

Genes 16S RNA ribossomal e *pld* como marcadores moleculares para identificação genotípica de amostras clínicas de *Corynebacterium* spp.

Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier^{*1}, Angélica Alves de Moura Freitas², Anna Christina de Almeida³, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁴, Igor Viana Brandi³

Resumo

A caracterização genética das espécies é essencial quando se deseja eleger uma estirpe vacinal ou controlar a propagação de focos de uma doença em uma região. O 16S rRNA e genes que codificam fosfolipase D (PLD) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* desempenham um papel importante como marcadores para identificação de genótipo bacteriano. O objetivo deste estudo foi validar um "in house" metodologia molecular para identificação genética de *Corynebacterium* spp. isolado a partir de amostras clínicas mantidos em laboratório. Para este efeito, onze isolados foram reativados em caldo de infusão de cérebro e coração. As colônias cultivadas identificados como bacilos Gram-positivas foram submetidas à extração do DNA cromossômico com kit KAPAExtract® de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA cromossômico extraído foi quantificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e, em seguida, submetidos a PCR duplex com os iniciadores específicos para o gênero e espécie de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Os produtos de amplificação gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. Nenhum dos isolados amplificou os genes-alvo para gênero e espécie específicos esperados para *C. pseudotuberculosis*. O controle positivo, *C. pseudotuberculosis* CIP102968, teve os fragmentos de 813 e 201 pares de bases que correspondem aos 16S rRNA genes (gênero específico) e PLD (espécies específicas), respectivamente, amplificado. O controle negativo, *Escherichia coli* ATCC 25922 não amplificou quaisquer genes alvo como esperado. Os resultados mostraram a necessidade de melhoria nas técnicas de amostragem e identificação microbiológica anterior que antecede a etapa de identificação molecular e eles são extremamente importantes para a identificação do genótipo preciso de cepas de *C. pseudotuberculosis*

Palavras-chave: Linfadenite caseosa. PCR. Fosfolipase D.

The 16S ribosomal RNA and *pld* genes as molecular marker to genotyping identification of *Corynebacterium* spp. isolated from clinical samples

Abstract

The genetic characterization of species is essential when you want to elect a vaccine strain or control the spread of outbreaks of a disease in a region. The 16S rRNA and *pld* *Corynebacterium*

¹Docente da Universidade Estadual de Montes Claros, MG. Pós-doutora em Produção Animal no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

*Autora para correspondência: ericsson_aerc@yahoo.com.br

²Mestre em Biotecnologia - Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG.

³Docente da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG.

⁴Docente da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG.

Recebido para publicação em 01 de junho de 2016

Aceito para publicação em 09 de agosto de 2016

pseudotuberculosis genes play an important role as markers for bacterial genotype identification. The aim of this study was to validate an "in house" molecular methodology for genetic identification of *Corynebacterium* spp. isolated from clinical samples maintained in the laboratory. For this purpose, eleven isolates were reactivated in Brain Heart Infusion broth. The grown colonies identified as Gram-positive bacilli were submitted to chromosomal DNA extraction with KAPAExtract® kit according to manufacturer's recommendations. The extracted chromosomal DNA was quantified by 1.5% agarose gel electrophoresis and then subjected to duplex PCR with specific primers for the genus and species of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The amplicons generated were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis. None of the isolated amplified the target genes for genus and specific species for those expected to be *C. pseudotuberculosis*. The positive control, *C. pseudotuberculosis* CIP102968 amplified fragments of 813 and 201 base pairs which corresponding to the 16S rRNA (genus specific) and *pld* genes (species specific) respectively. The negative control, *Escherichia coli* ATCC® 25922 do not amplified any target genes as expected. The results showed the need for improvement in the sampling techniques and previous microbiological identification preceding the molecular identification step and they are extremely important for precise genotype identification of strains of *C. pseudotuberculosis*.

Keywords: Caseous lymphadenitis. PCR. Phospholipase D.

Introdução

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno intracelular facultativo que causa a linfadenite caseosa (LC) em caprinos e ovinos, linfangite ulcerativa em equinos, abscessos superficiais em bovinos, suínos, cervos e animais de laboratório, artrites e bursites em ovinos, abscessos de peito em equinos e mais raramente em camelos, caprinos e cervos (KURIA et al., 2001).

Com base na capacidade de redução do nitrato, dois biótipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* têm sido descritos na literatura: linhagens nitrato negativas referenciadas como sorotipo I (biotipo *ovis*) e linhagens nitrato positivas classificadas como sorotipo II (biotipo *equi*). Linhagens isoladas de caprinos são nitrato negativos enquanto que aquelas encontradas em equinos são tipicamente nitrato positivas (TORRES et al., 2013; WAGNER et al., 2011).

Khamis et al., (2004) propuseram um método genotípico para identificação de espécies de *Corynebacterium* baseado em técnicas de PCR e sequenciamento de genes. A sequência que codifica o gene 16S rRNA é o marcador mais usado para análise taxonômica bacteriana. Utilizando esse marcador, Khamis e colaboradores identificaram o gênero *Corynebacterium*.

Uma exotoxina comumente conhecida como fosfolipase D (*pld*) e lipídeos da parede bacteriana (ácidos micólicos e meso-diaminopimélicos) têm sido investigados como possíveis fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*

(PACHECO et al., 2007). Pacheco et al. (2007) desenvolveram um ensaio de PCR multiplex para detecção de *C. pseudotuberculosis* cujo alvo foram três genes presentes nessa bactéria: os genes 16S rRNA, *rpoB* e *pld*. Este método permitiu uma identificação eficiente de 40 isolados destas bactérias já identificadas previamente por testes bioquímicos. De acordo com os autores, o ensaio por eles desenvolvido melhorou significativamente a rápida detecção de *C. pseudotuberculosis* e poderia substituir a cultura bacteriológica utilizado no diagnóstico de LC.

Ilhan (2013) identificou linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de pus de linfonodos através da técnica de PCR. O alvo dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo foi a sequência parcial do gene que codifica para a fosfolipase D (*pld*) conforme proposto por Pacheco et al. (2007). Os resultados de Ilhan revelaram que o ensaio de PCR com os oligonucleotídeos para o gene *pld* foi um método rápido e sensível capaz de identificar cepas de *C. pseudotuberculosis*.

Torres et al. (2013) desenvolveram um ensaio de PCR multiplex (PCRm) objetivando a identificação e determinação de toxigenicidade de espécies de *Corynebacterium* com potencial zoonótico. Esse ensaio utilizou cinco pares de oligonucleotídeos para os seguintes genes alvo: *rpoB* (*Corynebacterium* spp.), 16S rRNA (*C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*), *pld* (*C. pseudotuberculosis*). Neste ensaio foram testadas 213 linhagens de *Corynebacterium*, onde os resul-

tados do PCRm para todas as linhagens toxigênicas e não toxigênicas de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* concordaram em 100% com os resultados de identificação obtidos com métodos bioquímicos padrão utilizados para identificação das espécies em questão. O objetivo deste trabalho foi padronizar um método de genotipagem “in house” baseado na detecção dos genes 16S rRNA e *pld* de *C. pseudotuberculosis* em isolados presuntivamente identificados por métodos microbiológicos como *Corynebacterium* spp mantidos em laboratório.

Material e métodos

A amostra foi compreendida de onze (11) amostras presuntivamente identificadas por métodos microbiológicos padrão com *Corynebacterium* spp. mantidos em laboratório sob a forma de repiques em meio de cultivo ágar-sangue. Estas foram isoladas a partir de pus de abscessos de nódulos linfáticos de caprinos com suspeita de diagnóstico de linfadenite caseosa em região norte mineira, endêmica para esta doença.

Os isolados mantidos em meio aguar sangue foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 37°C. Após 24 horas de crescimento, as suspensões microbianas foram semeadas em placas de 90 mm contendo

meio BHI adicionado de ágar a 1,5% e incubados a 37°C durante 24 horas. As colônias crescidas nas placas identificadas como bacilos Gram-positivos foram submetidas à extração de DNA com o kit KAPAExtract® conforme recomendações do fabricante. Os DNAs cromossomais extraídos foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e em seguida submetidos à reação de PCR duplex com oligonucleotídeos específicos para o gênero *Corynebacterium* e espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Os DNAs cromossomais extraídos das amostras foram submetidos às condições de ensaio de reação de PCR duplex conforme descritas por Torres *et al.* (2013). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados, os genes alvo e tamanho dos fragmentos por eles amplificados e micro-organismo identificado estão listados no Quadro 1. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo utilizando o sistema fotodocumentador Gel Logic 212 Pro system (CARESTREAM, Science Park West, New Haven, CT 06511 USA). Como controle positivo da reação de PCR duplex foi utilizada a cepa previamente genotipada como *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP102968, gentilmente cedida pelo Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (UFMG). Como controle negativo foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos, genes alvo, tamanho dos amplicons e microorganismos esperados com a genotipagem dos isolados presuntivamente identificados como *Corynebacterium* spp.

Nome	Sequência dos Oligonucleotídeos	Gene Alvo	Amplicon (Pares de bases)	Microrganismo Identificado
16S F 16S R	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG TCTCTACGCCGATCTTGTAT	16S RNAr	816	<i>Corynebacterium</i> ssp.
<i>pld</i> F <i>pld</i> R	ATAAGCTAAGCAGGGAGCA ATCAGCGGTGATTGTCTTCC	<i>pld</i>	203	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>

Fonte: Adaptado de PACHECO *et al.* (2007).

Resultados e discussão

Os onze isolados bacterianos presuntivamente identificados como *C. pseudotuberculosis* e cepas padrão (controles positivos e negativos) apresentaram crescimento característico de cultura pura quando semeados em meio BHI adicionado de ágar a 1,5% após leitura de 24 horas de incubação a 37°C. A figura 1, painel A mostra as características macroscópicas

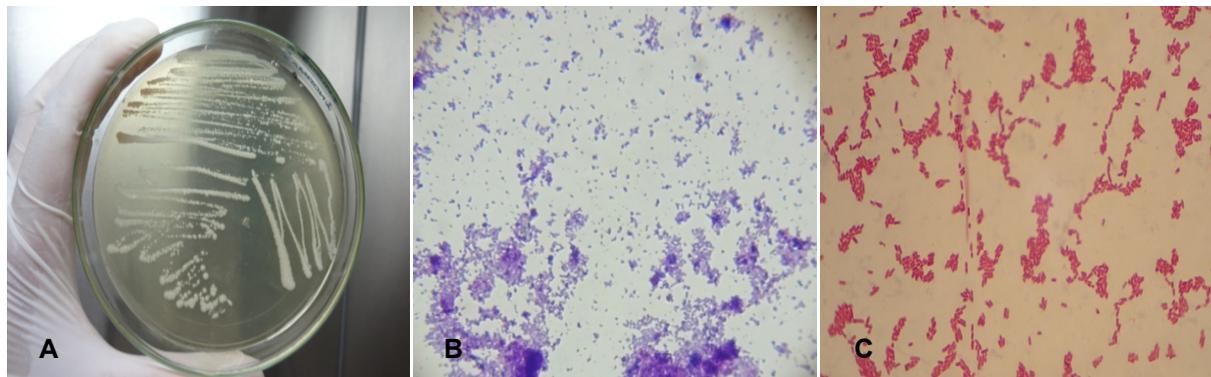
da cepa padrão *C. pseudotuberculosis* semeada em meio BHI adicionado de ágar a 1,5%.

A análise morfológica das colônias oriundas de onze repiques e cepas padrão revelaram se tratar de bacilos Gram positivos (isolados e cepa *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP102968) e bacilos Gram negativos (cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922.) respectivamente. A figura 1, painel B e C mostram

respectivamente a imagem microscópica de células de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

CIP102968 e *E. coli* ATCC® 25922 coradas pelo método de Coloração de GRAM.

Figura 1 - Análise macroscópica e microscópica de colônias dos controles positivo e negativo *C. pseudotuberculosis* CIP 102968 e *E. coli* ATCC® 25922



Legenda: A: *C. pseudotuberculosis* CIP 102968 semeado em Agar BHI a 1,5% pela técnica de esgotamento em alça. B: células *C. pseudotuberculosis* coradas pelo método de Coloração de Gram visualizadas como cocobacilos Gram positivos ao microscópio óptico (aumento de 1000X). C: células *E. coli* coradas pelo método de Coloração de Gram visualizadas como bacilos Gram negativos ao microscópio óptico (aumento de 1000X).

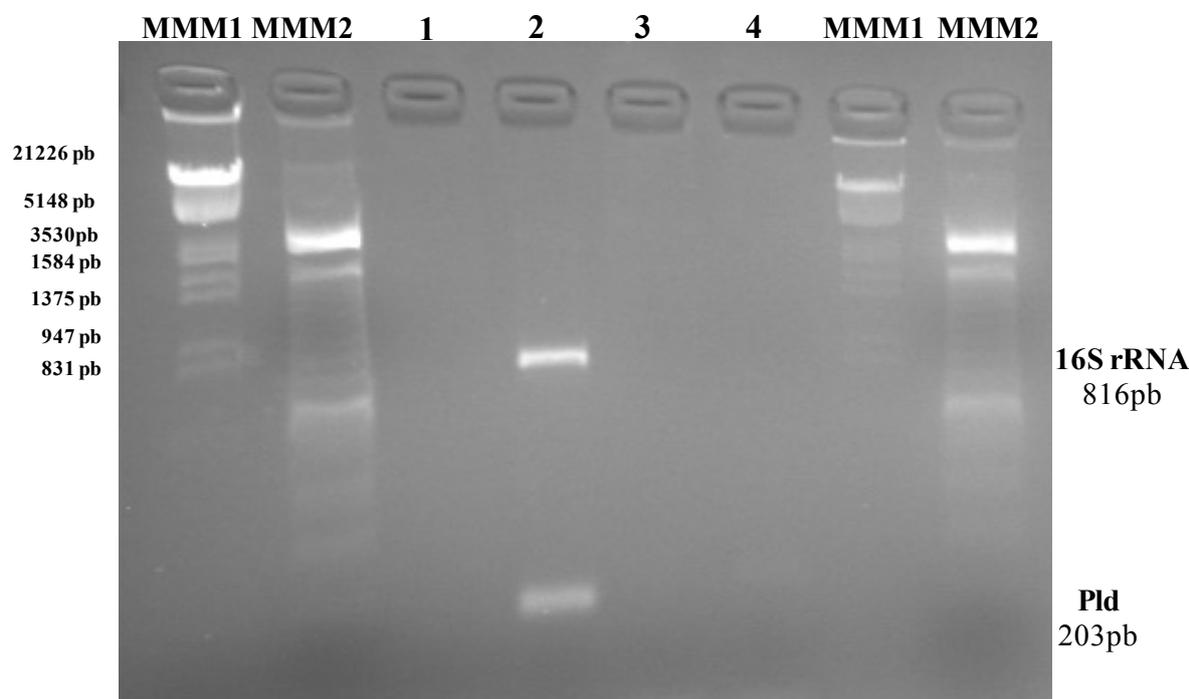
Fonte: Elaboradas pelos autores, 2016.

A identificação presuntiva microbiológica de *C. pseudotuberculosis* pode ser obtida através das suas características morfológicas e de seu crescimento em determinados meios de cultura, graças ao seu padrão de crescimento, auxiliados por provas bioquímicas e pelo padrão de hemólise no ágar sangue (COSTA, 2002). Neste trabalho os onze (11) isolados mantidos em laboratório foram identificados presuntivamente como *C. pseudotuberculosis* baseado nas seguintes características: tipo de amostra característica pelo isolamento da bactéria cultivável em animais com suspeita de linfadenite caseosa; aspecto do crescimento e padrão de hemólise das colônias crescidas em meio ágar-sangue; prova da catalase. Outras características microbiológicas diferenciais para a determinação da espécie *C. pseudotuberculosis* não foram pesquisadas como parte da rotina para identificação presuntiva deste micro-organismo no laboratório onde este trabalho foi realizado. Dentre elas aquelas utilizadas por Ilhan (2013) na identificação presuntiva de *C. pseudotuberculosis*, a saber: Prova da urease, fermentação da glicose, maltose, galactose, mannose, trealose, lactose, arabinose, escolina, salicina, inosito e xylose; motilidade, vermelho metil e redução do nitrato.

Os resultados da análise molecular PCR duplex revelou não haver entre os onze (11) isolados a amplificação esperada dos genes alvo para gênero e ou espécie específico esperado para *C. pseudotuberculosis*, 16S RNA ribossomal e *pld* respectivamente. No entanto, o controle positivo, cepa genotipada de *C. pseudotuberculosis* CIP102968 amplificou os fragmentos de 813 e 201 pares de base correspondente aos genes 16S RNA ribossomal (gênero específico) e *fosfolipase D* (espécie específico) respectivamente (FIGURA 2).

Pacheco et al. (2007) otimizaram a reação de PCR com a cepa padrão *C. pseudotuberculosis* CIP102968 amplificando os mesmos genes marcadores para essa espécie. Além da cepa padrão otimizada por Pacheco et al. (2007) como controle positivo, neste trabalho foi também padronizado como controle negativo a cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922, então não amplificou os genes em questão conforme esperado. A figura 2 mostra o resultado da reação de PCR duplex com os DNAs dos isolados 6,11 e controles positivos e negativos visualizada pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Figura 2 - Resultado da análise molecular de cepas presuntivamente identificadas como *Corynebacterium* spp. Ensaio de PCR duplex para os genes alvo 16S rRNA e *pld* para identificação genotípica de *C. pseudotuberculosis*.



Legenda: Linha 1 - Controle negativo (amplicon do DNA genômico de *Escherichia coli* com os primers 16S rRNA + *pld*); Linha 2 - Controle positivo (amplicon do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* CIP102968 com primers 16S rRNA + *pld*); Linhas 3 e 4 respectivamente os isolados 06 e 11 (amplicons do DNA dos isolados com os primers 16S rRNA + *pld*). MMM1 – Marcador de Massa molecular lâmbda EcoRI/HindIII ; MMM2 – Marcador de Massa Molecular 2- 100 pares de bases.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

Etapas que antecedem a identificação molecular, dentre as quais a coleta das amostras e identificação presuntiva por métodos microbiológicos são pontos críticos que influenciam os resultados desta identificação. O microbiologista tem que ter em mente a expectativa de isolamento de diferentes agentes. Tanto bactérias potencialmente patogênicas como possíveis contaminantes de pele ou mucosas podem ser isoladas, mas o clínico deve estar informado e o teste de sensibilidade poderá ser feito de qualquer destas bactérias (BRASIL, 2013). O diagnóstico da linfadenite caseosa é baseado na sintomatologia clínica como presença de abscessos externos, e a detecção do *C. pseudotuberculosis* no material purulento através da punção dos linfonodos, sendo importante a diferenciação de patógenos oportunistas que podem vir a causar abscessos, como *Arcanobacterium pyogenes* e a *Pasteurella multocida*. Estas podem ser realizadas por meio de isolamento do agente ou PCR (que amplifica sequências específicas do ácido nucléico), a partir de amostras da punção dos linfonodos, bem como amostras de órgãos com presença de lesões caseosas (linfonodos,

pulmão, fígado (NASSAR *et al.*, 2015).

Nassar *et al.* (2015) verificaram a concordância entre metodologias de isolamento microbiológico com a PCR na identificação de *C. pseudotuberculosis* em amostras clínicas colhidas em abatedouros e em animais que apresentavam aumento de linfonodo em condições de campo. Os resultados destes autores mostraram que das 202 amostras analisadas no cultivo microbiológico, 113 (56%) foram identificadas como *Corynebacterium* sp., e 38 (34%) como *C. pseudotuberculosis*. No entanto, o resultado da identificação das amostras por PCR revelou que 110 (54%) foram positivas e 92(46%) negativas para esse gênero e espécie. Os autores afirmam que de acordo com seus resultados o diagnóstico molecular (PCR) provou ser mais eficiente, rápido e com reprodutibilidade quando comparado ao cultivo microbiológico de amostras clínicas, bem como na confirmação do *C. pseudotuberculosis* de colônias pertencentes a este gênero. Como no trabalho de Nassar *et al.* (2015) os resultados da identificação dos isolados de *Corynebacterium* spp. por PCR duplex

obtidos em nosso trabalho revelaram que os isolados presuntivamente identificados como *Corynebacterium* não apresentaram o perfil molecular que os enquadrariam no gênero e ou espécie *C. pseudotuberculosis* (FIGURA 2). Embora neste trabalho não tenha sido investigada a identidade dos microrganismos isolados não identificados como *C. pseudotuberculosis*, a literatura relata a presença de contaminantes em amostras clínicas que poderiam possuir as mesmas características morfológicas e tintoriais (coloração de GRAM), padrão de hemólise e resposta a provas bioquímicas. Espécies como *Arcanobacterium pyogenes* e a *Pasteurella multocida* poderiam estar presentes em abscessos como contaminantes (NASSAR *et al.*, 2015).

O diagnóstico da linfadenite caseosa apresenta muitos problemas. A apalpação de linfonodos não é confiável, uma vez que não detecta os estágios iniciais da infecção, mas somente aqueles casos onde os linfonodos os outros órgãos estão profundamente comprometidos (ILHAN, 2013). Os métodos comumente usados como diagnóstico para detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais são as técnicas de cultura bacteriológica e ensaios sorológicos. O *C. pseudotuberculosis* é de crescimento relativamente demorado em meios de cultura bacteriológicos. A recuperação e identificação deste agente em diferentes amostras clínicas por métodos microbiológicos tradicionais, leva cerca de 3 a 5 dias. Além disso, somente amostras viáveis cultiváveis podem ser detectadas. Vários testes sorológicos têm sido utilizados para detecção de *C. pseudotuberculosis* apresentado resultados variáveis. Anticorpos séricos contra *C. pseudotuberculosis* podem ser detectados por reações de inibição de hemólise, inibição de anti-hemolisina, hemaglutinação indireta, reação de fixação do complemento, precipitação em gel de difusão, testes de aglutinação e várias técnicas de ELISA. Embora os testes sorológicos apresentem rapidez na execução, os mesmos não possuem robusta sensibilidade e especificidade, além disso muitos deles são de difícil padronização, especialmente aqueles baseados em hemolises (REBOUÇAS *et al.*, 2011).

A ausência de características clínicas associado aos inconveniências ocorridas nos métodos microbiológicos e sorológicos enfatizam a necessidade do desenvolvimento de metodologias alternativas para detecção de *C. pseudotuberculosis* em amostras clínicas dentre

as quais isolados de linfonodos (CETINKAYA *et al.*, 2002). Técnicas de diagnóstico baseadas em PCR vem de encontro com a necessidade de melhoria nas ferramentas diagnósticas para doenças infecciosas causadas por bactérias fastidiosas ou de crescimento demorado (ILHAM, 2013; PACHECO *et al.*, 2007) dentre as quais a linfadenite caseosa.

A LC é considerada endêmica no Brasil, com prevalência clínica em aproximadamente 30% dos animais. As afecções causadas por *C. pseudotuberculosis* em animais de produção provocam grandes prejuízos aos produtores, que incluem a depreciação da pele e lã, redução na produção de carne e leite em ruminantes, indisponibilidade para o exercício ou treinamento em equinos e morte ocasional de animais com disseminação sistêmica do organismo. O diagnóstico clínico da LC por apalpação é dependente do estágio de infecção da doença. O diagnóstico laboratorial baseado em métodos microbiológicos são demorados e os sorológicos nem sempre sensíveis e específicos.

Neste sentido, o desenvolvimento de técnicas rápidas, sensíveis e específicas aplicadas ao diagnóstico de doenças humanas e ou outros animais causadas por espécies de *Corynebacterium* são desejáveis. Técnicas baseadas na identificação de microrganismos por métodos moleculares, dentre os quais PCR e PCR duplex e multiplex tem sido amplamente utilizadas para o diagnóstico rápido, sensível e específico de agentes causadores de doenças parasitárias. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a necessidade de melhoria nas técnicas de coleta e identificação microbiológicas padrão das amostras uma vez que estas antecedem a etapa de identificação molecular e são de extrema importância a correta identificação genotípica das cepas de *C. pseudotuberculosis*. Além disso outras provas bioquímicas poderiam ter sido realizadas aumentando a especificidade do método microbiológico tradicional de identificação aqui utilizado. Essa informação é de importância tanto na definição do agente etiológico causador da doença ali estabelecida (diagnóstico) quanto na perspectiva de utilização da cepa para produção de uma vacina contra linfadenite caseosa.

Comitê de Ética

Este trabalho esteve de acordo com os

princípios éticos da experimentação animal para coleta de material nos animais, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, com o protocolo 160/2007.

Ao laboratório de Biotecnologia da UFMG e ao laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da Unimontes pela infraestrutura, suporte técnico e custeio deste trabalho. Ao programa de Pós-graduação em Produção Animal da UFMG, Campus Montes Claros.

Agradecimentos

Referências

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. – Brasília: ANVISA, 2013. 149p.
- CETINKAYA, B. *et al.* Identification of *Corynebacterium pseudo-tuberculosis* isolated from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, Turkey, v. 88, p. 75-83, 2002.
- COSTA, L. F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.1, n.1. p.105-115, 2002.
- ILHAN, Z. Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Turkey, v.164, n. 2, p. 60-66, 2013.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *ropB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal Clinical Microbiology**, France, v.42, p. 3925-3931, 2004.
- KURIA, J. K. N. *et al.* Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. **Veterinary Research Communication**, Kenia, v. 25, p. 89-97, 2001.
- NASSAR, A. F. C. *et al.* Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-6, 2015.
- PACHECO, L. G. C. *et al.* Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure culture and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal Medical Microbiology**, Belo Horizonte, v. 56, p. 480-486, 2007.
- REBOUÇAS, M.F. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: Potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Salvador, v. 23, p. 213-220, 2011.
- TORRES, L.F.C. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013.
- WAGNER, K.S. *et al.* Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007-2008: a multicentre European study. **Clinical Microbial Infection**, London, v. 17, p. 519-525, 2011.