

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n11a443.1-9>

Padronização de técnicas por citometria de fluxo para avaliar *Corynebacterium pseudotuberculosis* células fagocitárias murinas

Geraldo Pedral Sampaio^{1*}, Vera Lucia Costa Vale², Lília Ferreira de Moura Costa³, Ricardo Evangelista Fraga⁴, Herbert Henrique de Melo Santos⁵, Maria da Conceição Aquino de Sá⁶, Bruno Lopes Bastos⁴, José Tadeu Raynal Rocha Filho⁷, Soraya Castro Trindade⁸, Roberto José Meyer Nascimento⁹

¹Discente do Programa de pós-graduação em Imunologia- Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ²Professora plena, Universidade do Estado da Bahia, Campus II, Alagoinha, Brasil. ³Professor Adjunto, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ⁴Professor Adjunto, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil. ⁵Médico hematologista, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ⁶Pós-Doutoranda do Programa de pós-graduação em Imunologia – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ⁷Professor Substituto, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ⁸Professora Titular, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil. ⁹Professor Titular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

*Autor para correspondência, E-mail: geraldopedral@gmail.com

Resumo. Com o avanço no entendimento de bioprocessos, houve um significativo aumento de novas técnicas as interações celulares. Dentre elas, a citometria de fluxo (CF), uma importante ferramenta para contar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Os parâmetros analisados são conteúdos celulares de todas as origens, como a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa. Assim, objetivou-se padronizar técnicas, através da Citometria de fluxo para avaliar a contagem absoluta e os aspectos fisiológicos de *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. Foi cultivado o *C. pseudotuberculosis* em meio BHI –Tween 80 0,5%, seguido da marcação deste microrganismo com corantes fluorescentes, em diferentes períodos e diferentes estados fisiológicos ao longo do seu crescimento. No ensaio de fagocitose utilizaram-se células do peritônio de murinos de duas linhagens após peritonite induzida por Tioglicolato de Sódio. Após a adesão celular, foi feito o desafio com bactérias coradas e após 1h 30 min as células aderentes foram tripsinizadas, lavadas e centrifugadas para o ensaio por CF. Foi observado um período de crescimento similar a uma curva padrão de crescimento microbiano, além de permitir a distinção entres diferentes estados fisiológicos. Os dados obtidos na citometria evidenciam populações de células fagocíticas contendo bactérias no citoplasma. Observou-se uma população de baixa complexidade interna, similar à apresentada por linfócitos, e uma população com complexidade interna moderada similar a apresentada por células de origem monocítica. A técnica de citometria de fluxo com a marcação por fluorescência foi eficaz para a avaliação do crescimento e viabilidade de *C. pseudotuberculosis*, bem como da interação das células bacterianas com as células fagocitárias peritoneais murinas. A CF constitui-se, portanto, numa técnica eficiente para a avaliação da curva de crescimento desta bactéria, permitindo a distinção dos diferentes estados fisiológicos, inclusive podendo indicar um mecanismo de escape à fagocitose.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, bioprocessos, microrganismo intracelular

Standardization of flow cytometric techniques to evaluate *Corynebacterium pseudotuberculosis* murine phagocytic cells

Abstract. The understanding of bioprocesses has been allowed the increase of techniques to study cellular interactions, such as flow cytometry (FC). This technic is an important tool for counting and classifying microscopic particles suspended in flowing liquid medium, analyzing

parameters from cells diverse origins, including bacteria. Thus, the aim of this study was to standardize protocols by flow cytometry to evaluate the absolute count and physiological aspects of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in murine phagocytic cells. *C. pseudotuberculosis* was grown in 0.5% BHI – Tween80 medium, followed by the labeling of this microorganism with fluorescent dyes, at different periods and different physiological stages. In the phagocytosis assay, murine peritoneal cells from two strains were used after sodium thioglycolate-induced peritonitis. After cell adhesion, the challenge with stained bacteria was done and after 1h 30 min the adherent cells were trypsinized, washed and centrifuged for the (FC) assay. A growth period similar to a standard microbial growth curve was observed, and allowed to distinguish among different physiological stages. Data obtained from (FC) show phagocytic cell populations containing bacteria in the cytoplasm. A population with low internal complexity, similar to that presented by lymphocytes, and a population with moderate internal complexity similar to that presented by cells of monocytic origin were observed. The (FC) technique with flowering marking was effective to evaluate the growth and viability of *C. pseudotuberculosis*, as well as the interaction of bacterial cells with murine peritoneal phagocytic cells. Therefore, FC is an efficient technique to evaluating the growth curve of this bacterium, distinguishing different physiological stages, and may even indicate a mechanism of escape from phagocytosis.

Keywords: Flow cytometry, bioprocesses, intracellular microorganism

Estandarización de las técnicas de citometría de flujo para evaluar las células fagocíticas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* murinas

Resumen. Con el avance en la comprensión de los bioprocesos, ocurrió un aumento significativo de nuevas técnicas de interacciones celulares. Dentre esas técnicas está la citometría de flujo (CF), una herramienta importante para contar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en medio líquido en flujo. Los parámetros analizados son contenidos celulares de todos los orígenes, como la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, el agente etiológico de la Linfadenitis Caseosa. Este estudio tiene como objetivo estandarizar técnicas utilizando la citometría de flujo para evaluar el conteo absoluto y los aspectos fisiológicos de *C. pseudotuberculosis* y células fagocíticas murinas. Fue cultivada *C. pseudotuberculosis* en medio BHI – Tween 80 0,5%, con posterior marcación de este microorganismo con tintes fluorescentes, en diferentes períodos y diferentes estados fisiológicos a lo largo de su crecimiento. En el ensayo de fagocitosis, se utilizaron células de peritoneo murino de dos linajes, posterior a peritonitis inducida por tioglicolato de sodio. Después de la adhesión celular, se realizó el desafío con bacterias teñidas y después de 1h 30 min las células adherentes fueron tripsinizadas, lavadas y centrifugadas para el ensayo por CF. Fue observado un período de crecimiento similar a una curva estándar de crecimiento microbiano y fue posible distinguir diferentes estados fisiológicos. Los datos obtenidos de la citometría de flujo demuestran poblaciones de células fagocíticas que contienen bacterias en el citoplasma. Se observó una población con baja complejidad interna, similar a la presentada por los linfocitos, y una población con complejidad interna moderada, similar a la presentada por las células de origen monocítica. La técnica de citometría de flujo con la marcación por fluorescencia fue efectiva para evaluar el crecimiento y la viabilidad de *C. pseudotuberculosis*, así como la interacción de las células bacterianas con las células fagocíticas peritoneales murinas. Por lo tanto, la CF es una técnica eficiente para evaluar la curva de crecimiento de esta bacteria, permite la distinción de diferentes estados fisiológicos e incluso puede indicar un mecanismo de escape de la fagocitosis.

Palabras clave: citometría de flujo, bioprocesos, microorganismo intracelular

Introdução

Com o avanço tecnológico de bioprocessos, muitas técnicas foram criadas para conhecer as interações celulares. Assim, utilizando a citometria de fluxo é possível realizar análises de várias células,

através de aplicações em meio líquido em fluxo (Jelinek et al., 2017). Essa técnica possibilitará conhecer etapas fisiológicas e de viabilidade celular em culturas bacterianas (Kennedy & Wilkinson, 2017). Esse processo injeta as células que atravessa a câmara através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo (Cho et al., 2010). Esse método consiste na adição de corante fluorescente para que moléculas sejam coradas e seja captada pelo sistema óptico para determinar o número de células e seus constituintes (Álvarez-Barrientos et al., 2000; Suhren & Walte, 2000; Yakimov et al., 2019).

Dentre as aplicações de uso da citometria de fluxo, podem-se contar células bacterianas, como *C. pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, doença cosmopolita (Dorella et al., 2006; Morales et al., 2017). Esse gênero é constituído por bactérias pleomórficas, intracelular facultativo, Gram-positivas, imóveis e não esporuladas (Dorella et al., 2006).

A bactéria pode sobreviver à fagocitose, permitindo sua disseminação no hospedeiro e promovendo sua sobrevivência intracelular (Jones et al., 2000). Assim, a prevalência da doença é subestimada devido à forma subclínica. No entanto, trabalhos mostram alta prevalência (Guimarães et al., 2011). Alguns testes, como ELISA foram relatados como eficazes em programas de controle da enfermidade (Meyer et al., 2005). Essa incidência mostra a importância da técnica de citometria de fluxo devido a sensibilidade de detecção em relação a outros métodos. O estudo da viabilidade e interação bactéria-célula hospedeira é importante para padronizar técnicas de citometria de fluxo e avaliar aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas.

Material e métodos

Para o uso de animais no experimento, foi aprovado o processo de número 006/2010 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS – UFBA). Para a análise da viabilidade celular foram utilizadas as cepas T1 e C57 de *C. pseudotuberculosis* cultivadas em meio líquido BHI (infusão de cérebro e coração) com Tween 80 0,5%. Foram retirados 3,0 mL da cultura com 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. As bactérias foram lavadas com solução salina 0,9% e centrifugadas por quatro minutos a 8.000g. O sobrenadante foi desprezado, acrescentou-se o SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Depois da incubação procedeu-se outra lavagem para retirada do excesso dos reagentes, o *pellet* bacteriano foi ressuspensão e o iodeto de propídio foi adicionado visando a verificação da permeabilidade celular, e posterior mensuração pelo citômetro de fluxo. Para a contagem absoluta de microrganismos em suspensão foram utilizados tubos *TruCount* (Becton Dickson, EUA), contendo *pellet* de microesferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constantes em cada lote. Sendo o seguinte cálculo: Bactérias totais = (Nº beads eventos bactérias / Nº de beads A+B) X Nº de Beads por µL.

A determinação da atividade fagocítica de macrófagos foram utilizados dez camundongos machos, sendo cinco da linhagem CBA e cinco suíços, pesando entre 25 – 30 g, mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – ICS/UFBA. Todos os animais submetidos ao experimento recebiam água e ração *ad libitum* com condições controladas de iluminação e temperatura. Os animais foram condicionados no laboratório pelo menos uma hora antes do experimento. Injetou-se 3,0 mL de tioglicolato na cavidade peritoneal, após quatro dias realizou-se sacrifício por deslocamento cervical. Para tanto o abdômen teve assepsia realizada e exposição do peritônio em fluxo laminar, logo em seguida foi injetado 5,0 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl) a 4° C, massageando-se manualmente para a recuperação do conteúdo por aspiração com seringa. O material coletado foi condicionado em um tubo plástico de 15,0 mL estéril (mantido no gelo). Depois deste procedimento, realizou-se a centrifugação por 10 minutos numa rotação de 1.500 g a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e lavou o precipitado por duas vezes com 5,0 mL de solução salina estéril (a 1.500 g por 5 m a 4° C). Após precipitação celular desprezou o sobrenadante e ressuspendeu as células em 1 mL de RPMI. Realizou a contagem das células para obter a concentração 2×10^5 células por poço de cultura.

Células peritoneais (2×10^5 /mL) foram acondicionadas em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas e incubadas a 37°C, 5% de CO₂, por 24 horas. Após este período procedeu-se lavagem com 1,0 mL de solução salina e em seguida realizou-se a infecção na proporção de 1:10 (bactéria:células fagocíticas), com as linhagens T1 e C57 de *C. pseudotuberculosis*, após 1h30min procedeu-se a coloração das células aderidas às lamínulas com uma mistura dos corantes hematológicos *Wright* e *Giemsa* e a seguir a fixação em lâminas para observação em microscópio óptico.

Para o ensaio de citometria de fluxo (CF) foi utilizada a mesma metodologia de cultivo descrita acima. Após 1h30min da infecção as células aderidas foram ressuspensas utilizando tripsina e em seguida foi realizado a mensuração no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, San Jose, EUA), que permite ajustar o número de eventos celulares para até 10.000, em uma análise automatizada de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter”, granulidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC) e intensidade relativa de fluorescência (FL1) para marcar o DNA bacteriano e para o ensaio de permeabilidade de membrana no canal de intensidade (FL3). No ensaio de fagocitose utilizou-se *DotPlot* de complexidade – SSC por fluorescência específica (FL1), sendo ainda utilizado um sistema de computador contendo o *software CELL Quest* para aquisição, armazenamento e análise imediata ou posterior dos dados referentes ao material estudado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados

A curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* está ilustrada na [Tabela 1](#), onde mostra uma curva padrão de crescimento microbiano, contudo a técnica utilizada permitiu a distinção entres diferentes estados fisiológicos, associados ao sistema de contagem absoluta, o que possibilitou mensurar o número de bactérias viáveis, em injúria e mortas por cada microlitro (µL) presente na suspensão do cultivo ([Figura 1](#)).

Tabela 1. Valores absolutos de contagens bacterianas, diferenciando pelo o estado fisiológico, média dos valores em triplicata.

Tempo	Vivas/µL	Injúria/µL	Mortas /µL	Total/µL
2 h	18,05	33,41	37,8	89,26
6 h	23,45	237,34	52,36	313,15
12 h	1162,84	6447,71	173,88	7784,43
24 h	25182,13	28391,01	1212,62	54785,76
48 h	5264,3	23861,75	3269,56	32395,61
72 h	1866,4	31524,05	5629	39019,45

No ensaio de fagocitose com visualização por microscopia óptica, foi observando uma boa adesão celular em lamínulas. Evidenciando fagocitose por parte de macrófagos e de células compatíveis com linfócitos, em ambas as linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Foi possível visualizar a formação de vacúolos citoplasmáticos nas células fagocíticas, mostrando a ativação devido à presença de microrganismos, provavelmente pela produção de radicais livres e óxido nítrico para combater o microrganismo ([Figura 2](#)).

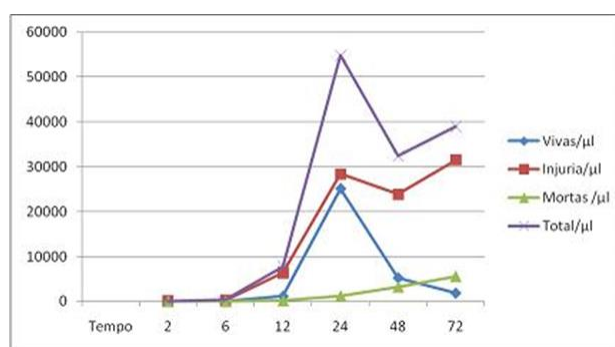


Figura 1. Curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* sem meio BHI por diferentes estados fisiológicos, sendo as vivas (marcação de SYBRsafe exclusivamente), as mortas (IP exclusivamente), células em injúria (coexpressam dos marcadores SYBR e IP) e total as somas das duas populações.

Os dados obtidos na citometria de fluxo vêm corroborar com os dados obtidos por microscopia óptica, evidenciando populações de células fagocíticas contendo bactérias no citoplasma, sendo observadas duas populações envolvidas neste processo. Uma população de baixa complexidade interna, similar à apresentada por linfócitos, e uma população com complexidade interna moderada similar a apresentada por células de origem monocítica ([Figuras 3, 4 e 5](#)).

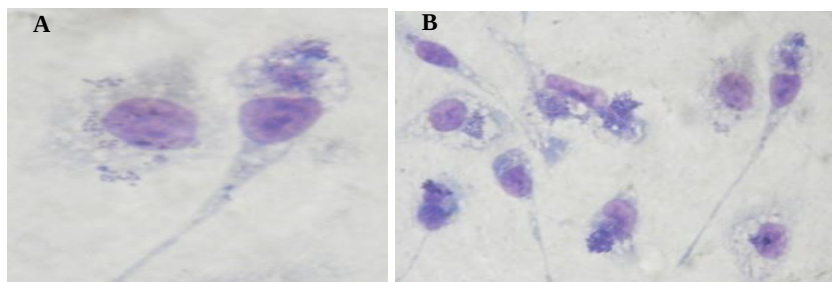


Figura 2. Fotomicrografias ópticas, evidenciando a participação de células fagocíticas em resposta ao microrganismo. Formação de vacúolos citoplasmáticos. **(A):** aumento de 1.000 X, **(B):** aumento de 400 X.

Como pode ser observado nas figuras 4 e 5, existem uma clara diferença entre a complexidade interna nas células provenientes das duas linhagens murinas.

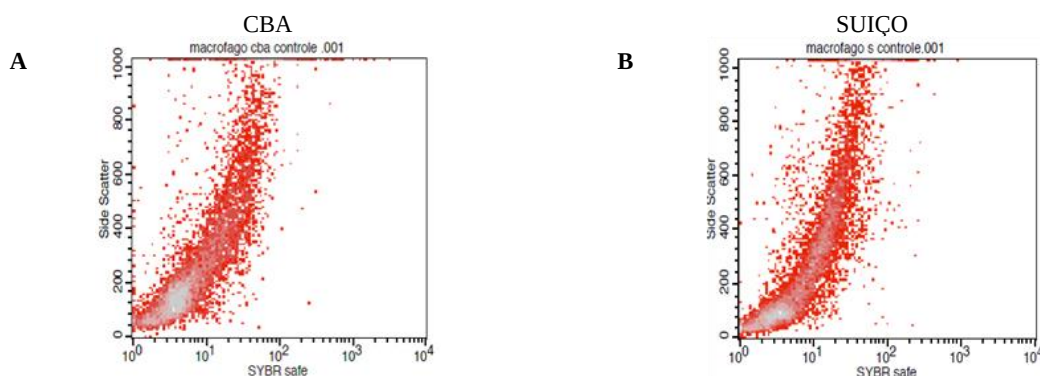


Figura 3. Gráficos *DotPlot*, mostrando à autofluorescência celular. **(A):** linhagem CBA; **(B):** linhagem suíça.

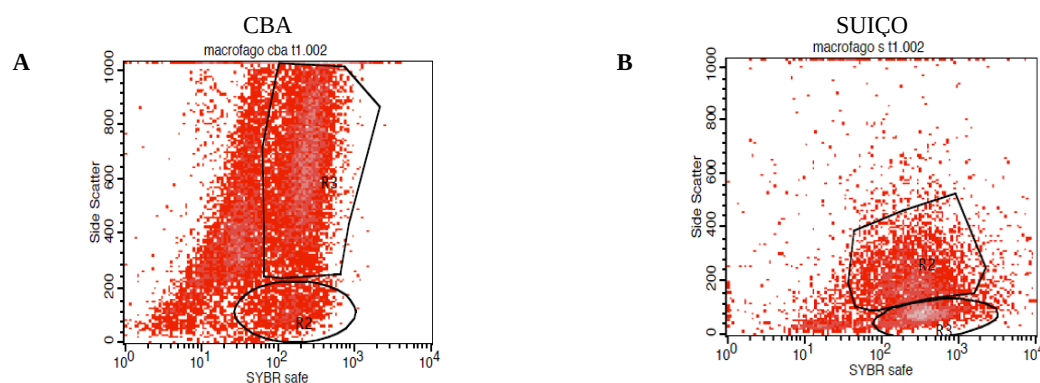


Figura 4. Gráficos *DotPlot*, mostrando a população de macrófagos e células compatíveis com linfócitos participando da fagocitose de microrganismos da linhagem T1. **(A):** linhagem CBA. **(B):** linhagem suíça.

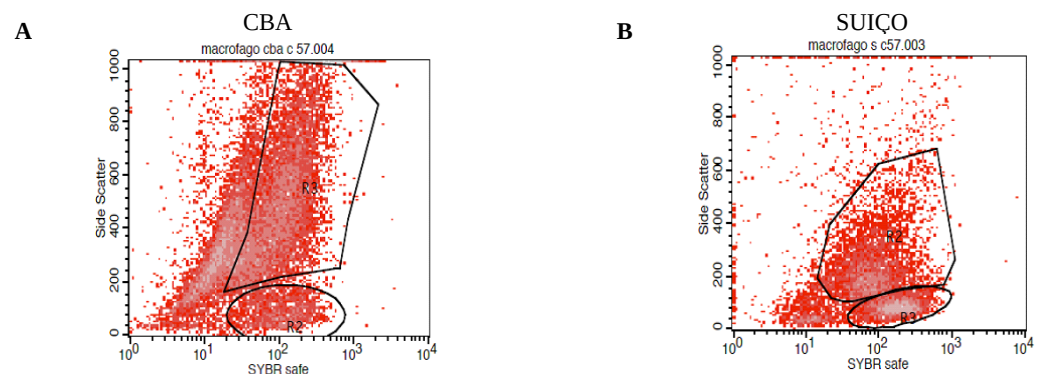


Figura 5. Gráficos *DotPlot*, mostrando a população de macrófagos e células compatíveis com linfócitos participando da fagocitose de microrganismos da linhagem C57. **(A):** linhagem CBA **(B):** linhagem suíça.

As células dos camundongos CBA participando da fagocitose de microrganismos da linhagem T1 apresentam uma maior granulação interna que aquelas encontradas no peritônio dos camundongos da linhagem suíça, sugerindo uma maior ativação celular. O mesmo fenômeno pode ser observado quando as células participam na fagocitose da linhagem C57 (Figura 5).

Os camundongos das linhagens CBA e suíça (Figura 4 e 5) apresentam duas populações participando ativamente da fagocitose. Uma delas é composta por células de tamanho pequeno e de baixa complexidade interna, com dispersão de luz similar à apresentada pelos linfócitos; a outra população é de tamanho médio a grande e de complexidade interna moderada, similar àquela apresentada pela população de macrófagos. Células peritoneais de camundongos CBA apresentaram maior capacidade de fagocitose e um maior envolvimento de células mononucleares fagocíticas nesta atividade. Para a linhagem suíça, observou-se uma maior participação de células compatíveis com linfócitos na fagocitose deste microrganismo (Figuras 6 e 7).

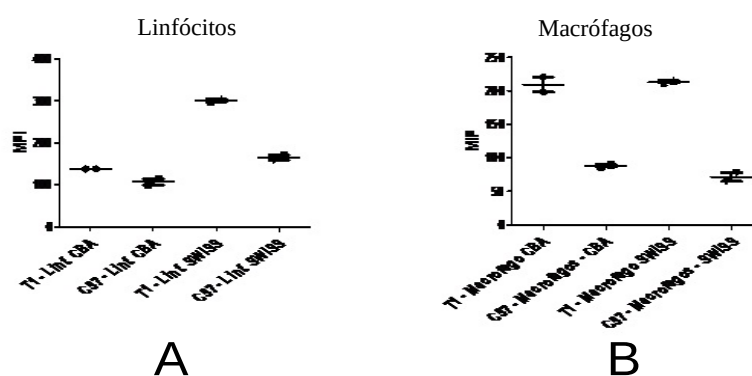


Figura 6. Diferença do MFI entre as duas cepas de *C. pseudotuberculosis*, sendo a intensidade de fluorescência diretamente relacionada com a quantidade de bactéria fagocitada (T1 > C57, $P < 000,1$). (A): células compatíveis com linfócitos. (B): células mononucleares fagocíticas.

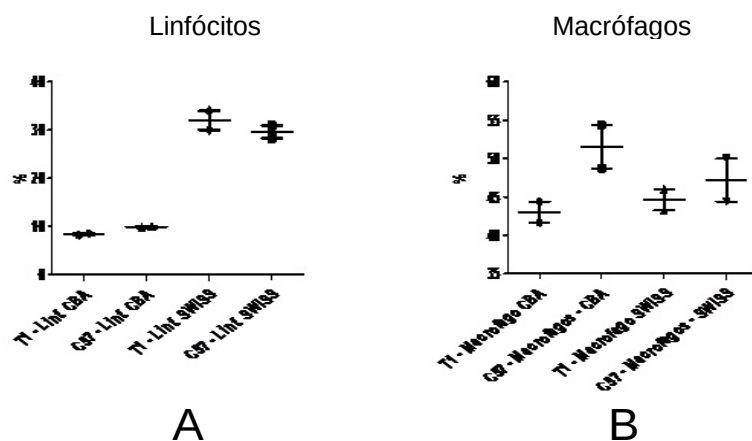


Figura 7. Diferença de percentual de células infectadas, evidenciando um maior percentual de células tipo linfócitos na linhagem de camundongo suíça do que CBA ($P < 000,1$). (A): células compatíveis com linfócitos. (B): células mononucleares fagocíticas.

Comparando-se as cepas bacterianas estudadas, observou-se que a cepa C57 de *C. pseudotuberculosis*, apresentou a média de intensidade de fluorescência (MFI), muito menor em relação à cepa T1 atenuada, nos linfócitos e principalmente nos macrófagos. É importante salientar que a MFI está diretamente relacionada à quantidade de bactérias fluorescentes fagocitadas.

Discussão

As técnicas de cultivo e marcação fluorescente utilizadas no estudo possibilitaram a mensuração e distinção entre diferentes estados fisiológicos dos microrganismos (Sanders & Mourant, 2013). A viabilidade bacteriana é definida de forma clássica, pela capacidade de formarem colônias em meios de cultura sólidos ou proliferarem em meios de cultura líquidos. Isto define que as bactérias estão “vivas”,

com capacidade de replicação, sendo possível quantificá-las. Porém, este sistema de detecção de viabilidade é dependente do seu crescimento, o que só pode ocorrer na presença dos nutrientes corretos e condições de osmose, temperatura e aerobiose ou anaerobiose (Cheswick et al., 2019; Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2012).

Para os microrganismos fastidiosos ou aqueles que não se adaptam as condições artificiais de laboratório o resultado da viabilidade seria negativo, porém a técnica de citometria de fluxo associada ao uso de fluorocromo é capaz de detectar subpopulações dentro de uma população, o que corresponde a diferentes níveis de funcionalidade da célula (Cheswick et al., 2019; Shapiro, 2008). As técnicas de microbiologia clássica utilizadas para monitorar a proliferação e a viabilidade celular apresentam vários inconvenientes. A densidade óptica, o peso seco e a contagem padrão de colônias podem indicar crescimento associado à divisão celular, mas não fornecem informações sobre o estado fisiológico das bactérias (Lobete et al., 2015). O fluorocromo SYBR Green é um ligante da fita dupla de DNA usado com uma boa sensibilidade para detecção e quantificação de microrganismos marcados por citometria de fluxo (Assunção et al., 2006). O SYBR Safe possui uma intensidade de brilho alta, sem relatos de efeitos negativos na viabilidade de microrganismos.

No presente estudo, foi observada uma eficácia de marcação de *C. pseudotuberculosis* sem torno de 95% das bactérias na concentração final 2X do SYBR, diferentemente do estudo realizado por Chapeton-Montes et al. (2008) que utilizou o SYBR safe na concentração final de 20X, esse efeito mostra que a técnica utilizada em nosso estudo obteve um bom padrão de marcação. Na microbiologia, a CF tem mostrado várias potencialidades, nomeadamente no estudo da susceptibilidade a antimicrobianos e a participação no desenvolvimento de novas substâncias com atividades antimicrobianas (Kennedy & Wilkinson, 2017; Pina-Vaz et al., 2005; Pina-Vaz & Rodrigues, 2010). O uso do SYBR safe associado ao IP, permite avaliar microbicidas que atua em nível do DNA ou na parede celular do microrganismo, medindo os diversos parâmetros celulares da bactéria. A necessidade do uso de diferentes técnicas torna-se necessário para avaliar os padrões de susceptibilidade aos diferentes agentes microbicidas e a sua atividade combinada *in vitro* (Shapiro, 2008). Esse fluorocromo associado à poderosa ferramenta que é a citometria de fluxo possibilita avaliar a resistência de um microrganismo para um determinado fármaco, pois em curto período de tempo podemos obter esta informação (Silva et al., 2004).

No presente estudo, tanto a microscopia óptica quanto a citometria de fluxo possibilitaram demonstrar a fagocitose *C. pseudotuberculosis* pelas células peritoneais das duas linhagens de camundongos estudadas. As interações entre as bactérias intracelulares e células hospedeiras, têm sido reportadas utilizando técnicas como microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (CF), baseando-se no uso de diferentes fluorocromos para diferentes estruturas da célula. A CF tem sido utilizado para medir a capacidade das bactérias intracelulares (Kennedy & Wilkinson, 2017; Nebe-von-Caron et al., 2000). Além disto, também foi possível perceber pela técnica de citometria de fluxo, diferenças no padrão da participação na fagocitose em relação às linhagens de camundongos utilizadas, onde se observou uma diferença no percentual de linfócitos participantes no ensaio. A linhagem de camundongos Suíça apresentou um maior percentual de linfócitos participando do processo de fagocitose. Xie et al. (2017), em estudos com linhagem C57BL, observaram que houve alterações no percentual de linfócitos, sendo que esse percentual diminuiu à medida que os camundongos envelheciam; porém, esses estavam livres de patógenos. O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) apresentada pelas células que fagocitaram a cepa C57 foi menor que aquela apresentada pelas células que fagocitaram a cepa T1, nas células do tipo linfócitos e principalmente naquelas com padrão de macrófagos, o que pode representar um mecanismo de escape apresentado pela primeira, uma cepa selvagem, proveniente de um animal apresentando sinais clínicos da doença.

Desta forma, pode-se destacar a aplicabilidade da citometria de fluxo na análise de processos interativos (microrganismos/célula hospedeiro) e tais constatações já foram apresentadas por outros autores, em outros modelos experimentais (Chapeton-Montes et al., 2008). Assim, os resultados aqui apresentados confirmam que a citometria de fluxo é uma importante ferramenta para gerar informações necessárias ao entendimento, com grande precisão, de diversos processos interativos que dependam da

quantificação e caracterização morfológica e funcional na relação entre células parasitas e hospedeiras, no caso específico, entre *C. pseudotuberculosis* e células com atividade fagocítica de peritônio murino.

Conclusões

A técnica de citometria de fluxo com a marcação por fluorescência foi eficaz para a avaliação através da curva de crescimento, permitindo a distinção dos diferentes estados fisiológicos e viabilidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bem como a interação das células bacterianas com as células fagocitárias peritoneais murinas. Além disso, macrófagos e células compatíveis com linfócitos peritoneais de camundongos das linhagens CBA e suíça foram capazes de fagocitar *C. pseudotuberculosis*, observando que a cepa C57 apresentou menor MIF dentro das células peritoneais que a cepa T1, podendo indicar um mecanismo de escape à fagocitose.

Referências bibliográficas

- Álvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C. & Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2):167-195.
- Assunção, P., Rosales, R. S., Rifatbegovic, M., Antunes, N. T., De La Fe, C., Ruiz de Galarreta, C. M. & Poveda, J. B. (2006). Quantification of mycoplasmas in broth medium with sybr green-I and flow cytometry. *Front Biosci*, 11492-497.
- Chapeton-Montes, J. A., Plaza, D. F., Barrero, C. A. & Patarroyo, M. (2008). Quantitative flow cytometric monitoring of invasion of epithelial cells by *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci*, 13650-656.
- Cheswick, R., Cartmell, E., Lee, S., Upton, A., Weir, P., Moore, G. & Jarvis, P. (2019). Comparing flow cytometry with culture-based methods for microbial monitoring and as a diagnostic tool for assessing drinking water treatment processes. *Environment International*, 130104893.
- Cho, S. H., Godin, J. M., Chen, C.-H., Qiao, W., Lee, H. & Lo, Y.-H. (2010). Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Biomicrofluidics*, 4(4):043001.
- Dorella, F. A., Estevam, E. M., Cardoso, P. G., Savassi, B. M., Oliveira, S. C., Azevedo, V. & Miyoshi, A. (2006). An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4):298-303.
- Engelkirk, P. G. & Duben-Engelkirk, J. (2012). Microbiologia para as ciências da saúde. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Guimarães, A. S., Carmo, F. B., Heinemann, M. B., Portela, R. W. D., Meyer, R., Lage, A. P. & Gouveia, A. M. G. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 7(1):68.
- Jelinek, T., Bezdekova, R., Zatopkova, M., Burgos, L., Simicek, M., Sevcikova, T., . . . Hajek, R. (2017). Current applications of multiparameter flow cytometry in plasma cell disorders. *Blood Cancer Journal*, 7(10):1-12.
- Jones, T. C., D., H. R. & King, N. W. (2000). *Patologia veterinária*. São Paulo, Brasil: Manole.
- Kennedy, D. & Wilkinson, M. G. (2017). Application of flow cytometry to the detection of pathogenic bacteria. *Flow Cytometry in Microbiology*, 2321-38.
- Lobete, M. M., Fernandez, E. N. & Van Impe, J. F. (2015). Recent trends in non-invasive *in situ* techniques to monitor bacterial colonies in solid (model) food. *Frontiers in Microbiology*, 6(148):1-9.
- Meyer, R., Regis, L., Vale, V., Paule, B., Carminati, R., Bahia, R. & Freire, S. (2005). *In vitro* IFN- γ production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107(3-4):249-254.
- Morales, N., Aldridge, D., Bahamonde, A., Cerda, J., Araya, C., Muñoz, R. & Abalos, P. (2017). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Patagonian Huemul (*Hippocamelus bisulcus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 53(3):621-624.

- Nebe-von-Caron, G., Stephens, P. J., Hewitt, C. J., Powell, J. R. & Badley, R. A. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1):97-114.
- Pina-Vaz, C., Oliveira, S. C., Rodrigues, A. G. & Espinel-Ingroff, A. (2005). Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9):4674-4679.
- Pina-Vaz, C. & Rodrigues, A. G. (2010). Evaluation of antifungal susceptibility using flow cytometry. *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi*, 638281-289. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-611>.
- Sanders, C. K. & Mourant, J. R. (2013). Advantages of full spectrum flow cytometry. *Journal of Biomedical Optics*, 18(3):037004.
- Shapiro, H. M. (2008). *Flow cytometry of bacterial membrane potential and permeability*: Springer.
- Silva, T. L., Reis, A., Hewitt, C. & Roseiro, J. C. (2004). Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*, 132-40.
- Suhren, G. & Walte, H. G. (2000). First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 35836-48.
- Xie, J., Zhang, J., Wu, H., Tang, X., Liu, J., Cheng, G. & Li, P. (2017). The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1):108-113.
- Yakimov, B. P., Gogoleva, M. A., Semenov, A. N., Rodionov, S. A., Novoselova, M. V., Gayer, A. V. & Armaganov, A. G. (2019). Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis. *Biomedical Optics Express*, 10(8):4220-4236.

Recebido: 17 de outubro, 2019.

Aprovado: 21 de novembro, 2019.

Publicado: 10 de dezembro, 2019

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade acesso aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.