína rCP0126a apresentou uma alta sensibilidade, no entanto obteve uma especificidade muito baixa, o que faz com que haja muitos falsos positivos deixando o teste com uma baixa eficiência, sendo assim conclui-se que mais estudos devem ser feitos para tentar aumentar a eficiência do teste, como por exemplo aumentar o número amostral..

8. Referências

Ayers, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, n.171, p.1251-1254, 1977.

Batey RG (1986) Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Vet Microbiol** **11**: 145-152.

Benham CL, Seaman A, Woodbine M (1962) *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Vet Bull** **32**: 645-657.

Binns, S. H.; Bailey, M.; Green, L. E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. **Vet.Rec.**, v.150, n.9, p.263-268, 2002.

Burrell, D.H., 1981. Caseous lymphadenitis in goats. **Aust. Vet. J.** **57**, 105±110.

Cameron CM, Swart CF (1965) A new liquid medium for the cultivation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J S Afr Vet Med Ass** **36**: 185-188.

Costa LRR, Spier SJ, Hirsh DC (1998) Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Vet Microbiol** **62**: 135-143.

Collett MG, Bath GF, Cameron CM (1994) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections In: Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa. (2nd ed.), **Oxford University Press, Cape Town**.

Dercksen, D.P., Laak ter, E.A., Schreuder, B.E.C., 1996. Eradication program for caseous lymphadenitis in goats in the Netherlands. **Vet. Rec.** **138**, 237.

DeWinter LM, Bernard KA, Romney MG (2005) Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. **J Clin Microbiol** **43**: 3447-3449.

Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, et al.: 2006, *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Res** **37**:201–218.

Doherr, M.G., Carpenter, T.E., Wilson, W.D., Gardner, I.A., 1999. Evaluation of temporal and spatial clustering of horses with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Am. J. Vet. Res.** **60**, 284±291.

Eggleton, D. G.; Middleton, H. D.; Doidge, C. V.; Minty, D. W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium*

pseudotuberculosis vaccines with and without bacterial cells. **Aust.Vet.J.**, v.68, n.10, p.317-319, 1991.

Guimaraes, A. S.; Carmo, F. B.; Heinemann, M. B.; POrtela, R. W.; Meyer, R.; Lage, A. P.; Seyffert, N.; Miyoshi, A.; Azevedo, V.; Gouveia, A. M. High seroprevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC.Vet.Res.**, v.7, p.68, 2011.

Holstad, G., 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Goats in Norway. **Norwegian College of Vet. Med.**, Oslo, pp. 3±4.

IBGE. (2010) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em : 20/11/2014.

Jolly RD (1965) The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **N Z Vet J** **13**: 141-147.

Keslin MH, McCoy EL, McCusker JJ, Lutch JS (1979) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: A new cause of infectious and eosinophilic pneumonia. **Am J Med** **67**: 228-231.

Lloyd, S., Lindsay, H.J., Slater, J.D., Jackson, P.G.G., 1990. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in goats. **Goat Vet. Soc. J.** **11**, 55±65.

Liu DTL, Chan W-M, Fan DSP, Lam DSC (2005) An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Br J Ophthalmol** **89**: 238-251.

Lopes, T.; Silva, A.; Thiago, R.; Carneiro, A.; Dorella, F. A.; Rocha, F.S.; Dos Santos, A. R.; Lima, A. R.; Guimaraes, L. C.; barbosa, E. G.; Ribeiro, D.; Fiaux, K. K.; Diniz, C. A.; De Abreu, V. A.; De Almeida, S. S.; Hassan, S. S.; Ali, A.; Bakhtiar, S. M.; Aburjaile, F. F.; Pinto, A. C.; Soares, S. C.; Pereira, U. P.; Schneider, M. P.; Miyoshi, A.; Edman, J.; Spier, S.; Azevedo, V.; Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp267, isolated from LLama. **J.Bacteriol.**, v.194, n.13, p.3567-3568, 2012.

Lopez JF, Wonc FM, Quesada J (1966) *Corynebacterium pseudotuberculosis* First case of human infection. **Am J Clin Path** **46**:562.

Maki, L.R., Shen, S.H., Bergstrom, R.C., Stetzenbach, L.D., 1985. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.** **46**, 212±214.

Maximescu P, Oprisan A, Pop A, Potorac E (1974) Further studies on *Corynebacterium* species capable of producing diphtheria toxin (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. ovis*). **J General Microbiol** **82**: 49-56.

Merchant IA, Packer RA (1975) The Genus *Corynebacterium* In: Veterinary

bacteriology and virology. **The Iowa State University Press**, Iowa.

Moore R, Miyoshi A, Pacheco LGC, Seyffert N, Azevedo V (2010) *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. (4th ed.), **Blackwell Publishing**, Iowa.

Moura-Costa LF, Paule BJA, Azevedo V, Freire SM, Nascimento I, et al. (2002) Chemically defined synthetic medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture. **Braz J Anim Health Prod** **3**: 1-9.

Muckle CA, Gyles CL (1982) Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Can J Comp Med** **46**: 206-208.

Nord, K., Hostad, G., Eik, L.O., Gronstol, H., 1998. Control of caprine arthritis-encephalitis virus and *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Norwegian goat herds. **Acta Vet. Scand.** **39**, 109±117.

Pacheco LGC, Slade SE, Seyffert N, Santos AR, Castro TLP, et al. (2011) A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology** **11**: 12.

Pethick, F. E.; Lainson, A. F.; Yaga, R.; Flockhart, A.; Smith, D. G.; Donachie, W.; Cerdeira, L. T.; Silva, A.; Bol, E.; Lopes, T. S.; Barbosa, M. S.; Pinto, A. C.; Dos Santos, A. R.; Soares, S. C.; Almeida, S. S.; Guimaraes, L. C.; Aburjaile, F. F.; Abreu, V. A.; Ribeiro, D.; Fiaux, K. K.; Diniz, C. A.; barbosa, E. G.; Pereira, U. P.; Hassan, S. S.; Ali, A.; Bakhtiar, S. M.; Dorella, F. A.; Carneiro, A. R.; Ramos, R. T.; Rocha, F. S.; Schneider, M. P.; Miyoshi, A.; Carneiro, A. R.; Fontaine, M. C. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1/06-A, isolated from a horse in North America. **J.Bacteriol.**, v.194, p.4476, 2012^a.

Pinheiro, R. R.; Gouveia, A. M. G.; Alves, F. S. F. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p.534-543, 2000.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1994) *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi* In: Clinical Veterinary Microbiology. **Wolfe Publishing Company**, London.

Santos A., Carneiro A., Gala-García A., Pinto A., Barh D., Barbosa E., Figueira F., Dorella F., Souza F., Guimarães L., Turk M., Ramos R., Almeida S., Soares S., Pereira U., Abreu V., Silva A, Miyoshi A., Azevedo V. 2012. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics** **13**:S6

Schreuder, B.E.C., ter Laak, E.A., Griesen, H.W., 1986. An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in Netherlands. **Vet. Q.** **8**, 61±67.

Selim SA (2001) Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **J Vet Med B**

Infect Dis Vet Public Health 48: 241-258.

Seyffert, N.; Guimaraes, A. S.; Pacheco, L. G.; Portela, R. W.; Bastos, B. L.; Dorella, F. A.; Heinemann, M. B.; Lage, A. P.; Gouveia, A. M.; Meyer, R.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Res.Vet.Sci.**, v.88, n.1, p.50-55, 2010.

Soares, S. C.; Trost, E.; Ramos, R. T.; Carneiro, A. R.; Santos, A. R.; Pinto, A. C.; Barbosa, E.; Aburjaile, F.; Ali, A.; Diniz, C. A.; Hassan, S. S.; Fiaux, K.; Guimaraes, L. C.; Bakthiar, S. M.; Pereira, U.; Almeida, S. S.; Abreu, V. A.; Rocha, F. S.; Dorella, F. A.; Miyoshi, A.; Silva, A.; Azevedo, V.; Tauch, A. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. **J.Biotechnol.**, 2012.

Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, Olson GB, Kelley L (1988) Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Am J Vet Res 49:** 223-226.

Stoops, S. G.; Renshaw, H. W.; Thilsted, J. P. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. **Am.J.Vet.Res.**, v.45, n.3, p.557-561, 1984.

Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Mercy, A.R., Paton, M., Middleton, H., 1987. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Aust. Vet. J.** 64, 263±266.

Unanian, M. M.; Feliciano Silva, A. E.; Pant, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. **Trop.Anim Health Prod.**, v.17, n.1, p.57-62, 1985.

Williamson LH: 2001, Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract 17:**359–371.