

Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Vera Vale*

Songeli Freire**

Marcos Ribeiro***

Lia Regis****

Robson Bahia***

Renato Carminati****

Bruno Jean Adrien Paule*****

Ivana Nascimento*****

Roberto Meyer*****

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis é um cocobacilo gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos, filogeneticamente relacionado com o *Mycobacterium tuberculosis*. É amplamente distribuído em algumas espécies de animais, causando a linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. A linfadenite caseosa, de ocorrência mundial, é uma doença infecciosa crônica cuja transmissão se dá principalmente através da pele. No presente experimento, foram estudados aspectos do reconhecimento antigênico, pela resposta humoral, em caprinos criados em regime extensivo, naturalmente infectados ou imunizados com uma vacina viva (cepa 1002), atenuada, desenvolvida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA). As amostras de soros dos animais imunizados e de controle, coletadas mensalmente por um período de doze meses, foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA e pelo Western blotting, utilizando-se como antígenos o extrato bacteriano contendo exotoxina e sonicação bacteriano de uma cepa selvagem e da cepa 1002. A análise através do Western blotting revelou que o padrão de antígenos reconhecidos pelos anticorpos séricos de animais imunizados, sem raça definida (SRD) ou de duas raças puras, bem como animais SRD naturalmente infectados, é semelhante, verificando-se bandas protéicas com pesos moleculares entre 20 e 94 kDa. Esta análise possibilitou observar-se que diferentes proteínas são reconhecidas ao longo da imunização.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. ELISA. Western blotting.

* Professora de Microbiologia e Imunologia. UNEB - Campus II.

Laboratório de Biologia Experimental

Departamento de Ciências Exatas e da Terra

Universidade do Estado da Bahia - Campus II

Rodovia Alagoinhas-Salvador, s/n

48.100-000 - Alagoinhas Bahia Brasil

E-mail: veravale@scientist.com

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular

Departamento de Biointeração

Instituto de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Bahia

Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela

40.110-100 - Salvador Bahia Brasil

E-mail: labimuno@svn.com.br

** Pesquisadora do Laboratório de Imunologia-Labimuno. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA.

*** Mestrando. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA.

**** Doutorando. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA.

***** Professor de Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA.

INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é um coccobacilo gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos, que apresenta grande semelhança com o *Micobacterium tuberculosis* (PASCUAL et al., 1995). Biberstein, Knight e Jang (1971) identificaram dois biotipos baseados na capacidade de reduzir nitrato a nitrito (organismos redutores de nitrato, nitrato positivos). Esses microorganismos infectam eqüinos e bovinos, enquanto aqueles não redutores de nitrato (nitrato negativos) infectam ovelhas, cabras e bovinos.

C. pseudotuberculosis é amplamente distribuído em populações animais, causando linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, linfagite ulcerativa peitoral e abscessos abdominais em cavalos. Também ocorrem infecções em bovinos e humanos (SONGER et al., 1990; PEEL et al., 1997; SONGER, 1997).

A linfadenite caseosa é uma doença infecciosa crônica cuja transmissão se dá principalmente através da pele, pelo contato de animais sadios com animais portadores de abscessos que evoluem até a supuração (SIMMONS; HODGSON; STRUGNELL, 1997; SIMMONS et al., 1998), entretanto a transmissão também acontece através de aerossóis e do leite (ELLIS et al., 1987; PATON et al., 1995; HOMMEZ et al., 1999). A introdução de um animal infectado em um rebanho sadio resulta em aparecimento de abscessos nos animais ao longo de dois a três anos e a erradicação da doença é difícil (ALVES; OLANDER, 1999).

O processo patogênico desencadeado pelo *C. pseudotuberculosis* causando a linfadenite caseosa em ovinos e caprinos ainda não está bem definido. Dois fatores determinantes da virulência têm sido identificados: um deles é a presença de um lipídio tóxico na parede celular, que pode determinar a resistência da bactéria à morte por células fagocíticas (CARNE; WICKHAM; KATER, 1956); o outro é a exotoxina, uma fosfolipase D de peso molecular de 31 kDa que degrada a esfingomielina em ceramida (N-acetil esfingosil fosfato) e colina (SOUCEK; MICHALEC; SOUCKOVA, 1967, 1971). Esta

exotoxina é responsável pela disseminação do patógeno dentro do hospedeiro, por aumentar a permeabilidade vascular local (CARNE; ONON, 1978). Seu papel na virulência foi confirmado quando uma cepa modificada geneticamente para exotoxina mostrou-se incapaz de causar a linfadenite caseosa (WALKER et al., 1994; SIMMONS; HODGSON; STRUGNELL, 1997; SIMMONS et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo identificar os antígenos de *C. pseudotuberculosis* reconhecidos por animais naturalmente infectados ou imunizados, observar as modificações no reconhecimento antigênico nos animais imunizados ao longo da imunização e comparar o padrão de reconhecimento antigênico entre animais imunizados sem raça definida (SRD) e de raças puras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vacina atenuada cepa 1002

A vacina viva contendo a cepa atenuada 1002, liofilizada, foi produzida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA).

Animais

Os caprinos utilizados nos experimentos foram animais SRD, da raça pardo alpina e da raça anglo-nubiana, com idade entre três meses e um ano, de ambos os sexos, com sorologia negativa para *C. pseudotuberculosis*. Os grupos foram mantidos nas condições típicas de criação extensiva, na Fazenda Pilar, no município de Jaguarari, Estado da Bahia.

Grupos experimentais

Foram selecionados quarenta e quatro caprinos divididos em seis grupos: I - animais SRD (n = 10); II - animais da raça anglo-nubiana (n = 10); III - animais da raça parda alpina (n = 6); IV- controle negativo: animais SRD (n = 8); V - animais SRD naturalmente infectados (n = 10).

Os grupos I, II, III foram vacinados com 1ml da vacina atenuada liofilizada (cepa 1002), contendo $4,5 \times 10^{10}$ CFU, via subcutânea, na região pré-escapular direita. O grupo I recebeu uma segunda dose aos 90 dias.

O grupo controle foi inoculado com o meio utilizado como veículo da vacina, nas mesmas condições acima mencionadas.

O grupo naturalmente infectado foi selecionado ao acaso, a partir de animais de mesma faixa etária dos outros grupos experimentais e que apresentavam abscessos.

Exame clínico dos animais

Os animais imunizados foram examinados clinicamente antes e após a vacinação, mensalmente, sendo sempre realizada a inspeção dos diversos linfonodos superficiais.

Acompanhamento sorológico

O acompanhamento sorológico dos animais foi realizado através do teste ELISA e do Western blotting, padronizado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Os soros dos animais do grupo I, coletados mensalmente, foram avaliados durante doze meses; os dos grupos II e III, durante seis meses.

Antígenos para ELISA e Western blotting

Sonicado bacteriano - A cepa 1002 e a cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis* foram semeadas em meio BHI e cultivadas em ágar-triptose lactoalbumina enriquecido com extrato de levedura. As suspensões bacterianas foram lavadas, centrifugadas a 3.000g a 4°C durante 30 minutos, e ressuspensas em tampão PBS, pH 7.4 na proporção de 0,5ml de massa bacteriana para 2ml do tampão. As suspensões bacterianas foram submetidas a cinco ciclos de um minuto cada, em um sonicador a 60 Hz de frequência (Branson Sonifier 450), a 4°C. Foi adicionado 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e incubado a 37°C durante 30 minutos. Este homogeneizado foi então centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi alíquotado e acondicionado a -20°C até sua utilização.

Extrato de exotoxina - O *C. pseudo-tuberculosis* cepa 1002 viva e atenuada foi cultivado em meio de infusão de cérebro e coração (BHI), durante cinco dias, a 37°C. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 1500 g, durante 30 minutos. O sobrenadante com 1% de timerosal foi alíquotado e acondicionado a 4°C até sua utilização.

Ensaio imunoenzimático: ELISA indireto

As placas foram sensibilizadas com 100µl do sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* diluído a 1:100 em tampão carbonato bicarbonato, 0,05M, pH 9.6, incubadas por 12 horas a 4°C. Após lavagens com o tampão salina fosfato contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T 20), as placas foram bloqueadas com 200µl/poço de PBS-T 20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas. A seguir, foram incubadas com 100µl/poço dos soros testes e controles diluídos a 1:100 em PBS-T 20 contendo 1% de leite desnatado durante uma hora, a 37°C. Foram adicionados às placas 100µl/poço do antisoro anti-IgG (cadeias leves e pesadas) de caprino produzido em coelho, conjugados à peroxidase (marca Dako), diluída a 1:10.000 em PBS-T e incubadas, durante 45 minutos, a 37°C em estufa. Logo após, foram adicionados 100µl/poço da solução reveladora (citrato-cítrico 0,01M contendo 0,04% de H₂O₂ e 1mg/ml de ortofenilenodiamina) durante 15 minutos, à temperatura ambiente, protegendo-se da luz. A reação foi interrompida com a adição de 25µl/poço de uma solução 4N de H₂SO₄. A leitura da densidade óptica foi feita em fotocolorímetro automático para ELISA (marca Biorad, EUA), com filtro para seleção de absorbância de 490nm de comprimento de onda.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

O preparado antigênico foi analisado por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. O sistema utilizado foi o descontínuo, composto de um gel de empilhamento constituído por 4% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% de persulfato de amônia, 0,05% de Temed e contendo Tris-HCl 0,5

M, pH 6.8. Esse gel era colocado sobre um gel de corrida constituído por 12% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 1,5M Tris-HCL pH 8.8, 10% SDS, 0,05% persulfato de amônia, 0,05% de Temed, contendo ainda Tris-HCL 1,5 M, pH 8.8.

A eletroforese foi realizada em tampão de migração contendo Tris 0,124 M, glicina 0,96 M, 0,5% de SDS, pH 8.3, durante 3 horas, numa corrente de 30mA.

As proteínas presentes foram visualizadas no gel corado com azul de Coomassie R-250.

Western blotting

Os soros dos animais selecionados por ELISA foram analisados por Western blotting com o extrato atigênico sonificado das cepas selvagem e 1002 para a análise do perfil de reconhecimento antigênico das bandas protéicas.

As proteínas separadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (Millipore), em tampão de transferência contendo Tris 0,25 M, glicina 0,193 M e 20% de metanol.

Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução aquosa de vermelho Ponceau S, descorada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 3mm. Foram bloqueados com leite desnatado a 5% em salina fósforo contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T 20), por 12 horas, a 4°C. Os soros foram diluídos a 1:50 em PBS-T 20 contendo 1% de leite desnatado, durante uma hora, a 37°C. A seguir, foram incubadas, durante uma hora, a 37°C, com anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, diluído a 1:100 em PBS-T 20. A revelação das bandas foi feita com 4-cloro-1-naftol e peróxido de hidrogênio em PBS.

Controles do Western blotting

Os controles negativos e positivos para o Western blotting foram um "pool" da primeira coleta, obtidos dos animais dos grupos IV e V, respectivamente. Os soros positivos e negativos utilizados apresentavam valor de densidade óptica, respectivamente, maior do que 1,0 e me-

nor do que 0,2 (0,2 foi o valor do *cut off*) no teste ELISA.

RESULTADOS

A partir de extratos das cepas selvagem e atenuada (1002) de *C. pseudotuberculosis*, determinou-se a concentração protéica pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1952). Após testes iniciais, constatou-se que os melhores resultados do Western blotting foram obtidos com a concentração de 0,7mg por poço de 4,3cm x 2,1cm. Esta concentração foi repetida nos diversos experimentos.

A análise das bandas protéicas dos extratos obtidos a partir do *C. pseudotuberculosis*, cepa selvagem e cepa atenuada (1002), por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, demonstra que o perfil eletroforético dos componentes protéicos é muito semelhante, com cerca de sete bandas com pesos moleculares entre 14,4 e 90 kDa. O perfil de bandas é apresentado na Figura 1.

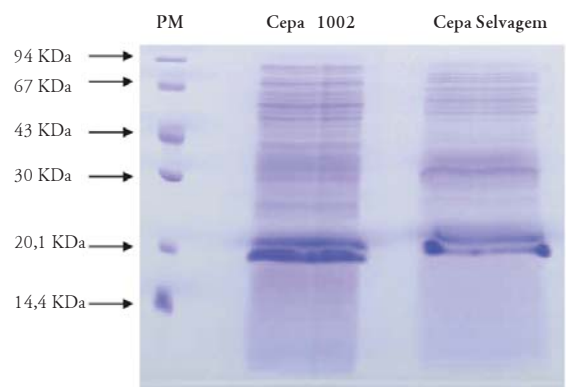


Figura 1 - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% de extratos bacterianos sonificados de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, cepa selvagem e corados com Coomassie blue R-250

Observou-se também uma similaridade entre o perfil de bandas obtidas após a reação dos soros caprinos com antígenos fracionados da cepa selvagem e atenuada de *C. pseudotuberculosis* (FIGURA 2). Assim, foram detectadas proteínas com pesos moleculares variando entre

20 e 94 kDa. Dentre estas proteínas, encontrou-se uma de 31,5 kDa, presente nos extratos de *C. pseudotuberculosis* cepa selvagem e atenuada, que é reconhecida por anticorpos do soro de animais infectados e imunizados. Nos grupos de animais SRD e nos grupos de animais das raças parda alpina e anglo-nubiana, ela é igualmente reconhecida. Esta proteína é descrita na literatura como sendo a exotoxina.

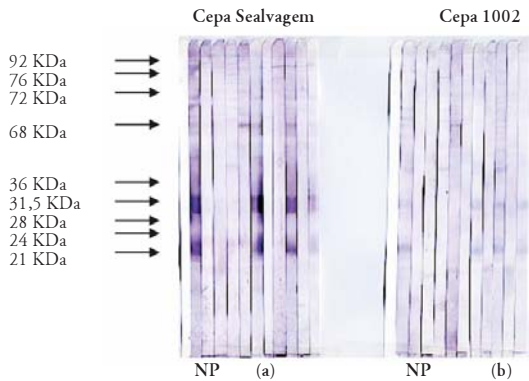


Figura 2 - Western blotting em membranas de nitrocelulose de extrato bacteriano sonificado de *C. pseudotuberculosis* cepa selvagem (a) e cepa 1002 (b). N (soro controle negativo), P (soro controle positivo)

Os extratos antigênicos obtidos de *C. pseudotuberculosis* mostram imunorreatividade a soros dos animais acompanhados ao longo de doze meses de imunização, para bandas protéicas de 21, 24, 28, 31.5, 36, 68, 72, 76 e 92 kDa. Nas amostras de soros analisadas, a banda de 31.5 kDa é reconhecida a partir de 30 dias. As bandas de 36, 68, 72, 76 e 92 kDa são reconhecidas entre 30 e 60 dias, enquanto as bandas de 21, 24 e 28 kDa são reconhecidas após o sexto mês de imunização (FIGURA 3).

O padrão de bandas obtido pela análise da reatividade dos soros de animais da raça anglo-nubiana e pardo alpina com 120 dias de imunização é similar ao dos animais SRD com o mesmo tempo de imunização, com exceção de um único animal de raça anglo-nubiana, que reconheceu também as proteínas de 21 e 24 kDa neste tempo (FIGURA 4).

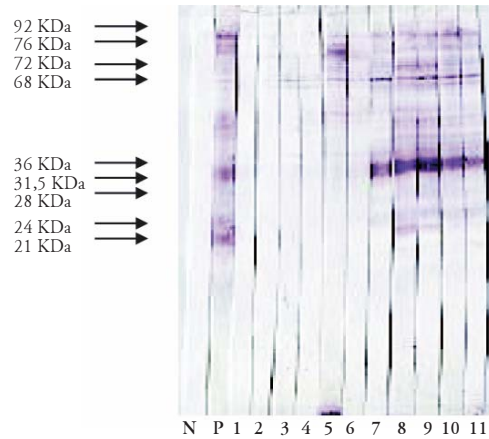


Figura 3 - Western blotting em membranas de nitrocelulose de extrato bacteriano sonificado de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002. N (soro controle negativo), P (soro controle positivo), animal ao longo de doze meses de imunizado (1-11)

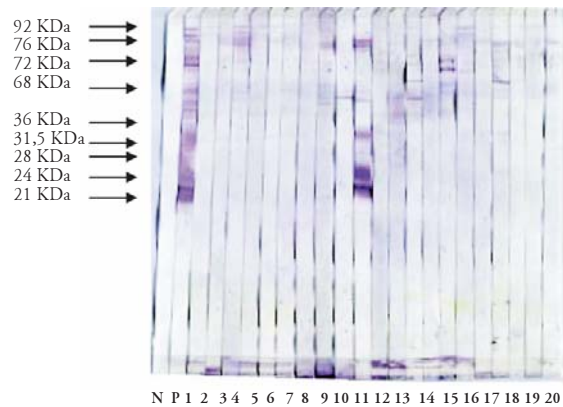


Figura 4 - Western blotting em membranas de nitrocelulose de extrato bacteriano sonificado de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002. N (soro controle negativo), P (soro controle positivo), soros de caprinos imunizados: anglo-nubiano (1-10), pardo alpino (11-16) e SRD (17-21)

Os animais naturalmente infectados apresentam o mesmo padrão de reconhecimento antigênico apresentado pelos animais imunizados. A coincidência é grande quando se comparam soros de animais naturalmente infectados com soros de animais imunizados após o sexto mês de imunização (FIGURA 5).

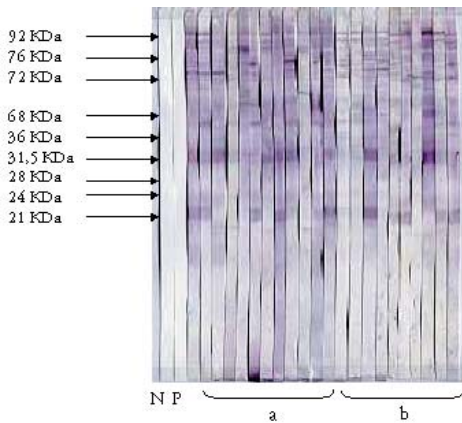


Figura 5 - Western blotting em membranas de nitrocelulose de extrato bacteriano sonificado de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002. Animais imunizados (a), animais infectados(b), N (soro controle negativo), P (soro controle positivo)

DISCUSSÃO

Embora o desenvolvimento da resposta imune humoral seja importante para a defesa imune em caprinos contra *C. pseudotuberculosis*, tem-se sugerido que a imunidade eficaz contra este patógeno pode ser obtida somente com o uso de vacinas que estimulem preferencialmente a resposta imune celular (CAMERON et al., 1982).

Nas últimas décadas, vários estudos têm evidenciado a capacidade de vacinas contra *C. pseudotuberculosis* — com bactérias vivas ou mortas, com ou sem adjuvante, geneticamente modificadas, contendo ou não exotoxina — gerarem uma resposta imune humoral e celular (CAMERON; MINNAAR, 1969; CAMERON et al., 1972; EGGLETON et al., 1991; ELLIS et al., 1991a, 1991b; HODGSON et al., 1992; SIMMONS; HODGSON; STRUGNELL, 1997; SIMMONS et al., 1998; STANDFORD et al., 1998; ALVES; OLANDER, 1999).

Os resultados, apresentados neste trabalho, do Western blotting com extratos de proteínas totais de *C. pseudotuberculosis*, cepa selvagem e cepa atenuada, utilizando-se soro de animais imunizados e naturalmente infectados, não revelaram diferenças no reconhecimento antigênico, achado que concorda com outros documentados na literatura (COSTA, 1996).

As bandas protéicas detectadas apresentam pesos moleculares de 21, 24, 28, 31.5, 36, 68, 72, 76 e 92 kDa; frações similares com este peso são referidas na literatura. Ellis e colaboradores (1991a, 1991b), utilizando extrato de célula, constataram frações de pesos moleculares de 20, 22.4, 35.5, 36.3, 39.8, 45.7, 56.2, 63.1, 79.4, 100 kDa e de 12, 25.1, 31.6, 36.3, 39.8, 63.1, 70, 75 e 79 kDa. Walker e colaboradores (1994) encontraram bandas de 28, 38 e 40 kDa, enquanto Sting, Steng e Spengler (1998), algumas com peso molecular variando entre 20 e 120 kDa. Braithwait e colaboradores (1993) constataram proteínas de célula inteira de peso molecular variando de 20 a 119 kDa reconhecidas por soros de caprinos naturalmente infectados. As diferenças nos tipos de proteínas e de seus pesos moleculares referidas nesses trabalhos, confrontadas com os dados aqui apresentados, podem ser atribuídas às diferentes cepas, aos diferentes métodos de preparo dos antígenos e/ou a diferentes condições de realização da eletroforese (por exemplo, diferentes concentrações do gel de poliacrilamida).

No que se refere ao reconhecimento de antígenos ao longo da imunização, a proteína de 31.5 kDa é fracamente reconhecida com 30 dias após a imunização, e o seu reconhecimento vai se tornando mais intenso com o tempo. Esta proteína é citada por diversos pesquisadores como sendo uma fosfolipase D, exotoxina responsável pela disseminação do microorganismo no hospedeiro. As frações protéicas de 36, 68, 72, 76, e 92 kDa são reconhecidas entre 30 e 60 dias, enquanto as proteínas de 21, 24 e 28 kDa são reconhecidas mais tardiamente, ou seja, após o sexto mês de imunização, o que não coincide com os achados de Ellis e colaboradores (1987), que não observaram a relação entre os estágios evolutivos da doença e o aparecimento de anticorpos para antígenos específicos. É provável que as condições claramente diversas da imunização pela infecção natural e da imunização vacinal sejam determinantes de uma também diversa dinâmica de aparecimento de anticorpos específicos para os diferentes antígenos.

A similaridade observada no reconhecimento antigênico, por anticorpos, entre animais

imunizados e naturalmente infectados, e o fato de esses não se tornarem imunes mesmo após aparente cura podem ser devidos, talvez, ao papel pouco decisivo dos anticorpos na efetiva imunoproteção contra este microorganismo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

a) Não existem diferenças antigênicas detectáveis por Western blotting entre extratos de uma cepa selvagem e da cepa 1002.

b) Os anticorpos produzidos contra *C. pseudotuberculosis* pelos animais imunizados mudam o padrão de reconhecimento antigênico, ao longo de doze meses de imunização, com a vacina viva 1002 liofilizada.

c) Animais das raças pardo alpina, anglo-nubiana, bem como animais SRD apresentam o mesmo padrão de reconhecimento de antígenos por anticorpos, após sessenta dias de imunização com a vacina viva 1002 liofilizada.

d) Animais imunizados com a vacina viva 1002 e naturalmente infectados apresentam o mesmo padrão de reconhecimento antigênico.

Antigen recognition by antibodies against Corynebacterium pseudotuberculosis from naturally infected or immunized goats

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis is a gram positive bacillus, facultative intracellular pathogen of macrophages which is phylogenetically related with Mycobacterium tuberculosis. This pathogen is widely distributed in some animal species and is responsible for caseous lymphadenitis in sheep and goats. Caseous lymphadenitis is a widely spread chronic infectious disease, transmitted mainly through the skin. In the present experiment, aspects of the antigenic recognition by humoral response of goats bred in extensive condition, naturally infected or immunized with a live attenuated vaccine (cepa 1002, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola), have been studied. Samples of sera from immunized and control animals were collected monthly for a twelve month period and analyzed by ELISA and Western blotting. The analysis of the Western blotting results showed that the antigenic pattern recognized by sera antibodies of immunized animals is similar in crossbred or pure race animals and in naturally infected ones as well. Protein bands with molecular weights between 20 and 94 kDa have been detected. By analysing those samples, it was possible to observe that different proteins are recognized with elapsing time after immunization.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis. ELISA. Western blotting.*

REFERÊNCIAS

ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. *Vet. Notícias*, Uberlândia, v.5, n.1, p.69-75, 1999.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Rec.*, Edimburgh, v.89, p.691-692, 1971.

BRAITHWAITE, C. E. et al. Characterization of detergent soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v.38, p.59-70, 1993.

CAMERON, C. M. The immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Reserach Institute*, Onderstepoort, v.3, p.458-468, 1982.

- CAMERON, C. M.; MINNAAR, J. L. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **J. Vet. Res.**, Onderstepoort, v.36, n.2, p.207-210, 1969.
- CAMERON, C. M. et al. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. **J. Vet. Res.**, Onderstepoort, v.39, n.1, p.11-24, 1972.
- CARNE, H. R.; ONON, E. O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature**, Londres, v.271, p.246-248, Jan. 1978.
- CARNE, H. R.; WICKHAM, N.; KATER, J. C. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. **Nature**, Londres, v.178, p.701-702, 1956.
- COSTA, S. L. *Avaliação da resposta imune humoral de caprinos vacinados com Corynebacterium pseudotuberculosis viva atenuada*. 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1996.
- EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Vet. Journal**, Victoria, v.68, n.10, p.317-319, Oct. 1991.
- ELLIS, J. A. et al. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. Immunopath.**, Amsterdam, v.28, p.289-301, 1991a.
- ELLIS, J. A. et al. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Vet. Immunol. Immunopath.**, Amsterdam, v.28, p.303-316, 1991b.
- ELLIS, T. M. et al. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Aust. Vet. J.**, South Perth, v.64, n.9, p.261-263, Sept. 1987.
- HODGSON, A. L. M. et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infect. Immun.**, Victoria, v.60, n.7, p.2900-2905, July 1992.
- HOMMEZ, J. et al. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.4, p.954-957, April 1999.
- LOWRY, O. H. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1952.
- PASCUAL, C. et al. Phylogenetic analysis of genus *Corynebacterium pseudotuberculosis* based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Spencers Wod, n.45, p.724-728, 1995.
- PATON, M. W. et al. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Aust. Vet. J.**, Victoria, v.72, n.7, p.266-269, 1995.
- PEEL M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin. Infect.**, Chicago, v.24, p.185-191, 1997.
- SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, Victoria, v.65, n.8, p.3048-3056, Aug. 1997.
- SIMMONS, C. P. et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, Victoria, v.66, n.2, p.474-479, Feb. 1998.
- SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, Arizona, v.5, n.4, p.156-160, April 1997.
- SONGER, J. G. et al. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Victoria, v.58, n.1, p.131-136, Jan. 1990.
- SOUCEK, A., MICHALEC, C., SOUCKOVA, A. Enzyme hydrolysis of sphingomyelins by a toxin of *Corynebacterium ovis*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.144, p.180-182, 1967.
- SOUCEK, A., MICHALEC, C., SOUCKOVA, A. Identification and characterization of a new enzyme of the group "phospholipase D" isolated from *Corynebacterium ovis*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.227, p.116-128, 1971.
- STANDFORD, K. et al. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. **Can. J. Vet. Res.**, Montreal, v.2, n.1, p.38-43, 1998.

STING, R., STENG, G., SPENGLER, D. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Med.*, Berlin, v.45, p.209-216, 1998.

WALKER, J. et al. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infection and Immunity*, Victoria, v.62, n.6, p.2562-2567, June 1994.