

Avaliação hematológica em caprinos experimentalmente infectados com cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, produtoras ou não de biofilme

Haematological evaluation in goats experimentally infected with biofilm-producing or non-biofilm-producing strains of Corynebacterium pseudotuberculosis

Maria da Conceição Aquino de Sá^{1*}, José Tadeu Raynal², Ricardo Wagner Dias Portela³, Franciane Santos Marques⁴, Mateus Matiuuzzi da Costa⁵, Roberto Meyer⁶

¹Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia, zootecnista e bióloga; ²Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia, Médico Veterinário, Pesquisador no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia; ³Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, Médico Veterinário, Professor Adjunto na Universidade Federal da Bahia; ⁴Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela FIOCRUZ, Biomédica, Professora Associada da Universidade Federal da Bahia; ⁵Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Médico Veterinário, Professor Adjunto na Universidade Federal do Vale do São Francisco; ⁶Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, Médico, Professor Titular na Universidade Federal da Bahia.

Resumo

Introdução: A caprinocultura é um importante segmento no agronegócio. Porém existem alguns entraves na produção que causam graves prejuízos, dentre eles patógenos responsáveis por doenças persistentes, tais como o *C. pseudotuberculosis* – agente etiológico da linfadenite caseosa. **Objetivo:** Com o objetivo de analisar a cinética hematológica de caprinos (*Capra hircus*) infectados com a bactéria. **Metodologia:** 18 caprinos da raça Canindé foram divididos em três grupos, sendo um grupo controle (sem infecção) e dois grupos infectados, um com uma cepa de *C. pseudotuberculosis* produtora de biofilme, e outro grupo com uma cepa não produtora de biofilme. Antes da infecção, foram coletados 4 mL de sangue para realização do hemograma. Após a infecção dos animais, foram realizadas coletas de sangue e exames clínicos nos tempos 7, 14, 28, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a infecção. **Resultados:** Para as condições de infecção experimental, foram comprovados picos de haptoglobina na infecção aguda, bem como os valores dos hemogramas, no início da infecção. **Conclusão:** No entanto, foi observada a elevação do número de leucócitos, com aproximação do valor máximo de referência nas fases agudas, e as taxas, posteriormente voltaram aos parâmetros dentro da normalidade, na fase crônica da infecção.

Palavras-chave: *Capra hircus* biofilme; *corynebacterium*; *pseudotuberculosis*; hemograma; infecção experimental.

Abstract

Introduction: goat farming is an essential segment of agribusiness. However, some obstacles in production cause severe losses, among them pathogens responsible for persistent diseases, such as *C. pseudotuberculosis* - the etiological agent of caseous lymphadenitis.

Objective: to analyse the haematological kinetics of goats (*Capra hircus*) infected with the bacteria. **Methodology:** 18 Canindé goats were divided into three groups: a control group (without infection) and two infected groups, one with a biofilm-producing strain of *C. pseudotuberculosis*, and the other with a non-biofilm-producing strain. Before infection, 4 mL of blood were collected for blood count. After infection of the animals, blood samples and clinical examinations were performed at 7, 14, 28, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 days post-infection. **Results:** for the experimental infection conditions, haptoglobin peaks were observed in the acute infection and blood count values at the beginning of the infection. **Conclusions:** however, an increase in the number of leukocytes was observed, approaching the maximum reference value in the acute phases and the rates later returning to parameters within normal limits in the chronic phase of the infection.

Keywords: *Capra hircus*; biofilm; *corynebacterium pseudotuberculosis*; blood count; experimental infection.

Introdução

A produção de caprinos é importante em vários países e, expressivamente, no Brasil. Embora a produção desses animais esteja em expansão, doenças infecto-

contagiosas, como a linfadenite caseosa, reduzem a produtividade desses animais¹⁻³. Para manter o rebanho saudável, é necessário um acompanhamento rigoroso dos animais, através de exames clínicos, laboratoriais e de imagem. Desse modo, de acordo com Ndoutamia, Ganda⁴ (2005), a hematologia clínica é importante área de estudo sobre o estado sanitário dos animais. Porém o hemograma necessita de adequada interpretação, bem

Corresponding / Correspondente: Maria da Conceição Aquino de Sá^{1*}. – Endereço: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, CEP 40110-902, Salvador, BA, Brasil. – E-mail: ceicazoo@hotmail.com.

como é necessário analisar a influência de vários fatores, como condições climáticas e ambientais, além das variáveis intrínsecas ao animal, como sexo, raça, idade, gestação e lactação.

Na infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa, são desenvolvidos granulomas com estrutura celular complexa, revelando infiltrados de células epitelioides, macrófagos, neutrófilos e linfócitos⁵. Outra consequência da infecção é o aumento da concentração sérica de proteínas de fase aguda, a exemplo da haptoglobina, principal proteína desse tipo em ruminantes, que é importante biomarcador precoce de processos inflamatórios, infecciosos e de estresse⁶.

C. pseudotuberculosis possui diversas características de virulência, como um biofilme que confere proteção à bactéria em ambientes hostis, favorecendo sua sobrevivência através de mecanismos de escape imunológico^{7,8}. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, através de exames clínicos e laboratoriais (hemograma e dosagem sérica de haptoglobina), caprinos infectados e não infectados por *C. pseudotuberculosis*, comparando a infecção experimental por cepa produtora e cepa não produtora de biofilme.

METODOLOGIA

Esse experimento foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEUA, ICS), sob o número 123/2017. Foi realizado em uma estação experimental de criação de pequenos ruminantes, localizada na latitude 12°52'16" e longitude 38°45'52", clima tropical úmido e temperatura média de 30°C.

Foram selecionadas duas cepas de *C. pseudotuberculosis*, provenientes de caprinos: uma delas forte produtora de biofilme, CAPJ4 (76), e outra não produtora de biofilme em condições *in vitro*, CAP3W (21). Os genomas das duas cepas foram completamente sequenciados e estão disponíveis no GenBank, com números de acesso CP026499 e CP026500, respectivamente. As cepas foram cultivadas em 200 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 48 horas, em estufa a 37 °C. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 6000 rpm, desprezando-se o sobrenadante e acrescentando-se 10 mL de solução salina estéril para ressuspensão do *pellet*. Em seguida, foi retirado 1 mL das culturas bacterianas e ressuspensas duas vezes com solução salina, com posterior centrifugação por 5 minutos a 5.000 rpm. Depois de desprezar o sobrenadante, foi adicionado *Sybr Safe* (Invitrogen), corante para marcar as células bacterianas, o qual foi diluído 1:20 e incubado por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Então, foi realizada nova lavagem para remoção do reagente, e o *pellet* foi ressuspensionado com 1 mL de solução salina. Em seguida, foram retirados 50 µL da suspensão bacteriana, acrescida de 450 µL de solução salina, em tubos com *Beads trucount* (BD Biosciences) para realizar a contagem do inóculo por

mensuração em citometria de fluxo. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: bactérias totais = n° eventos bactérias / n° eventos *beads* x n° de *beads* por µL (constante no lote)⁹.

Foram utilizados, no experimento, 18 caprinos da raça Canindé, com idade média de seis meses. Durante o período experimental, os caprinos foram alimentados com feno de gramíneas, além de suplementação mineral e proteica, e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em três grupos. O grupo 1 (controle, n=6) foi composto por animais inoculados apenas com solução salina 0,9%. No grupo 2 (n=6), foram incluídos caprinos inoculados com a cepa negativa para produção de biofilme (21). O grupo 3 (n=6) foi composto por animais inoculados com a cepa produtora de biofilme (76). A inoculação dos animais foi realizada com 1 mL de solução salina contendo 2 x 10⁶ UFC de *C. pseudotuberculosis*. Todas as inoculações foram realizadas por via subcutânea, na região pré-escapular direita do animal.

O hemograma foi realizado nos tempos zero (antes da inoculação), 7,14, 28, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a inoculação, de forma automatizada, utilizando-se 2 mL de sangue por animal. Nesse exame, foram avaliados: contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos basófilos, e posterior determinação de índices hematimétricos. A cada coleta de sangue, os animais foram examinados clinicamente.

A concentração de haptoglobina sérica foi estimada com base em sua capacidade de ligação à hemoglobina¹⁰.

Foi realizado exame parasitológico dos animais para avaliar se ocorreu alguma parasitose gastrointestinal que pudesse interferir no experimento. Para a realização da técnica, contagem de ovos por grama de fezes (OPG), foram utilizadas cerca de 2 gramas de fezes dos caprinos, diluídas em solução hipersaturada de sal (58mL), verificando-se a densidade necessária para a flutuação dos ovos. Aguardou-se dois minutos para os ovos flutuarem na câmara de McMaster, e, assim, poder dar início à contagem dos ovos do parasito contidos nas áreas delimitadas da câmara, com auxílio do microscópio óptico (objetiva de 10)^{11,12}.

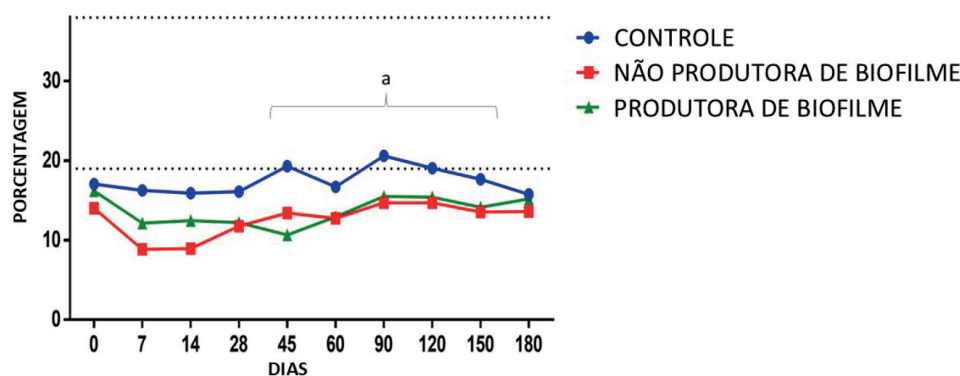
Para a análise dos dados, foi utilizado o GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Precedendo qualquer análise estatística, foi realizado o teste de Grubb, para detecção de *outlier* por grupo de variáveis estudadas. Na análise estatística dos dados, foi utilizado, inicialmente, o teste de normalidade (Pearson Omnibus) para avaliar o tipo de distribuição dos dados. Em seguida, para os dados com distribuição normal, foram utilizados testes paramétricos ANOVA. Quando não se observou padrão de normalidade, foram utilizados testes não paramétricos Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando p < 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentaram abscessos nos locais de inoculação. Dentre os resultados aqui alcançados, algumas variáveis chamam atenção por representarem comportamento diferente dentro dos parâmetros do hemograma. Entretanto, o acompanhamento clínico dos animais pôde explicar esses resultados. É importante observar que os parâmetros hematológicos podem variar muito de acordo com o estado de saúde do animal e de acordo com variáveis, como condições climáticas e ambientais. Mais especificamente, estado nutricional, gestação, lactação, manejo, raça, sexo e idade influenciam no resultado do hemograma⁴.

Em relação ao resultado dos hematócritos apresentado na Figura 1, observou-se diferença estatística pós-inoculação (PI) no grupo controle, em relação ao grupo infectado com a cepa 21 (não produtora de biofilme). Existe aumento dos hematócritos em 45, 90, 120 e 150 dias PI. Esses resultados confirmam os achados de Oliveira et al.¹³ (2012), que analisaram caprinos da mesma raça (Canindé), e observaram uma média de $32,15 \pm 5,16$. Ao longo de todo o experimento o hematócrito dos animais se manteve abaixo ou pouco acima do limite inferior do valor de referência, o que pode ser provocado por um processo infeccioso.

Figura 1 – Perfil do hematócrito observado ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle no teste estatístico ANOVA, com $p < 0,05$. Linhas pontilhadas representam o valor de referência.

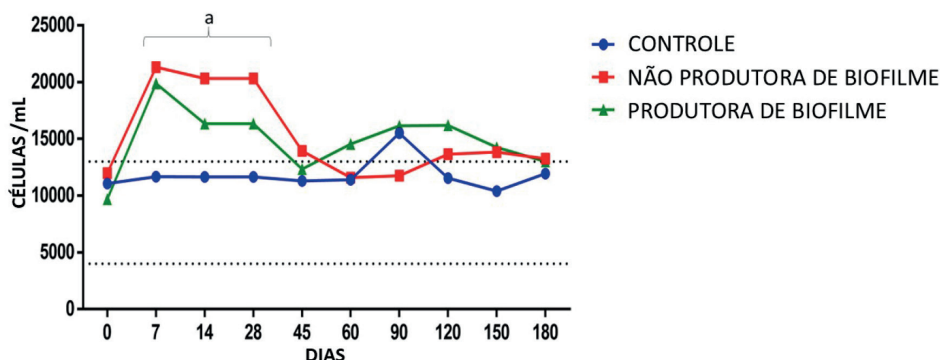


Fonte: Jain¹⁴ (1993)

Na Figura 2, está apresentado o perfil de leucócitos totais, existindo um aumento dos leucócitos nos grupos infectados nos tempos 7, 14 e 28, em um quadro de infecção aguda. Quanto ao aumento de leucócitos totais, demonstrado com diferença estatística de ambos os grupos experimentais em relação ao grupo controle, é

possível observar o que naturalmente acontece com caprinos infectados por bactérias, pois aumenta a contagem de neutrófilos, monócitos e outras células do sistema leucocitário. Na infecção por *C. pseudotuberculosis*, foi observado um aumento significativo na maioria desses parâmetros¹⁵.

Figura 2 – Perfil de leucócitos totais observados ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle, no teste ANOVA, com $p < 0,05$. Linhas pontilhadas representam o valor de referência.

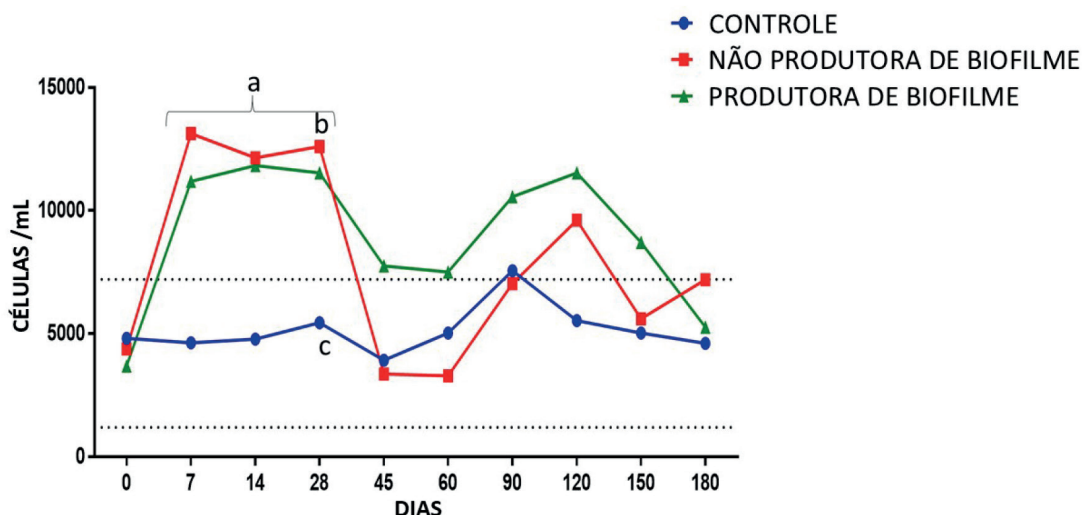


Fonte: Jain¹⁴ (1993)

Foi observada diferença estatística para os tempos 7, 14 e 28. Os grupos infectados apresentaram uma neutrofilia, e foi observada diferença estatística em relação ao grupo controle. Esse fato já é bem descrito na literatura, pois animais infectados com microrganismos bacterianos

têm um aumento substancial de neutrófilos na infecção aguda, por essas serem as primeiras células sanguíneas recrutadas pelo sistema imunológico inato para defesa do hospedeiro^{16,17}.

Figura 3 – Perfil de neutrófilos observado ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística significativa, segundo o teste de ANOVA, com $p < 0,05$. Entre “b” e “c” - $p < 0,05$. Linhas pontilhadas representam o valor de referência.



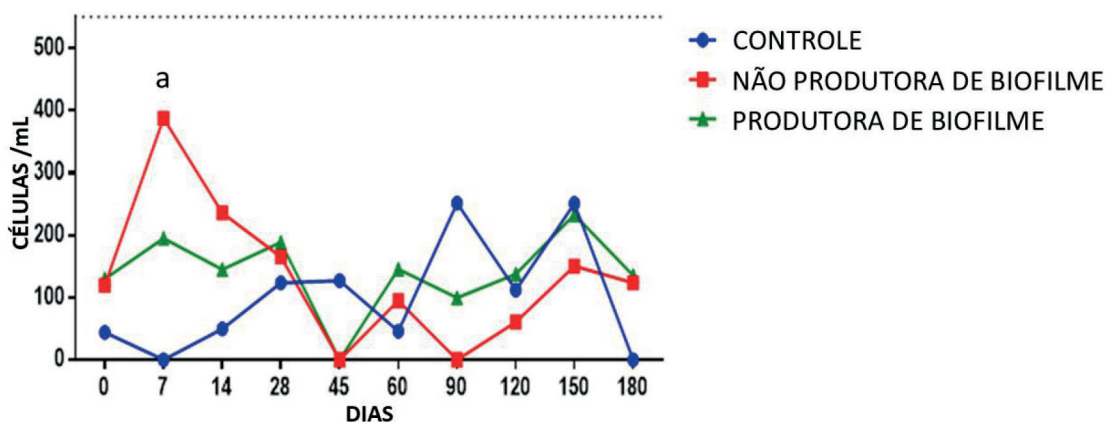
Fonte: Jain¹⁴ (1993)

Na contagem de linfócitos, não houve diferença significativa entre os grupos, e os valores permaneceram dentro do *range* de normalidade para animais com infecção bacteriana. No tempo 90 dias, observa-se uma queda nos linfócitos dos grupos infectados e uma maior quantidade de linfócitos no grupo controle, bem como, no tempo 120, os linfócitos dos animais infectados diminuíram um pouco mais, para, em seguida, aumentarem no tempo 150 dias. Esses valores estão de acordo com os encontrados por Oliveira *et al.*¹³ (2012), que pesquisaram caprinos saudáveis da mesma raça que os animais deste estudo. Também com os valores encontrados por Odhah *et al.*¹⁷ (2017), que utilizaram cabras infectadas e descreveram que esses resultados são relacionados à patologia causada pelo *C. pseudotuberculosis*, ou por resposta do hospedeiro a esse patógeno, pois infecções agudas bacterianas são geralmente associadas à neutrofilia, enquanto

as infecções crônicas podem levar à linfocitose.

Na Figura 4, estão apresentados os valores encontrados para monócitos. Observou-se maior quantidade de células nas amostras de sangue dos animais incluídos nos grupos infectados, com significância estatística. Esse resultado também foi encontrado por Mahmood *et al.*¹⁶ (2015), que desafiaram caprinos com *C. pseudotuberculosis* e a exotoxina PLD, e observaram alterações significativas para leucócitos totais, devido ao aumento de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Já na infecção crônica, os monócitos circulantes são recrutados para a área da inflamação, transformando-se em macrófagos teciduais. Esse mecanismo acontece por ativação de células T, que vão produzir citocinas, tais como o IFN-gama. Essas citocinas são essenciais para que os macrófagos possam desempenhar suas funções de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa¹⁸.

Figura 4 – Perfil de monócitos observado ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente como *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle no teste de ANOVA, com $p < 0,05$. Linhas pontilhadas representam o valor de referência.

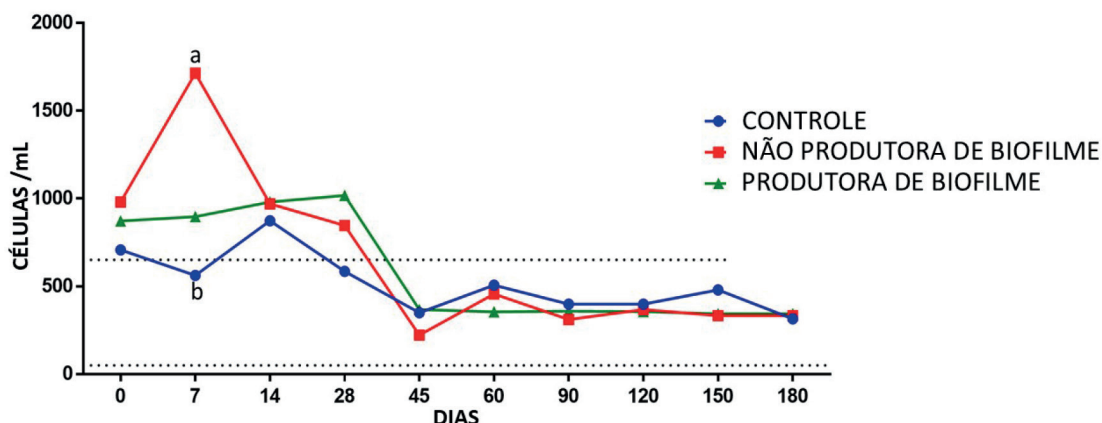


Fonte: Jain¹⁴ (1993)

Observando a Figura 5, podemos verificar que os eosinófilos apresentaram uma diferença estatística entre o tempo 7 do grupo infectado com a cepa 21 e o grupo controle do mesmo tempo. Esse resultado pode ser explicado através da avaliação parasitológica realizada em todos os tempos. Quando se analisou a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais do grupo infectado com a cepa não produtora de biofilme, observou-se que um animal continha ovos de *Haemonchus contortus* e do gênero *Eimeria*, o que foi correlacionado com maior

quantidade na contagem de eosinófilos para esse animal, pois os eosinófilos desempenham importante papel parasiticida¹⁹. Outra alteração observada foi a diarreia provocada pela introdução de alimento concentrado na dieta desses animais até a sua adaptação, o que mostra que, no tempo zero, todos os animais possuíam uma quantidade de eosinófilos um pouco acima dos parâmetros. Depois desse período de adaptação, os valores foram se estabilizando até níveis normais^{11,13}.

Figura 5 – Perfil de eosinófilos observado ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística significativa, segundo o teste de ANOVA, com $p < 0,06$. Entre "a" e "b" - $p < 0,05$. Linhas pontilhadas representam o valor de referência.



Fonte: Jain¹⁴ (1993)

Na Figura 6, observa-se o perfil de células basófilas. Existe um aumento dessas células na infecção aguda nos tempos 7 e 14, porém o maior aumento na contagem acontece no tempo 90, e ambas apresentam diferença

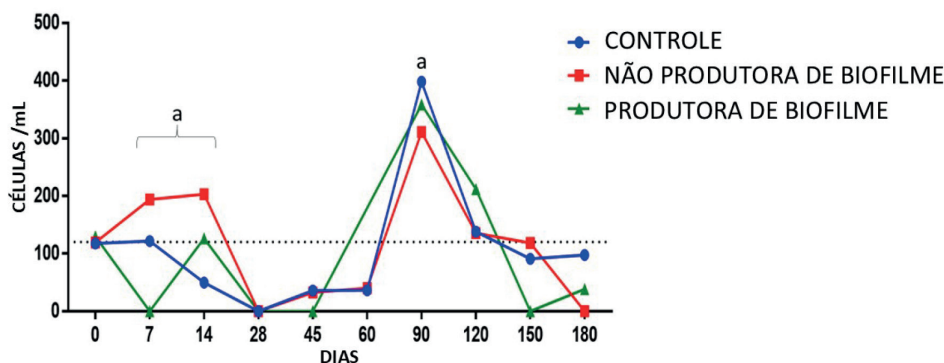
estatística. Esses resultados não são concordantes com os descritos por Ibtisam¹⁵ (2008), segundo os quais, durante infecção de *C. pseudotuberculosis*, não foram encontradas diferenças significativas em contagem de basófilos.

Porém esse resultado está de acordo com o de Mahmood *et al.*¹⁶ (2015), que infectaram caprinos com a mesma bactéria. O aumento significativo de basófilos na infecção crônica é mediado por resposta imune celular²⁰. Contudo, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos a partir do decimo quarto dia do experimento.

Em relação à cinética da produção de haptoglobina durante a resposta de fase aguda, foi observado que houve uma alta produção dessa proteína no período pós-inoculação (Figura 7), mostrando diferença significativa

entre os animais do grupo controle e os animais infectados com o *C. pseudotuberculosis*. Esse resultado mostra que a haptoglobina é um biomarcador para diferenciar infecções agudas e crônicas⁶. Tal parâmetro é de extrema importância para mensurar a fase aguda da doença, que pode ser de fundo parasitológico, bacteriológico, ou qualquer outra enfermidade. E esses valores também foram encontrados por Jeber *et al.*²¹ (2016), que trabalharam com caprinos Boer inoculados com fosfolipase D derivada de *C. pseudotuberculosis*.

Figura 6 – Perfil de basófilos observado ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle de acordo com o teste ANOVA, com $p < 0,05$. Linhas pontilhadas representam o valor de referência.

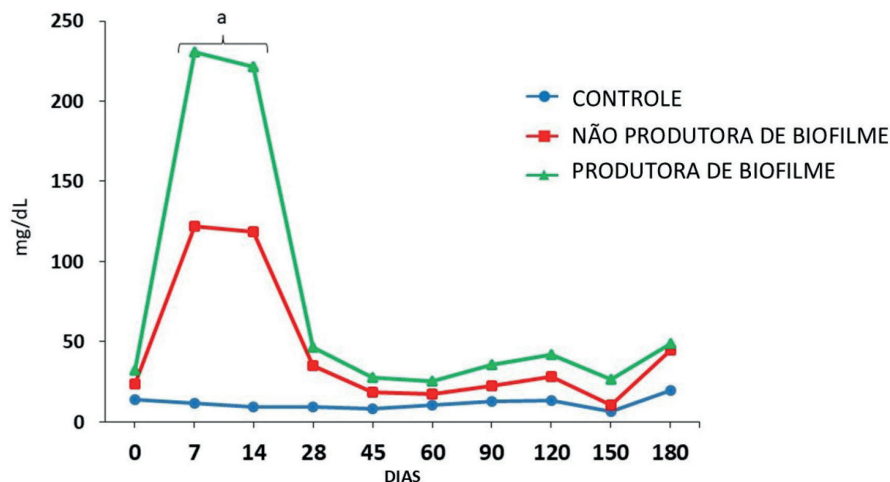


Fonte: Jain¹⁴ (1993)

As proteínas de fase aguda, como a haptoglobina, são moléculas de defesa do mecanismo da imunidade inata, e, na fase aguda da infecção, aumentam em magnitude maior que 25%, valor que concorda com o do trabalho em questão. A haptoglobina atua para restaurar a homeosta-

se no corpo do animal, principalmente desencadeando a produção de citocinas, bem como o aumento de neutrófilos e de macrófagos²². Foi observada diferença estatística de ambos os grupos experimentais em relação ao grupo controle, no início da infecção, corroborando a literatura.

Figura 7 – Perfil de haptoglobina sérica observado ao longo de 180 dias em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*. Grupo controle (n=6), sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; e Grupo 76 (n=4), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle no teste de ANOVA, com $p < 0,05$.



Fonte: autoria própria

Assim, a haptoglobina pode ser considerada uma importante candidata para o monitoramento de doenças subclínicas, como é o caso da linfadenite caseosa, pois ocorre uma resposta de fase aguda clássica com alta produção hepática de haptoglobina, e sua secreção na circulação sanguínea, mesmo antes das alterações no leucograma e da expressão de sinais clínicos^{6,23}.

CONCLUSÃO

Em relação aos dados clínicos dos animais, foi possível observar a presença de lesões em todos os animais infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*. Com os resultados dos exames hematológicos e dosagem de haptoglobina, foi possível observar diferença estatística dos grupos experimentais em relação ao grupo controle no início da infecção. E ainda foi possível observar diferenças significativas entre os grupos a partir do quadragésimo quinto dia de infecção. Assim, essas dosagens podem auxiliar no diagnóstico da infecção na fase aguda.

REFERÊNCIAS

1. Andrade JSL, Azevedo SS, Teles JAA, Higino SS, Azevedo EO. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. *Pesq Vet Bras.* 2012;32(2):116-20. doi: 10.1590/S0100-736X2012000200004
2. Baird GJ, Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Pathol.* 2007;137(4):179-210. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.07.002
3. Souza MF, Carvalho AQ, Garino Junior F, Riet-Correa F. Linfadenite caseosa em ovinos deslançados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesq Vet Bras.* 2011;31(3):224-30. doi: 10.1590/S0100-736X2011000300007
4. Ndoutamia GA, Ganda K. Determination des paramètres hematologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad. *Rev Med Vet.* 2005;156(4):202-6.
5. Moura-Costa LF de. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2002;1:105-15. doi: 10.9771/cmbio.v1i1.4248
6. Bastos BL, Rocha-Filho JTR, Santana IP, Meyer R, Guimarães JE. Aplicabilidade da proteína haptoglobina como bioindicador de saúde na bovinocultura de corte e leite. *PUBVET.* 2018;12(3):1-13. doi:10.22256/pubvet.v12n3a48.1-13
7. Clary G, Sasindran SJ, Nesbitt N, Mason L, Cole S, Azad A, et al. *Mycobacterium abscessus* Smooth And Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes But Are Killed by Acetic Acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(3):01782-17. doi: 10.1128/AAC.01782-17
8. Forestier C, Billard E, Milon G, Gueirard P. Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. *Front Microbiol.* 2017;8(2309):1-7. doi: 10.3389/fmicb.2017.02309

9. Sampaio GP. Padronização de técnicas por citometria de fluxo para avaliar *Corynebacterium pseudotuberculosis* células fagocitárias murinas. *Pubvet.* 2019;13(11). doi: 10.31533/pubvet.v13n11a443.1-9
10. Bastos BL, Loureiro D, Raynal JT, Guedes MT, Vale VLC, Moura-Costa LF, et al. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. *BMC Vet Res.* 2013;9:254. doi: 10.1186/1746-6148-9-254
11. Gordon HMCL, Whitlock, HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Council Scientific Industrial Res.* 1939;12(1):50-2. doi: http://hdl.handle.net/102.100.100/339340?index=1
12. Whitlock HV. Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. *J Council Scientific Industrial Res.* 1948;21:177-80.
13. Oliveira, MGC, Nunes TL, Paiva ALC, Bezerra TCG, Fernandes NS, Vale AM, et al. Aspectos hematológicos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no Rio Grande do Norte. *Pesq Vet Bras.* 2012;32:4-8. doi: 10.1590/S0100-736X2012001300002
14. Jain N.C. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. 417 p.
15. Ibtisam MA. Some clinicopathological and pathological studies of *C. ovis* infection in sheep. *Egyptain J Comparative Pathol Clin Pathol.* 2008;21:327-43.
16. Mahmood ZKH, Jesse FF, Saharee AA, Jasni S, Yusoff R, Wahid H., et al. Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. *Vet World.* 2015;8(9):1105-17. doi: 10.14202/vetworld.2015.1105-1117
17. Odhah, MN, Abdullah FFJ, Wahid Haron A, MAM Lila, Zamri-Saad M, Khuder Z, et al. Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. *Vet World.* 2017;10(6):655-61. doi: 10.14202/vetworld.2017.655-61
18. Geissmann, F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19,(1):71-82. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00174-2
19. Souza C, Lopes STA, Batina PN, Cecim M. Estresse parasitário em cabras Saanen: avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. *Veterinária Notícias,* 2006;12(2):17-23.
20. Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(6):814-20. doi: 10.1016/j.coi.2010.10.018
21. Jeber ZKH, MohdJin Z, Firdaus F. Influence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on level of acute phase proteins in goats. *BMC Vet Res.* 2016;12(48):1-5. doi: 10.1186/s12917-016-0675-y
22. Abdullah FFJ, Osman AY, Adamu L, Zacaria Z, Abdullah R, Saare AA, et al. Acute phase protein profiles in calves following infection with whole cell, lipopolysaccharide and outer membrane protein extracted from *Pasteurella multocida* type B: 2. *J Ani Vet Adv.* 2013;8(4):655-62. doi: 10.3923/ajava.2013.655.662
23. Cecilian F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics.* 2012;75(14):4207-31. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.004

Submetido em: 09/15/2024

Aceito em: 03/09/2024