

## **Distribuição das subpopulações de linfócitos de caprinos experimentalmente infectados com as linhagens selvagem VD57 e atenuada T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta aos antígenos secretados (TPP E MQD) da linhagem atenuada**

Distribution of lymphocyte subpopulations of goats experimentally infected with wild lineages VD57 and attenuated T1 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to secret antigens (TPP and MQD) from the attenuated lineage

Distribución de subpoblaciones de linfocitos de cabras experimentalmente infectadas con linajes silvestres VD57 y T1 atenuado de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en respuesta a antígenos secretos (TPP y MQD) del linaje atenuado

Recebido: 07/22/2022 | Revisado: 08/02/2022 | Aceito: 08/11/2022 | Publicado: 08/20/2022

### **Inara Barbosa de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5778-5687>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [inaraoliveira@yahoo.com.br](mailto:inaraoliveira@yahoo.com.br)

### **Vera Vale**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4055-5049>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [vcostavale@gmail.com](mailto:vcostavale@gmail.com)

### **Marcos Da Costa Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3809-0297>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [macosil@gmail.com](mailto:macosil@gmail.com)

### **Lília Moura-Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0462-3195>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [lmouracosta@gmail.com](mailto:lmouracosta@gmail.com)

### **Andreia Pacheco De Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0335-5264>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [andreia.pachecosouza@yahoo.com.br](mailto:andreia.pachecosouza@yahoo.com.br)

### **Heidiane Alves dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3444-8738>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [heidysantos@gmail.com](mailto:heidysantos@gmail.com)

### **Andressa Souza Marques**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4332-9079>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [andressamarques.biotec@gmail.com](mailto:andressamarques.biotec@gmail.com)

### **José Tadeu Raynal Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2771-0235>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [jtraynal@hotmail.com](mailto:jtraynal@hotmail.com)

### **Soraya Castro Trindade**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7125-9114>  
Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil  
E-mail: [soraya.castrotrindade@gmail.com](mailto:soraya.castrotrindade@gmail.com)

### **Roberto Meyer**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4727-4805>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: [meyer.roberto@gmail.com](mailto:meyer.roberto@gmail.com)

### Resumo

A linfadenite caseosa, é uma doença crônica infecciosa de pequenos ruminantes, caprinos e ovinos, causadora de grandes perdas econômicas, caracterizada pela formação de granulomas subcutâneos e em órgãos internos cujo agente etiológico é *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacilo Gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de fagócitos, relacionados filogeneticamente com *Mycobacterium tuberculosis*. Este trabalho teve como objetivo avaliar “*in vitro*” os fenótipos das subpopulações de células da linhagem leucocitária do sangue periférico de caprinos experimentalmente infectados com as linhagens T1 e VD57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sendo as células estimuladas com antígenos secretados/excretados da linhagem T1 utilizando como ferramenta a técnica de citometria de fluxo. A expressão de células CD4 é maior nos animais infectados com a linhagem VD57 sob os dois estímulos antigênicos TPP e MQD. A expressão de células com marcação para CD8 é maior no grupo de animais infectados com a linhagem T1 para os dois estímulos com o aumento da expressão ao longo do tempo. Para o marcador CD21 houve maior expressão no grupo de animais infectados com a linhagem T1, entretanto no grupo de animais infectados com a linhagem VD57 ocorreu expressão significativa aos 60 dias de infecção. Não houve diferença no índice de proliferação de células TCR $\gamma\delta$  sob o estímulo dos dois antígenos no grupo infectado com T1, enquanto que no grupo infectado com a linhagem VD57 o antígeno TPP teve maior índice de proliferação aos 60 dias de infecção. Pode-se observar que houve diferenças expressão do fenótipo celular em células do sangue periférico dos animais infectados com as linhagens T1 e VD57 e estimulados com os antígenos secretados TPP e MQD, entretanto o antígeno TPP mostrou-se maior indutor de proliferação celular. Ambas as linhagens demonstraram índices significativos na proliferação de células.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Caprinos; Ovinos; Citometria de fluxo.

### Abstract

Caseous lymphadenitis is a chronic infectious disease of small ruminants, goats and sheep, causing great economic losses, characterized by the formation of subcutaneous granulomas and in internal organs whose etiologic agent is *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Gram-positive bacillus, and facultative intracellular pathogen of phagocytes. , phylogenetically related to *Mycobacterium tuberculosis*. This study aimed to evaluate "in vitro" the phenotypes of subpopulations of cells of the peripheral blood leukocyte lineage of goats experimentally infected with the T1 and VD57 strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, being the cells stimulated with secreted/excreted antigens of the T1 strain using as tool the flow cytometry technique. The expression of CD4 cells is higher in animals infected with the VD57 lineage under both TPP and MQD antigenic stimuli. The expression of CD8-labeled cells is higher in the group of animals infected with the T1 lineage for both stimuli with increasing expression over time. For the CD21 marker there was greater expression in the group of animals infected with the T1 lineage, however in the group of animals infected with the VD57 lineage there was significant expression at 60 days of infection. There was no difference in the proliferation index of TCR $\gamma\delta$  cells under the stimulus of the two antigens in the group infected with T1, while in the group infected with the VD57 lineage; the TPP antigen had a higher proliferation index at 60 days of infection. It can be observed that there were differences in the expression of the cell phenotype in peripheral blood cells of the animals infected with the T1 and VD57 strains and stimulated with the TPP and MQD secreted antigens; however, the TPP antigen proved to be the greatest inducer of cell proliferation. Both strains demonstrated significant indices in cell proliferation.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Goats; Sheep; Flow cytometry.

### Resumen

La linfadenitis caseosa es una enfermedad infecciosa crónica de los pequeños rumiantes, caprinos y ovinos, que provoca grandes pérdidas económicas, caracterizada por la formación de granulomas subcutáneos y en órganos internos cuyo agente etiológico es *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacilo gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de fagocitos. relacionado filogenéticamente con *Mycobacterium tuberculosis*. Este estudio tuvo como objetivo evaluar "in vitro" los fenotipos de subpoblaciones de células del linaje de leucocitos de sangre periférica de cabras experimentalmente infectadas con las cepas T1 y VD57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, siendo las células estimuladas con antígenos secretados/excretados de la cepa T1 utilizando como herramienta la técnica de citometría de flujo. La expresión de células CD4 es mayor en animales infectados con el linaje VD57 bajo estímulos antigénicos tanto TPP como MQD. La expresión de células marcadas con CD8 es mayor en el grupo de animales infectados con el linaje T1 para ambos estímulos con expresión creciente en el tiempo. Para el marcador CD21 hubo mayor expresión en el grupo de animales infectados con el linaje T1, sin embargo, en el grupo de animales infectados con el linaje VD57 hubo expresión significativa a los 60 días de la infección. No hubo diferencia en el índice de proliferación de las células TCR $\gamma\delta$  bajo el estímulo de los dos antígenos en el grupo infectado con T1, mientras que en el grupo infectado con el linaje VD57, el antígeno TPP tuvo un mayor índice de proliferación a los 60 días de infección. Se puede observar que hubo diferencias en la expresión del fenotipo celular en células de sangre periférica de los animales infectados con las cepas T1 y VD57 y estimulados con los antígenos secretados TPP y MQD, sin embargo, el antígeno TPP demostró ser el mayor inductor de proliferación celular. Ambas cepas demostraron índices significativos en la proliferación celular.

**Palabras clave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Cabras; Oveja; Citometría de flujo.

## 1. Introdução

A linfadenite caseosa, que é uma doença crônica infecciosa de pequenos ruminantes, caprinos e ovinos, causadora de grandes perdas econômicas, caracterizada pela formação de material purulento oriundos dos abscessos subcutâneos e órgãos internos (Batey, 1986b; Walker *et al.*, 1991), cujo agente etiológico é *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacilo Gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de fagócitos (Sampaio *et al.*, 2019; Yaacob *et al.*, 2021).

A imunidade contra *C. pseudotuberculosis* é similar a observada por microrganismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (Flynn, 1993; Pascual *et al.*, 1995; Guaraldi *et al.*, 2013) que acontece via ativação de linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) pelos macrófagos e células dendríticas, mais especificamente pelo perfil Th1; estas são responsáveis pela resposta imune específica, induzindo principalmente a secreção de citocinas como INF- $\gamma$  e IL-12, essas características vão conferir a resistência adaptativa em infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas e lisar células infectadas (Kaufmann, 1993; Abbas, 2005; Vaz *et al.*, 2007). Em caprinos e ovinos a resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* envolve mecanismos da resposta imune inata e da resposta adaptativa (Joly, 1965a; Pépin *et al.*, 1997; Vale, 2003).

Estudo feito em camundongos fazendo o tratamento de células TCD4<sup>+</sup> com anticorpos monoclonais anti-CD4, tanto na infecção primária quanto na infecção secundária por *C. pseudotuberculosis* apresentou aumento significativamente da mortalidade dos camundongos e da proliferação bacteriana, em contrapartida, houve a redução da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Dados como este sugerem que as células TCD4<sup>+</sup> estão envolvidas na resistência do hospedeiro à infecção por *C. pseudotuberculosis* pela secreção de IFN- $\gamma$  (Lan *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 1999; Rebouças *et al.*, 2011). Ainda neste mesmo estudo, apenas na infecção primária as células T CD8<sup>+</sup> de camundongos, submetidas ao mesmo tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD8, mostraram um papel importante na imunidade protetora contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*. Este estudo sugere que ambas as populações de linfócitos são importantes na resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* (Lan *et al.*, 1999).

Walker *et al.* (1991) em estudo que relata a descrição do granuloma decorrente da infecção por *C. pseudotuberculosis*, sugere que devido à localização das células B, externamente a camada que apresentou linfócitos T CD4, CD8 e T $\gamma\delta$ , essas podem produzir anticorpos neutralizantes contra a potente exotoxina fosfolipase D, lipídeo de parede citotóxico, e outros produtos do *C. pseudotuberculosis*.

Embora o *C. pseudotuberculosis* possua diversas frações proteicas obtidas de antígenos somáticos secretados e excretados, estas frações proteicas não são bem caracterizadas até o momento, a bioinformática tem auxiliado os estudos antigênicos apontando alvos para novos trabalhos (Raynal *et al.*, 2018). Devido à similaridade filogenética entre *M. tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis*, acredita-se que essas proteínas sejam importantes para o desenvolvimento da resposta imuno protetora do hospedeiro com a produção de citocinas pró-inflamatórias correspondem a proteínas secretadas e excretadas de baixo peso molécula, como a ESAT-6 e CFP-10 (Lim *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2010).

Dentre as diversas técnicas usadas na avaliação da resposta imune, a citometria de fluxo tem sido bem-sucedida para avaliar a resposta imune mediada por célula para diversos estudos com patógenos do gênero *Mycobacterium* (Seder *et al.*, 2008; Platt *et al.*, 2006). A citometria de fluxo é uma técnica de alta sensibilidade que não demanda tratamentos especiais nas amostras ou isolamento do alvo (Andrade *et al.*, 2022). Ainda assim, não há relatos sobre a resposta imune de subpopulações de células T e de célula B a *C. pseudotuberculosis* com o uso da citometria de fluxo. O objetivo do presente estudo foi avaliar o fenótipo leucocitário de caprinos infectados com as linhagens, selvagens (VD57) e atenuada (T1), de *C. pseudotuberculosis* utilizando-se antígenos secretados/excretados da linhagem T1, com o intuito de melhorar o entendimento na relação parasito hospedeiro.

## 2. Metodologia

### Linhagens Bacterianas

Foram utilizadas para este estudo duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a linhagem codificada como T1 – naturalmente atenuada e a linhagem selvagem catalogada como VD57, provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA. Ambas as linhagens foram identificadas pelo kit API coryne (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França).

### Cultivo Bacteriano

As linhagens T1 e VD57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, foram semeadas em caldo BHI e cultivadas em estufa a 37°, em presença de 5% de CO<sub>2</sub> por 72h.

### Antígeno obtido pela técnica de separação em três fases (TPP)

A linhagem T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, foi semeada em meio BHI a 37°C por 72 h. A suspensão bacteriana foi lavada, centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos e filtração do sobrenadante a vácuo em membrana Millipore 0,45 µm. O fracionamento do sobrenadante em três fases, seguiu o protocolo descrito por Paule e colaboradores, 2004.

### Antígeno MQD

A produção do antígeno foi realizada de acordo com a metodologia estabelecida e descrita por Moura Costa e colaboradores, 1999.

### Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína das amostras (antígeno TPP e antígeno MQD) foram quantificadas pelo kit de dosagem de proteínas da Bio-Rad (método modificado de Lowry *et al*, 1952).

### Animais

Neste estudo foram utilizados 12 caprinos de raça não definida, entre 06 meses e 01 anos de vida, obtidos da Fazenda Experimental de Salinas com água e comida *ad libidun*. Foram distribuídos em três grupos de quatro animais: Grupo 1 – controle: foi inoculado 1ml de tampão salina fosfato; Grupo 2 - imunizado com 2x10<sup>5</sup> UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* da linhagem T1; e o Grupo 3 - imunizado com 2x10<sup>5</sup> UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* da linhagem VD57, sendo todos estes com sorologia negativa para linfadenite caseosa. Em todos os grupos a inoculação foi subcutânea. Sendo estes acompanhados mensalmente por um período de 03 meses, e foi realizado o reforço vacinal aos 60 dias. A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) aprovou o uso dos animais através do protocolo 051/2013.

### Coleta de Sangue

O sangue dos animais foi coletado num volume de 5mL, por punção venosa na veia jugular com tubo tipo Vacutainer estéril (BD-SP) com EDTA.

### Cultura de Sangue Total

O sangue total dos animais foi cultivado em placas de 24 poços (1mL/poço). A concentração dos antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi de 40µg/mL para o TPP e de 20µg/mL para o MQD. O sangue total foi incubado

em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48h. Após incubação o conteúdo foi coletado, realizada a contagem de leucócitos totais e citometria de fluxo. Foi utilizado o mitógeno Pokeweed (PWM) na concentração 5 µg/mL como controle positivo do teste.

### **Citometria de Fluxo**

Após o cultivo do sangue total, uma amostra de cada poço com diferentes estímulos (mitógenos e antígenos) foi avaliada por citometria de fluxo para mensurar os marcadores de antígenos de superfície de linfócitos, utilizando anticorpos monoclonais, primários, específicos para caprinos (CD4-17D1-IgG1; CD8α-CACT80C-IgG1, CD21-like (B-B7), TcR1-N6, VMRD, Inc., Pullman, WA, USA), diluídos a 1:50. Em uma breve descrição da metodologia adotada, as células foram lavadas 2 vezes em Tampão Salina Fosfato. Em seguida, 100 µL de células foram incubadas com o anticorpo primário, diluído a 1:50, por 15 min. Depois, foi adicionado o anticorpo secundário, (anti-mouse IgG1, Rockland, Glibertsville, Pennsylvania, USA) fluoresceína isotiocianato (FITC) diluído a 1:1000. As amostras foram incubadas por 15 min, ao abrigo da luz. Após a incubação as células vermelhas de todas as amostras foram lisadas, adicionando-se de tampão de lise (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson), diluído 1:10, em seguida as amostras foram incubadas por 30 min ao abrigo da luz. Em seguida foram centrifugadas duas vezes com Tampão Salina Fosfato, o sobrenadante foi retirado e o volume foi ressuspensão em 200 µL de formalina (3% tamponada em PBS). Finalmente, as células foram lavadas 2 vezes em Tampão Salina Fosfato, o volume foi ressuspensão para 500 µL de Tampão Salina Fosfato antes de serem mensuradas utilizando um citômetro de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os dados foram coletados em 10.000 eventos e analisados usando o software Cellquest.

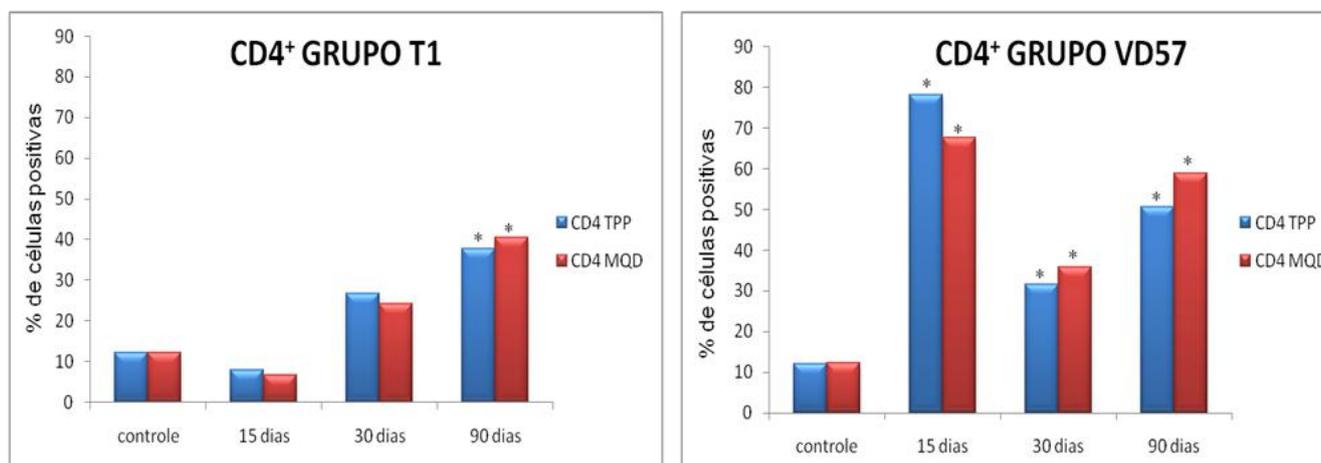
### **Análise Estatística**

A análise foi feita pelos testes não paramétricos de Kruskal-wallis e Mann-Whitney, com correção de Bonferroni. Os resultados foram expressos como médias e as diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

## **3. Resultados**

O grupo infectado com a cepa atenuada (T1), e estimulado com os antígenos TPP e MQD apresentou uma maior proliferação de células CD4<sup>+</sup> no tempo de 90 dias, quando comparado com o grupo controle, e com o tempo de 15 ( $p < 0,05$ ), como demonstrado na figura 01. Ao contrário do grupo infectado com a linhagem atenuada T1, no grupo infectado com a linhagem selvagem VD57, os antígenos TPP e MQD induziram uma maior proliferação de células CD4<sup>+</sup> nos tempos 15, 30 e 90 dias, quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) e 15 dias quando comparado com os demais tempos ( $p < 0,05$ ). Analisando-se os dois grupos de infecções pode-se observar que somente aos 15 dias o grupo infectado com a linhagem VD57 apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparado ao mesmo tempo de infecção com a linhagem T1 (Figura 1).

**Figura 1:** Percentagem de células CD4<sup>+</sup> de caprinos infectados com as linhagens T1 (atenuada) e VD57 (selvagem), e grupo controle, após serem estimulados pelos antígenos secretados/excretados (TPP e MQD) da linhagem atenuada T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cultura de sangue total por 48h. Dados apresentados expressam as médias. P<0,05 (\*).

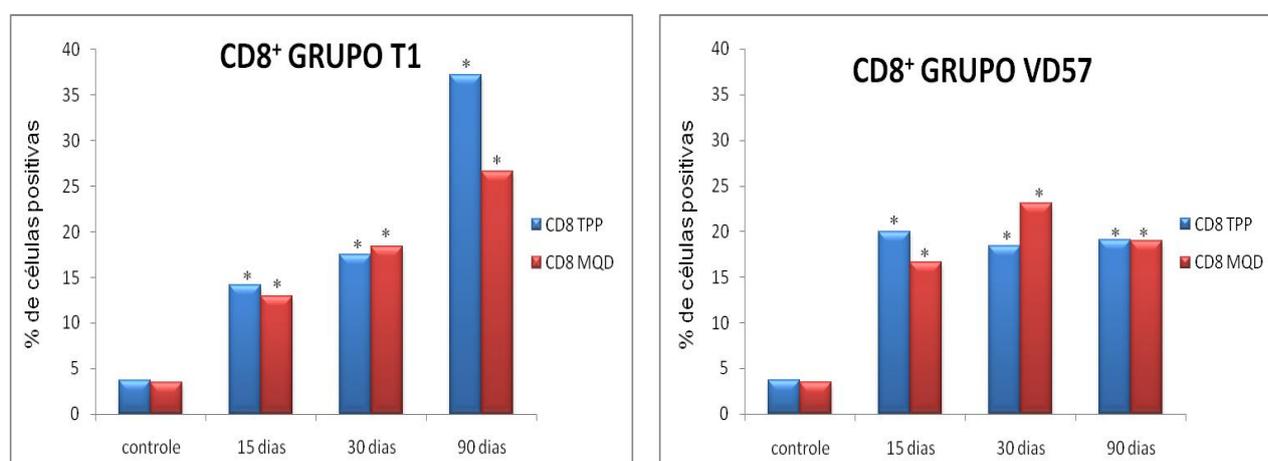


Fonte: Autores.

A Figura 2 demonstra que no grupo infectado com a linhagem atenuada (T1) e estimulados com os antígenos secretados TPP e MQD, ocorreu proliferação celular em todos os tempos com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, entretanto houve maior estímulo aos 90 dias após a infecção com o antígeno TPP com diferença estatisticamente significativa quando comparados a 15 e 30 dias para os dois estímulos ( $p < 0,05$ ).

No grupo infectado com a linhagem selvagem VD57, ocorreu proliferação celular em todos os tempos quando as células foram estimuladas com os dois antígenos TPP e MQD, com diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ), no entanto, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tempos e antígenos (Figura 2).

**Figura 2:** Percentagem de células CD8<sup>+</sup> de caprinos infectados com as linhagens T1 (atenuada) e VD57 (selvagem), e grupo controle, após serem estimuladas pelos antígenos secretados/excretados (TPP e MQD) da linhagem atenuada T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cultura de sangue total por 48h. Dados apresentados expressam as médias.  $p < 0,05$  (\*).



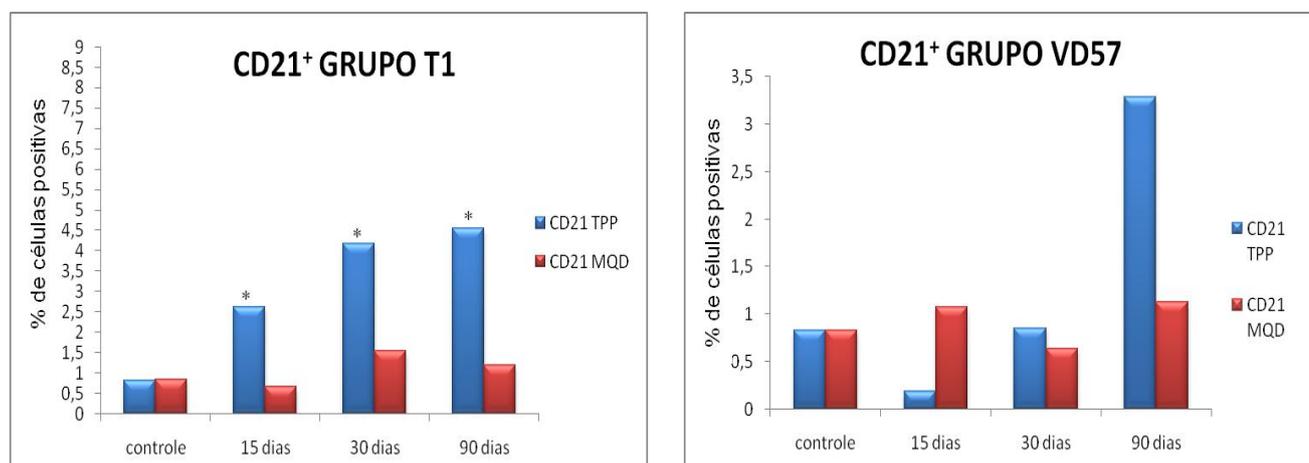
Fonte: Autores.

A comparação entre os dois grupos de infecção demonstra diferença estatisticamente significativa com antígeno TPP aos 90 dias, na infecção da linhagem T1, em relação aos tempos e antígenos na infecção com a linhagem VD57.

No grupo infectado com a linhagem T1, aos 15, 30 e 90 dias pós-infecção, a porcentagem de células CD21<sup>+</sup> é elevada, sob o estímulo do antígeno TPP, comparada com o grupo controle, havendo uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), (figura 03). Em relação ao estímulo do antígeno MQD, não ocorreu diferença significativa entre este grupo e o controle ( $p < 0,05$ ).

No grupo infectado com a linhagem selvagem (VD57), pode-se observar que os antígenos TPP e MQD estimularam a proliferação de células CD21<sup>+</sup> com 90 dias de infecção com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os demais tempos, com o grupo controle. Contudo, neste tempo a proliferação das células CD21<sup>+</sup> foi maior sob estímulo do antígeno TPP do que o observado para o antígeno MQD ( $p < 0,05$ ), como demonstrado na Figura 3.

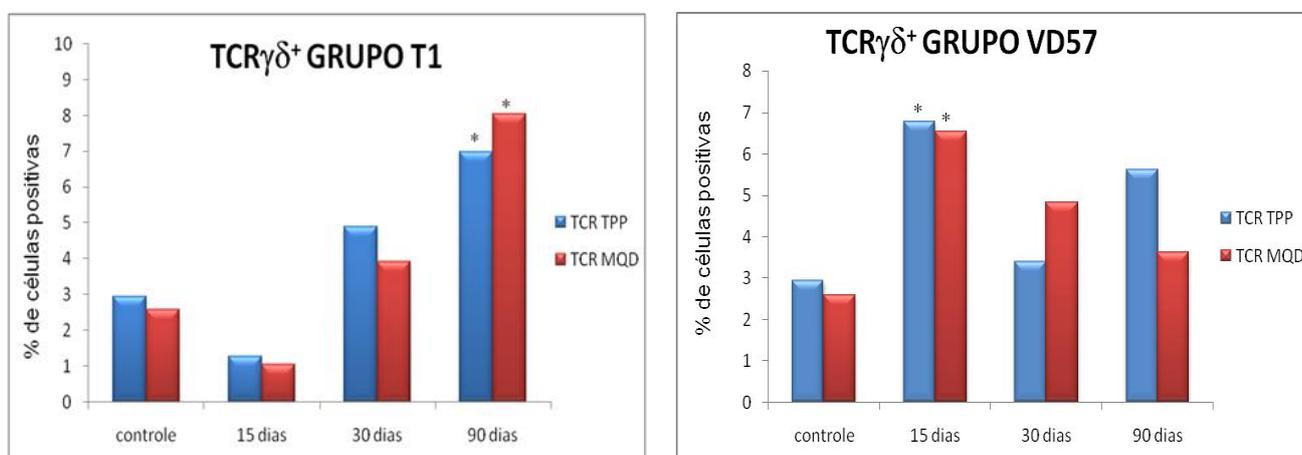
**Figura 3:** Percentagem de células CD21<sup>+</sup> de caprinos infectados com as linhagens T1 (atenuada) e VD57 (selvagem), e grupo controle, após serem estimuladas pelos antígenos secretados/excretados (TPP e MQD) da linhagem atenuada T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cultura de sangue total por 48h. Dados apresentados expressam as médias.  $p < 0,05$  (\*).



Fonte: Autores.

A comparação entre os dois tipos de infecção indica que existe diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), para o antígeno TPP nos tempos 15 e 30 dias na infecção com a linhagem T1 quando comparado ao estímulo induzido com os dois antígenos na infecção com a linhagem VD57.

**Figura 4:** Percentagem de células TCR $\gamma\delta^+$  Percentagem de células CD21 $^+$  de caprinos infectados com as linhagens T1 (atenuada) e VD57 (selvagem), e grupo controle, após serem estimuladas pelos antígenos secretados/excretados (TPP e MQD) da linhagem atenuada T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cultura de sangue total por 48h. Dados apresentados expressam as médias.  $p < 0,05$  (\*).



Fonte: Autores.

Em relação à proliferação de células TCR $\gamma\delta^+$ , o grupo infectado com a linhagem atenuada (T1) e estimulados com os antígenos TPP apresentou diferença estatisticamente significativa em nos tempos 30 e 90 dias quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O antígeno MQD apresentou maior índice de proliferação nos tempos 30 e 90 dias, entretanto, só apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle aos 90 dias de infecção (Figura 04). No grupo infectado com a linhagem selvagem VD57 houve uma elevada proliferação de células TCR $\gamma\delta^+$  aos 15 dias de infecção para os dois antígenos, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, demais tempos e entre si. Neste mesmo grupo, VD57, quando comparada a proliferação celular de células TCR $\gamma\delta^+$  entre os antígenos TPP e MQD observa-se que a indução de resposta ao MQD diminui ao longo do tempo de infecção se comparada ao antígeno TPP, que tem a porcentagem de células TCR $\gamma\delta^+$  mais elevada aos 15 dias (Figura 04).

O mitógeno pokweed (PWM) foi utilizado como controle positivo das reações para cada tempo e para cada marcador de superfície de linfócitos dos grupos infectados com as linhagens T1 e VD57 de *C. pseudotuberculosis*. Foi observado que o PWM estimulou inespecificamente a proliferação celular referente aos marcadores de linfócitos utilizados, confirmando seu papel como controle positivo da reação (dados não mostrados).

#### 4. Discussão

Obter mais conhecimentos sobre a resposta imune do hospedeiro caprino contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* é fundamental para o controle e manejo da linfadenite caseosa. Semelhante a outras infecções por patógenos intracelulares facultativos, a imunidade mediada pelo perfil de resposta Th1 desempenha um papel significativo no controle da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, porém ainda há muitos aspectos da imunidade a serem elucidados para contribuir no controle da infecção.

A resposta imune protetora contra a infecções por micobactérias, patógenos intracelulares facultativos, é a mediada por células, envolvendo a ativação da resposta dos linfócitos CD4 $^+$  e CD8 $^+$ , formando as bases da resposta do perfil Th1 (Begg, 2005; Sá, 2018; Araújo et al., 2019). Pela razão de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ser um patógeno intracelular facultativo

de fagócitos, relacionado filogeneticamente com *Mycobacterium tuberculosis*, a resposta imune mediada por célula é um importante componente da resposta imune protetora (Lan *et al.*, 1998; Sá *et al.*, 2018).

A avaliação da proliferação das células CD4<sup>+</sup> apresentou uma variação significativa. A mesma variação também foi observada por Rebouças e colaboradores (2011). No grupo de caprinos infectados com a linhagem atenuada, a resposta frente aos antígenos MQD e TPP variou entre os tempos 15 a 90 dias ocorrendo de maneira semelhante para o grupo infectado com a linhagem selvagem VD57; contudo a resposta frente aos antígenos MQD e TPP, foi mais significativa para este grupo. Pode-se inferir que a alta responsividade aos antígenos no tempo 15 dias ocorre devido à fase aguda da infecção e o declínio nos tempos 30 e 60 dias pode ter ocorrido devido a cronicidade da infecção. O aumento no tempo 90 dias é devido a resposta frente ao reforço vacinal. A baixa produção de células CD4<sup>+</sup> observada no grupo infectado com a linhagem atenuada T1 pode ser em decorrência da baixa estimulação exercida por esta linhagem bacteriana sobre o sistema imunológico do animal. A baixa responsividade contra a linhagem atenuada foi observada por Vale (2005) ao infectar camundongos Balb/c com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem atenuada T1. Contudo, os dados apresentados no grupo da linhagem T1, são similares aos reportados por Hasvold *et al.* (2002) em estudo feito com caprinos imunizados com linhagem atenuada de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Diversos autores sugerem que as células T CD4<sup>+</sup> produzam linfocinas que contribuem no desenvolvimento do piogranuloma e a persistência do patógeno *Corynebacterium pseudotuberculosis* no hospedeiro (Batey, 1986; Pépin *et al.*, 1994; Paule *et al.*, 2003; Bastos *et al.*, 2012).

Neste trabalho, as células T CD8<sup>+</sup>, após estimulação *in vitro* com os antígenos TPP e MQD, apresentaram porcentagem elevada tanto no grupo infectado com a linhagem T1 quanto no grupo infectado com a VD57 quando comparada ao controle. A porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> é significativamente maior que a de células T CD8<sup>+</sup>, o que corrobora, sobre o papel das células CD4 e CD8 em infecções por patógenos intracelulares facultativos (Hasvold, *et al* 2002; Cooper, 2002, Derrick, 2011; Da Silva *et al.*, 2021). Os dados sugerem que na infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos as células T CD4<sup>+</sup> desempenham papel central no controle da infecção (Sá, 2018). Kataperumal *et al* (2009), mostraram que houve alto índice de proliferação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> de caprinos imunizados com antígenos recombinantes de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, após estimulação *in vitro*. A predominância de células CD8<sup>+</sup> observadas neste estudo é similar ao que foi observado em estudos histoquímico feito em caprinos infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Pepin *et al*, 1994; Bastos *et al.*, 2012).

Estudos feitos em modelo murino sugerem que células T $\gamma\delta$  desempenham importante papel no desenvolvimento do granuloma em infecções por micobactérias (Saunders *et al*, 1998; Tanaka *et al*, 2005; Buza *et al*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2018). Ao avaliar células T $\gamma\delta$  de bovinos infectados com *M. bovis*, Alvarez *et al* (2009) demonstraram que estas células produzem citocinas (IL-2, IL-10, IL-12 e INF $\gamma$ ). A proliferação de células T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> no grupo T1 é baixa nos primeiros dias pós-infecção e se mantém estável nos tempos 30 e 60 dias. No grupo VD57, a expressão de células T $\gamma\delta$  é elevada no tempo 15 dias, ocorre um declínio no tempo 30 dias, apresentando alta proliferação no tempo 60 dias. Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com os que foram observados de células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, utilizando o modelo caprino imunizado com antígenos recombinantes de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, após estimulação “*in vitro*” (Kataperumal, *et al*, 2009).

Os dados de células B (CD21) apresentados no grupo T1 apesar de serem menos expressivos que o dos outros marcadores - CD4, CD8 e TCR $\gamma\delta$ , (figura 04) são similares aos encontrados em experimentos feitos com ovinos e caprinos imunizados com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em que foi utilizada a citometria de fluxo (Kataperumal *et al*, 2009; Dw Silva *et al*, 2010). Geralmente, as células B são os principais componentes da resposta adaptativa do sistema imunológico, proporcionando através da vigilância imunológica a produção de anticorpos para a neutralização de patógenos. Nos estágios iniciais da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* a replicação bacteriana é feita

extracelularmente e há uma alta produção de fosfolipase D, importante para a disseminação da bactéria (Zaki, 1976), portanto, nesta fase a resposta por anticorpos é mais intensa, constituindo-se certo predomínio de uma resposta do tipo Th2. Anticorpos presentes no soro de animais infectados com este *Corynebacterium pseudotuberculosis* reconhecem uma grande quantidade de proteínas de pesos moleculares entre 22 e 120 KDa; 5 e 200 KDa e, em menor proporção, 68, 64, 43 e 22 KDa identificadas pela técnica de “Western Blotting”, utilizando-se antígenos somáticos e secretados (Vale *et al.*, 2003; Paule *et al.*, 2003 e 2004b). Entretanto, poucos são os relatos na literatura sobre células B com patógenos intracelular, pelo fato da resposta protetora a estes microrganismos, como por exemplo, o *Mycobacterium* subsp. *paratuberculosis* ser mais expressiva a resposta tipo Th1, porém *Corynebacterium pseudotuberculosis* por ser um patógeno intracelular facultativo o estudo deste tipo celular é importante para o entendimento da interação entre parasito e hospedeiro.

## 5. Conclusões

Ambas as linhagens (selvagem e atenuada) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* demonstraram índices significativos de proliferação de células, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup> e Tγδ após estimulação *in vitro* com o antígeno secretado TPP. Foi observado que ocorreu alteração do fenótipo leucocitário dos caprinos após infecção com ambas as linhagens VD57 e T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Alterações na expressão das células estudadas demonstram o papel das subclasses de linfócitos na resposta imune protetora contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## Referências

- Alvarez, A. J., Endsley, J. J., Werling, D., & Mark Estes, D. (2009). WC1+ γδ T Cells Indirectly Regulate Chemokine Production During Mycobacterium bovis Infection in SCID-bo Mice. *Transboundary and Emerging Diseases*, 56(6-7), 275-284. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01081.x>
- Andrade; C. L. B., de Moura Costa, L. F., dos Santos, R. M., Conceição, R. R., Oliveira, L. G. F., dos Santos, A. S., & de Sá, M. D. C. A. (2022) Avaliação do crescimento bacteriano por citometria de fluxo e produção de antígenos secretados de diferentes cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In Mota, D., Silva, Clécio (Org.), *Produção Científica em Ciências Biológicas* (pp. 58-83). Atena. <https://doi.org/10.22533/at.ed.2192230036>
- Araújo, C. L., Alves, J., Nogueira, W., Pereira, L. C., Gomide, A. C., Ramos, R., & Folador, A. (2019). Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene*, 702, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.049>
- Asai, K. I., Yamaguchi, T., Kuroishi, T., Komine, Y., Kai, K., Komine, K. I., & Kumagai, K. (2003). Differential gene expression of cytokine and cell surface molecules in T cell subpopulation derived from mammary gland secretion of cows. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50(6), 453-462. <https://doi.org/10.1046/j.8755-8920.2003.00113.x>
- Baird, G. J., & Fontaine, M. C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of comparative pathology*, 137(4), 179-210. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.07.002>
- Bastos, B. L., Portela, R. D., Dorella, F. A., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, T. L. D. P., & Azevedo, V. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. *J Clin Cell Immunol S*, 4, 005. [10.4172/2155-9899.S4-005](https://doi.org/10.4172/2155-9899.S4-005)
- Batey, R. G., Speed, C. M., & Kobes, C. J. (1986). Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. *Australian veterinary journal*, 63(2), 33-36. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb02916.x>
- Begg, D. J., & Griffin, J. F. T. (2005). Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine*, 23(42), 4999-5008. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.031>
- Buza, J., Kiro, T., Zerihun, A., Abraham, I., & Ameni, G. (2009). Vaccination of calves with *Mycobacteria bovis* Bacilli Calmette Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood γδ T cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 130(3-4), 251-255. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.12.021>
- Cooper, A. M. (2009). Cell mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology*, 27, 393. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>
- da Silva, W. M., Seyffert, N., Silva, A., & Azevedo, V. (2021). A journey through the *Corynebacterium pseudotuberculosis* proteome promotes insights into its functional genome. *PeerJ*, 9, e12456. <https://doi.org/10.7717/peerj.12456>
- de Silva, K., Begg, D., Carter, N., Taylor, D., Di Fiore, L., & Whittington, R. (2010). The early lymphocyte proliferation response in sheep exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* compared to infection status. *Immunobiology*, 215(1), 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.01.014>
- Derrick, S. C., Yabe, I. M., Yang, A., & Morris, S. L. (2011). Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells. *Vaccine*, 29(16), 2902-2909. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.010>

- Fontaine, M. C., & Baird, G. J. (2008). Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, 76(1-2), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.025>.
- Guaraldi, A. L. de M., Hirata, R., & Azevedo, V. A. de C. (2013). *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*—General Aspects. *Corynebacterium Diphtheriae and Related Toxigenic Species*, 15–37. [10.1007/978-94-007-7624-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7624-1_2)
- Guo, S., Bao, L., Qin, Z. F., & Shi, X. X. (2010). The CFP-10/ESAT-6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* potentiates the activation of murine macrophages involvement of IFN- $\gamma$  signaling. *Medical microbiology and immunology*, 199(2), 129-137. <https://doi.org/10.1007/s00430-010-0146-1>
- Hasvold, H. J., Valheim, M., Berntsen, G., & Storset, A. K. (2002). In vitro responses to purified protein derivat of caprine T lymphocytes following vaccination with live strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 90(1-2), 79-89. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00224-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00224-6)
- Kathaperumal, K., Kumanan, V., McDonough, S., Chen, L. H., Park, S. U., Moreira, M. A., & Chang, Y. F. (2009). Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine*, 27(1), 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.019>
- Kaufmann, S. H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annual review of immunology*, 11, 129-163. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001021>
- Lan, D. T. B., Makino, S. I., Shirahata, T., Yamada, M., & Nakane, A. (1999). Complement receptor type 3 plays an important role in development of protective immunity to primary and secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiology and immunology*, 43(12), 1103-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb03367.x>
- Lan, D. T. B., Taniguchi, S., Makino, S. I., Shirahata, T., & Nakane, A. (1998). Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiology and immunology*, 42(12), 863-870. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1998.tb02362.x>
- Lim, J. H., Kim, H. J., Lee, K. S., Jo, E. K., Song, C. H., Jung, S. B., & Park, J. K. (2004). Identification of the new T-cell-stimulating antigens from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *FEMS microbiology letters*, 232(1), 51-59. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00018-7)
- Moura Costa, L., JA Paule, B., M Freire, S., Nascimento, I., Schaer, R., F Regis, L., & Meyer, R. (2005). Meio Sintético Quimicamente Definido para o Cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*.
- Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A., Gimenez, M. N., & Collins, M. D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 45(4), 724-728. <https://doi.org/10.1099/00207113-45-4-724>
- Paule, B. J. A., Azevedo, V. A. D. C., Costa, L. F. M., Freire, S. M., Regis, L. F., Vale, V. L. C., & Nascimento, R. J. M. (2004a). SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- Paule, B. J. A., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahia, C. R., Vale, V. L. C., & Meyer, R. (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary immunology and immunopathology*, 96(3-4), 129-139. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00146-6)
- Paule, B. J., Meyer, R., Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Regis, L. F., Vale, V. L., Freire, S. M., Nascimento, I., Schaer, R., & Azevedo, V. (2004b). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Protein expression and purification, 34(2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.12.003>
- Pépin, M., Pittet, J. C., Olivier, M., & Gohin, I. (1994). Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *Journal of leukocyte biology*, 56(5), 666–670. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.666>
- Pépin, M., Seow, H. F., Corner, L., Rothel, J. S., Hodgson, A. L., & Wood, P. R. (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Veterinary research*, 28(2), 149–163. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902468>
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., & Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual review of immunology*, 22, 929–979. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>
- Platt, R., Roth, J. A., Royer, R. L., & Thoen, C. O. (2006). Monitoring responses by use of five-color flow cytometry in subsets of peripheral T cells obtained from cattle inoculated with a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine. *American journal of veterinary research*, 67(12), 2050–2058. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.12.2050>
- Platt, R., Thoen, C. O., Stalberger, R. J., Chiang, Y. W., & Roth, J. A. (2010). Evaluation of the cell-mediated immune response to reduced doses of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* vaccine in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 136(1-2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.02.003>
- Raynal, J. T., Bastos, B. L., Vilas-Boas, P. C. B., Sousa, T. D. J., Costa-Silva, M., De Sá, M. D. C. A., Portela, R. W., Moura-Costa, L. F., Azevedo, V., Meyer, R. (2018). Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Research Notes*, 11, 73. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3180-5>.
- Rebouças, M. F., Portela, R. W., Lima, D. D., Loureiro, D., Bastos, B. L., Moura-Costa, L. F., & Meyer, R. (2011). *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*, 23(2), 213-220. <https://doi.org/10.1177/104063871102300204>
- Ribeiro, O. C., Silva, J. A. H., & Pereira filho, M. (1988a) Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 10(2), 23-24.

- Rodrigues, G., Vale, V. L. C., Nascimento, A. B., Nascimento, A. B., da Costa Silva, M., Raynal, J. T., & Meyer, R. (2018). Aspectos da resposta imune em ovinos experimentalmente co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus*. *Pubvet*, 12, 172. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n5a99.1-11>
- Sá, M. D. C. A., Rocha Filho, J. T. R., Rosa, D. S., de Sá Oliveira, S. A., Freire, D. P., Alcantara, M. E., ... & Meyer, R. (2018). Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. *Pubvet*, 12, 133. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n11a202.1-13>
- Sampaio, G. P., Vale, V. L. C., de Moura Costa, L. F., Fraga, R. E., de Melo Santos, H. H., de Sá, M. D. C. A., & Nascimento, R. J. M. (2019). Padronização de técnicas por citometria de fluxo para avaliar *Corynebacterium pseudotuberculosis* células fagocitárias murinas. *Pubvet*, 13, 150. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n11a443.1-9>
- Saunders, B. M., Frank, A. A., Cooper, A. M., & Orme, I. M. (1998). Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice. *Infection and immunity*, 66(11), 5508–5514. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.11.5508-5514.1998>.
- Seder, R. A., Darrah, P. A., & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature reviews. Immunology*, 8(4), 247–258. <https://doi.org/10.1038/nri2274>
- Tanaka, S., Sato, M., Onitsuka, T., Kamata, H., & Yokomizo, Y. (2005). Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Veterinary pathology*, 42(5), 579–588. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-579>
- Vale, V., Freire, S., Ribeiro, M., Regis, L., Bahia, R., Carminati, R., Paule, B. J. A., Nascimento, I., & Meyer, R. (2003). Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 2(2), 192–200. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v2i2.4286>
- Vaz, A. J., Takei, K., & Bueno, E. C. (2007). *Imunoensaios: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Walker, J., Jackson, H., Brandon, M. R., & Meeusen, E. (1991). Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clinical and experimental immunology*, 86(1), 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb05766.x>
- Yaacob, M. F., Murata, A., Nor, N. H. M., Jesse, F. F. A., & Yahya, M. F. Z. R. (2021). Biochemical composition, morphology and antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biofilm. *Journal of King Saud University-Science*, 33(1), 101225. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.10.022>
- Zaki, M. M. (1976). Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. *Research in veterinary science*, 20(2), 197–200.