



Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências da Biointeração  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



---

**Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas**

**Aluno: Geraldo Pedral Sampaio**

**Orientador: Prof. Roberto Meyer**

**SALVADOR, BAHIA  
JAN – 2012**

GERALDO PEDRAL SAMPAIO

**Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas.**

Trabalho de Conclusão de Curso do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia na Universidade Federal da Bahia / UFBA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia..

Orientador (a): Roberto José Meyer Nascimento

SALVADOR  
2012

**Salvador, 02 de Janeiro de 2012**

---

**Prof. Roberto Meyer**  
**UFBA/ICS**

---

**Prof. Lílian Costa**  
**UFBA/ICS**

---

**Prof. Vera Vale**  
**UNEB**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

S192 Sampaio, Geraldo Pedral

Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas / Geraldo Pedral Sampaio. – Salvador, 2012.

47 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Biotecnologia 2. Citometria de fluxo. 3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 4. Fagocitose. I. Nascimento, Roberto José Meyer. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 616.15

**“Pois não importa o que eu tenho, e sim o que eu possa fazer com que eu  
tenho”. Jorge Ben**

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais que tanto investiram em mim, que pacientemente enfrentaram a ansiedade da realização desta dissertação, obrigado e desculpem!**

**Aos meus irmãos Sifrêdo, Daniel e Yuri pelas lições de vida e esforço empregado nesta jornada, e que muito me ajudam. Muito obrigado!**

**A minha linda irmã pelo apoio e paciência. Obrigado!**

**A minha linda esposa Camila pela compreensão e estímulo para o término deste desafio.**

**Ao meu lindo filho Rafael, razão da minha vida.**

**Aos professores e colegas de mais uma jornada especialmente ao meu orientador a Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento que aceitou o desafio proposto, pelo valioso tempo que lhe foi roubado, pelo incentivo e dicas. A meu colega e colaborador Ricardo Fraga pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos e toda equipe envolvida no desenrolar do trabalho.**

**Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular / LABIMUNO, especialmente a Dr. Herbert Henrique pelo apoio cedido, e a todo corpo técnico e estudantil envolvido em todo meu aprendizado e conhecimento adquirido.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígeno
<b>BHI</b>	Infusão de cérebro e coração
<b>CEUA</b>	Comitê de ética no Uso do Animal
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático “Enzyme Linked Imunosorbent Assay”
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>ICS</b>	Instituto de Ciências da Saúde
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF</b>	Interferon
<b>iNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintetase
<b>IP</b>	Iodeto de propídeo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS2</b>	Óxido nítrico sintetase 2
<b>MFI</b>	Média de intensidade de fluorescência
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>OH</b>	Radical hidroxila
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SFM</b>	Sistema fagocítico mononuclear
<b>TWENN 80</b>	Polisorbato 80
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Delineamento do ensaio para avaliação da fagocitose. Pág. 23
- Figura 2. Fotomicrografias ópticas, evidenciando a participação de células fagocíticas em resposta ao microrganismo. Formação de vacúolos citoplasmáticos provavelmente pela formação de radicais livres e NO (A, aumento de 1.000 X, B, aumento de 400 X). Pág. 26
- Figura 3. Gráficos *Dot Plot*, mostrando a auto fluorescência celular. A: linhagem CBA; B: linhagem suíça. Pág. 27
- Figura 4. Gráficos *Dot Plot*, mostrando a população de macrófagos e células compatíveis com linfócitos participando da fagocitose de microrganismos da linhagem T1. A: linhagem CBA; B: linhagem suíça. Pág. 27
- Figura 5. Gráficos *Dot Plot*, mostrando a população de macrófagos e células compatíveis com linfócitos participando da fagocitose de microrganismos da linhagem C57. A: linhagem CBA; B: linhagem suíça. Pág. 27

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

- Gráfico 1. Curva de crescimento *Corynebacterium pseudotuberculosis* meio BHI. A técnica de citometria de fluxo permite a distinção dos diferentes estados fisiológicos, sendo as vivas (marcação de SYBRsafe exclusivamente), as mortas (IP exclusivamente), células em divisão (coexpressam dos marcadores SYBR e IP) e total as soma das duas populações. Pág. 25
- Gráfico 2. Diferença entre 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. Pág. 28
- Gráfico 3. 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. Pág. 28
- Tabela 1. Valores absolutos de contagens bacterianos, diferenciando pelo o estado fisiológico, média dos valores em triplicata. Pág. 25



## **Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas.**

**Introdução:** Com o avanço no entendimento de bioprocessos, houve um significativo aumento de novas técnicas que geram diversas informações sobre as interações celulares. Dentre estas técnicas, a citometria de fluxo têm se consolidado como uma importante ferramenta com amplas aplicações, como por exemplo contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, com a análise de vários parâmetros simultaneamente. *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa principalmente em caprinos e ovinos, doença que deprecia o valor do couro e carne no mercado agro-industrial. **Objetivo:** padronizar técnicas, através da citometria de fluxo, para avaliar a contagem absoluta deste microrganismo, bem como aspectos fisiológicos e da interação entre *C.pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. **Metodologia:** Cultivo de *C.pseudotuberculosis* em meio BHI - T80 0,5%, seguido da marcação deste microrganismo com corantes fluorescentes, em diferentes períodos que definem diferentes estados fisiológicos ao longo do seu crescimento. Ensaio de fagocitose utilizando células do peritônio de murinos de duas linhagens após peritonite induzida por Tioglicolato de Sódio, cultivadas e lavadas para aderência celular. Após a adesão celular, foi feito o desafio com bactérias coradas com regente fluorescente, com 1h 30 min de infecção as células aderentes foram tripsinizadas, posteriormente lavadas e centrifugadas para o ensaio por citometria de fluxo. **Resultados:** Observou-se um período de crescimento similar a uma curva padrão de crescimento microbiano (fases lag, log, estacionária e de declínio), contudo a técnica utilizada permitiu a distinção entres diferentes estados fisiológicos. Os dados obtidos na citometria evidenciam 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. 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 nas mesmas condições, sugerindo uma maior ativação celular. O mesmo fenômeno pode ser observado quando as células participam da fagocitose da linhagem C57. Células peritoneais de camundongos CBA apresentaram maior capacidade de fagocitose e nesta linhagem se observou 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. **Conclusões:** A técnica de citometria de fluxo com a marcação por fluorescência foi eficaz para a avaliação do crescimento e viabilidade de *Corynebacterium 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; *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## **Standardization of flow cytometric techniques to assess viability and aspects of the interaction between *C. pseudotuberculosis* and murine phagocytic cells.**

**Summary: Introduction:** With the advancement in the understanding of bioprocesses, there was a significant increase of new techniques that generate information on the various cellular interactions. Among these techniques, flow cytometry has been established as an important tool with broad applications, such as counting, examining and sorting microscopic particles suspended in liquid flow, with the analysis of multiple parameters simultaneously. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of caseous lymphadenitis in goats and sheep mainly, a disease that depreciates the value of the leather and meat market agro-industrial. **Objective:** To standardize techniques by flow cytometry to assess the absolute count of this microorganism, as well as physiological aspects and the interaction between *C. pseudotuberculosis* and murine phagocytic cells. **Methodology:** Growing *C. pseudotuberculosis* on BHI - T80 0.5%, followed by labeling with fluorescent dyes of this microorganism in different periods that define different physiological states during its growth. Phagocytosis assay using murine peritoneal cells of two strains after peritonitis induced by thioglycolate Sodium, washed and cultured for cell attachment. After the cell adhesion, the challenge was done with bacteria stained with fluorescent ruler, with 1h 30 min infection adherent cells were trypsinized, then washed and centrifuged for testing by flow cytometry. **Results:** There was a period of growth similar to a standard curve of microbial growth (lag phase, log, stationary and decline), but the technique used to distinguish different physiological states entres. The data show cytometry in phagocytic cell populations containing the bacterial cytoplasm were observed two populations involved in this process. A population of low internal complexity, similar to that presented by lymphocytes and a population similar to moderate internal complexity by monocytic cells of origin. The cells of CBA mice participating in the phagocytosis of microorganisms have a T1 line more grain than those found inside the peritoneal cavity of mice of Swiss strain under the same conditions, suggesting an increased cellular activation. The same phenomenon can be observed when the cells involved in phagocytosis of strain C57. Peritoneal cells of CBA mice showed higher capacity of phagocytosis and this strain was observed a greater involvement of mononuclear phagocytic cells in this activity. For the Swiss strain, there was greater participation of cells consistent with lymphocytes in the phagocytosis of this microorganism. **Conclusions:** The technique with flow cytometry dialing flowering was effective for the evaluation of growth and viability of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, and the interaction of the bacterial cells with the murine peritoneal phagocytic cells. The CF is, therefore, an efficient technique for assessing the growth curve of these bacteria, allowing the distinction of different physiological states, including may indicate a mechanism to escape phagocytosis.

**Keywords:** Flow Cytometry; bioprocesses; *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e a Linfadenite Caseosa</b> .....	12
<b>2.1.1 O microrganismo</b> .....	12
<b>2.1.2 Prevalência e importância econômica</b> .....	13
<b>2.1.4 - Resposta imune</b> .....	15
<b>2.1.5 - Diagnóstico</b> .....	16
<b>2.2 A utilização da citometria de fluxo (CF)</b> .....	18
<b>2.3 O modelo murino</b> .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	21
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1 Cultivo e marcação fluorescente da bactéria</b> .....	22
<b>4.2 Animais e obtenção de macrófagos</b> .....	22
<b>4.3 Ensaio para avaliação da fagocitose</b> .....	24
<b>5 RESULTADOS</b> .....	25
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

## 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço no entendimento de bioprocessos, houve um significativo aumento de novas técnicas que geram diversas informações sobre as interações celulares. Dentre estas técnicas, a citometria de fluxo têm se consolidado como uma importante ferramenta com amplas aplicações, como por exemplo contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, com a análise de vários parâmetros simultaneamente. Assim, utilizando-se um aparelho de detecção óptico-eletrônico é possível a realização de análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula (BERGQUIST e cols., 2009).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, doença responsável por perdas econômicas graves, com distribuição cosmopolita. A sua caracterização é realizada através de avaliações morfotintoriais, da morfologia colonial, de reações bioquímicas e de métodos da Biologia Molecular (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA, 2006). A utilização da citometria de fluxo possibilitará com precisão se conhecer etapas fisiológicas e viabilidade desta bactéria em cultura para, por exemplo, a obtenção de bioprodutos, o monitoramento do seu crescimento para melhor entendimento de suas interações com células do sistema imune do hospedeiras, dentre outras possibilidades, o que tem sido obtido para outros microrganismos (CHAPETON-MONTES e cols.,2008).

Assim, considerando que os estudos de bioprocessos baseados na citometria de fluxo se constituem em um campo com grandes possibilidades de crescimento devido à sensibilidade de detecção aumentada em relação a outros métodos, o estudo da viabilidade e interação bactéria-célula hospedeira se constitui num importante campo para exploração.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a Linfadenite Caseosa

#### 2.1.1 O microrganismo

*C. pseudotuberculosis* causa a Linfadenite Caseosa em caprinos e ovinos (HOLSTAD & TEIGE, JR., 1988). O gênero *Corynebacterium* é constituído por bactérias pleomórficas, Gram-positivas, imóveis e não esporuladas (LIPSKY e cols., 1982). *C. pseudotuberculosis* é um parasita intracelular facultativo, possui várias formas desde cocóide à filamentosa, com um tamanho de 0,5 a 0,6 µm de diâmetro por 1,0 a 3,0 µm de comprimento, apresenta granulações metacromáticas, é anaeróbia facultativa, catalase positiva e não lipofílica. Produz urease, fermenta glicose e maltose. Apresenta resposta negativa para os testes de esculina, piramidase, hidrólise de gelatina, fermentação do manitol e da xilose. As respostas referentes aos testes da fosfolipase alcalina, fermentação de sacarose e nitrato redutase variam segundo as linhagens (MCNAMARA e cols.,1995; BIBERSTEIN e cols., 1971).

Em cultivo com o meio ágar sangue as bactérias formam colônias de 0,5 mm de diâmetro, esbranquiçadas, ressecadas e com hemólise nítida quando cultivadas por um período de 48 a 72 horas (MCNAMARA e cols.,1995; BIBERSTEIN e cols., 1971). Em meio MacConkey as colônias inicialmente possuem cor creme e após 48 horas tornam-se rosa metacromáticas. *C. pseudotuberculosis* é sensível à exposição ao sol por mais de uma hora, aos desinfetantes comuns e à temperatura superior a 70°C (JUDSON & SONGER, 1991).

Os isolados de *C. pseudotuberculosis* originados de animais domésticos são fenotiticamente heterogêneos, entretanto duas variedades (biovars) podem ser diferenciadas. Em eqüinos estas bactérias reduzem nitrito em nitrato e são caracterizados, desta forma, como biovars equi, enquanto as *C. pseudotuberculosis* presentes nos ovinos e caprinos não reduzem o nitrito em nitrato e são denominados biovars ovis. A análise do DNA destas duas variedades de *C. pseudotuberculosis*, por enzimas de restrição, identifica diferenças entre isolados de biovars equi e ovis,

mas as bases fenotípicas e genotípicas diferenciais para a escolha do hospedeiro de preferência, não foram estabelecidas (COSTA, e cols.,1998; SONGER e cols., 1990; SONGER e cols.,1988).

O genoma das espécies do gênero *Corynebacterium* tem alto conteúdo de G+C, visto que a proporção destes varia de 50 a 70% (RIEGEL, 1994; KRYLOVA & LYSENKO, 1984). Acredita-se que estas espécies possuem um cromossomo circular, totalizando um genoma que varia de 3 a 6,5 Mb (REDENBACH e cols., 2000). Vários plasmídeos, variando de tamanho entre 3 e 8 Kb, já foram descritos (DÉB & NATH, 1999). Entretanto, quatro espécies pertencentes à subordem Corynebacterineae possuem seus genomas completamente seqüenciados: *C. dluaticum* (IKEDA & NAKAGAWA, 2003), *Mycobacterium leprae* (COLE, e cols., 2000), *Mycobacterium tuberculosis* (CAMUS, e cols., 2002; FLEISCHMANN, e cols., 2002) e *C. diphtheriae* (CERDENO-TARRAGA, e cols., 2003). Estas informações são importantes, pois propiciam uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência e patogenicidade utilizados por espécies próximas, através de análises comparativas.

### **2.1.2 Prevalência e importância econômica**

O caráter insidioso da manifestação clínica da linfadenite caseosa, associada à forma essencialmente crônica da patogenia e à sintomatologia pouco específica dificulta o estabelecimento da prevalência. Ademais, outros agentes etiológicos são responsáveis, também, pela formação de granulomas, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp* (UNANIAN e cols., 1985; ARSENAULT e cols., 2003)

Esta prevalência é freqüentemente subestimada, uma vez que esta doença não é uma manifestação que deve ser notificada em muitos países e também pelo fato de muitos criadores dos animais não estão conscientes dos impactos econômicos, não aplicando as orientações veterinárias para o manejo de tal patologia. Entretanto a uma taxa de 8 a 90% de casos reportados em alguns países referentes ao rebanho total (CETINKAYA e cols., 2002).

No Brasil os relatos mais comuns são localizados na região Nordeste com uma alta prevalência nos rebanhos de ovinos e caprinos (COSTA e cols.,1998;

RIBEIRO e cols., 1988; UNANIAN e cols., 1985). Foi observado um percentual médio de 46,66% da prevalência desta doença no semi-árido baiano. Entretanto nas três microrregiões estudadas, a do Baixo e Médio São Francisco evidenciou uma soro-prevalência de 58,01%, a do Piemonte da Diamantina, 37,76% e na microrregião Nordeste constatou-se 31,67%. Para os autores, as variações percentuais apresentam um comportamento relativamente homogêneo, quando se considera à mesma região, e que provavelmente estas diferenças nos percentuais estejam relacionadas com o tamanho da população caprina e as densidades populacionais (MEYER, 2003).

Os prejuízos nesta região do país provocados pela linfadenite são muito grandes, uma vez que muitos dos pequenos criadores têm a caprinocultura como uma das suas principais atividades econômicas (RIBEIRO e cols., 1988) e os abscessos levam a danos à pele e à condenação da carne, principalmente no comércio exterior (EGGLETON e cols., 1991). Além disso, é comprovada uma redução da produção de leite em rebanhos caprinos, em virtude da alta prevalência de granulomas mamários (BURRELL, 1981).

### **2.1.3 - Patogenia**

As principais formas de doença causada por *C. pseudotuberculosis* são: linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, linfangite ulcerativa em equinos, abscessos superficiais em bovinos, suínos, cervos e animais de laboratório, artrites e bursites em ovinos, abscessos de peito em equinos e mais raramente em camelos, caprinos e cervos (KURIA, e cols., 2001; PEPIN e cols., 1994). Nos pequenos ruminantes a doença também é conhecida como mal do caroço ou falsa tuberculose. Na espécie humana causa linfadenite subaguda a crônica e é contraída pelo contato com animais infectados (PEEL e cols., 1997).

A linfadenite caseosa é uma doença que compromete principalmente a pele do animal, uma vez que os abscessos podem drenar naturalmente, gerando soluções de continuidade na pele (AYERS, 1977). Quando ocorrem lesões internas, acarretam perda de peso, deficiência reprodutiva, podendo levar à morte do animal (ASHFAQ; CAMPBELL, 1979; BURRELL, 1981). Pode ocorrer, ainda, diminuição da

produção de lã, em ovinos, ou a condenação da carne (NAIRN & ROBERTSON, 1974).

As lesões granulomatosas são formadas por um centro necrótico contendo pus de cor verde-amarelado, cercado por camadas concêntricas de células do sistema imune delimitadas por uma cápsula de tecido conjuntivo. A consistência do material purulento que evolui de líquido, no início da formação do granuloma, a pastoso, chegando a caseoso nas lesões antigas (PEPIN e cols., 1994).

A patogenia da doença está relacionada com a secreção de uma toxina, uma fosfolipase D, capaz de converter esfingomielina em N-acetoesfingosil (ceramida), uma esfingomielinase (JOLLY, 1965; CARNE & ONON, 1978). A fosfolipase D é capaz de aumentar localmente a permeabilidade vascular, levando à disseminação do patógeno no interior do hospedeiro (HODGSON e cols., 1992). Além desta esfingomielinase lipídios tóxicos associados à parede celular podem mediar a resistência bacteriana ao ataque dos fagócitos (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; HARD, 1975) e uma proteína relacionada ao transporte de ferro produzida pelo gene *Fag B* também está relacionadas com a virulência do *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON e cols., 2002).

Este patógeno é capaz de sobreviver à fagocitose, evitando sua eliminação pelas células do sistema imune, induz resposta inflamatória com formação de tecido fibroso em torno à infecção (PUGH, 2005), produz uma exotoxina (fosfolipase D) que corresponde à fração protéica de 31,5 KDa (ELLIS e cols., 1990; COSTA, 1998) que permite sua disseminação no interior do hospedeiro e possui em sua superfície um lipídeo tóxico, que lhe permite sobreviver no interior dos macrófagos (JONES, T. C e cols., 2000).

#### **2.1.4 - Resposta imune**

Neutrófilos e macrófagos são células predominantes logo após a infecção por *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1965; HARD, 1969), a presença destas células permite o desenvolvimento dos mecanismos da resposta imune inata, que são predominantes nos primeiros dias da infecção, sendo responsáveis em gerar as condições necessárias para o desenvolvimento da resposta adaptativa (LAN e cols., 1999). Além disso, o predomínio inicial de macrófagos está relacionado a uma



rápida resolução da infecção, enquanto que a maior presença de polimorfonucleares neutrófilos levaria, numa etapa seguinte, a uma infecção crônica (JOLLY, 1965).

A resistência adaptativa a infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada a células T CD4. A população, destes linfócitos, pode ser dividida em subpopulações de células T auxiliaadoras tipo 1 (TH1) e células T auxiliaadoras do tipo 2 (TH2). Quando estimuladas, as células TH1 produzem dentre outras citocinas o interferon- gama (IFN-gama) e a interleucina 2 (IL-2), as quais promovem mecanismos efetores celulares da resposta imune, incluindo hipersensibilidade tardia, reações inflamatórias e, no camundongo, a produção de anticorpos da classe IgG2a, os quais são capazes de favorecer, direta ou indiretamente, a opsonização e toxicidade mediada por células. Tais mecanismos efetores são direcionados ao combate a patógenos intracelulares. Por outro lado, após estimulação, as células TH2 produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e promovem síntese de anticorpos IgE e, em camundongos, IgG1, responsáveis pela imunidade humoral e reações alérgicas (MOSMANN e cols., 1986, COFFMAN, 2006). Estas subpopulações exercem um controle recíproco, uma resposta TH1 pode inibir o desenvolvimento de uma resposta TH2 (HOFSTRA e cols., 1998; COTTREZ e cols., 2000) e vice-versa (POWRIE e cols., 1993).

A resposta imune adaptativa eficaz contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*, que é um patógeno intracelular facultativo nos hospedeiros, é dependente das duas populações de linfócitos, células da subpopulação TH1 e células da subpopulação TH2.

### **2.1.5 - Diagnóstico**

Diversos testes foram desenvolvidos para superar o problema do diagnóstico subclínico da LC, mas a maioria não possui sensibilidade e especificidade suficientes. Alguns testes, como o ELISA foram relatados por serem relativamente eficazes em programas do controle da enfermidade. Recentemente, um ELISA para detectar interferon gama (IFN- $\gamma$ ), como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis*, foi desenvolvido. Este teste parece ser mais sensível do que o ELISA convencionalmente utilizado que detecta anticorpos na infecção em cabras, e não parece ser afetado pela vacinação dos animais (Meyer, e

cols. 2005; DORELLA e cols. 2006). Devido aos resultados divergentes obtidos com testes sorológicos desenvolvidos até então (DERCKSEN e cols., 2000, WILLIAMSON, 2001, MENZIES e cols., 2004, DORELLA e cols., 2006), e pela necessidade de diferenciar *C. pseudotuberculosis* de outros agentes patogênicos envolvidos com a sintomatologia de LC, tais como *Arcanobacterium pyogenes* e *Pasteurella multocida*, o isolamento desta bactéria diretamente do material caseoso de linfonodos permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico (RIBEIRO e cols., 2001, WILLIAMSON, 2001). Além disso, quando um teste sorológico é aplicado em estudos de prevalência de LC ou até mesmo em um programa de erradicação dessa doença num rebanho, é necessária a disponibilidade de um teste confirmatório altamente sensível e específico (DERCKSEN e cols., 2000, WILLIAMSON, 2001);

Esse papel ainda é desempenhado pela cultura bacteriológica seguida por identificação bioquímica de isolados. O teste bioquímico bem estabelecido para a identificação de bactérias corineformes é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lês Grottes, France). Esse método que é considerado o padrão-ouro no diagnóstico clínico da enfermidade, consiste de uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 horas. O sistema contém 20 tubos contendo substratos que permitem testes para 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase,  $\beta$ -galactosidase, fosfatase alcalina,  $\alpha$ -glucosidase, N-acetilglucosaminidase,  $\beta$ -glucuronidase, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sucrose e glicogênio). Assim, o desenvolvimento de um método mais rápido e mais específico para detectar *C. pseudotuberculosis* pode ser de grande valor no diagnóstico da LC.

Em 2002, Çetinkaya e cols. propuseram um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial da seqüência do gene do RNA ribossômico 16S (16S rRNA). No entanto, o teste apresentou limitações, incluindo a inability de distinguir a bactéria *C. ulcerans* e a dependência de cultivo bacteriano prévio. Um importante avanço nesta técnica foi conseguido com um ensaio de PCR multiplex, desenvolvido por Pacheco e colaboradores (2007).

## 2.2 A utilização da citometria de fluxo (CF)

Um citômetro de fluxo é um sistema constituído por uma (ou mais) fonte de radiação, uma câmara de fluxo, unidades de filtros óticos para seleção de um dado intervalo de comprimento de onda, fotomultiplicadores para ser possível a detecção, um processador dos sinais e uma unidade que processa os dados recolhidos. A suspensão celular é injetada e atravessa a câmara onde ocorre a passagem célula a célula, através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focalização hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injetada numa solução salina que também atravessa a câmara (SILVA, T. e cols., 2005).

Os métodos analíticos rápidos para contagem bacteriana total em um meio tem como base o princípio da citometria de fluxo. Tais métodos consistem na adição de corante fluorescente, para que o DNA e o RNA sejam corados. Ao receber um feixe de *laser*, cada célula emite fluorescência, a qual é captada pelo sistema óptico e, com isso, o número de células é determinado (SUHREN & WALTE, 2000; BARRIENTOS e cols., 2000; EVANGELISTA, D., 2008).

A citometria de fluxo também possibilita o desenvolvimento de estudos mais detalhados sobre a fisiologia de microrganismos e perturbações resultantes da ação de agentes físicos e químicos, onde é possível examinar, no nível de uma única célula, utilizando inóculos muito menores e uma menor quantidade de reagentes. Permite a obtenção de informações sobre o número e a viabilidade de microrganismos em um período mais curto de tempo, portanto, desempenhando potencialmente um papel útil no desenvolvimento de antimicrobianos e na otimização da produção de bioprodutos (SILVA e cols., 2001; SHAPIRO, 2001).

Muitas informações específicas podem ser extraídas a partir de medições de fluorescência intrínsecas dos constituintes celulares e / ou de aplicação externa por reagentes, muitas vezes referidas como sondas. Entre as sondas comumente utilizadas em citometria de fluxo, os anticorpos e oligonucleotídeos marcados, substratos fluorogênicos de enzimas, corantes que quantificam ácidos nucleicos etc. (BREHM-STECHER & JOHNSON, 2004; DAVEY & KELL, 1996; SHAPIRO, 2000; SHAPIRO, 2003; NEBE-VON-CARON e cols., 2000).

A aderência de bactérias ou dos seus componentes isolados em relação às células do hospedeiro tem sido estudada usando diversas técnicas: microscopia (LENZ e cols, 2000; FINLAY, 2000; HARAKAONGA & PISTOLE, 2004), rotulagem com radioisótopo (NEGM & PISTOLE, 1998;. AZGHANI e cols, 2002; FADL e cols, 2002) e citometria de fluxo. Destas, esta última é uma ferramenta especialmente poderosa para analisar as interações bactéria-hospedeiro, com a vantagem de permitir a análise de um grande número de células em um curto espaço de tempo (RAYBOURNE & BUNNING, 1994; TAGUCHI e cols, 1995; DE BOER e cols, 1996; LOGAN e cols, 1998; GAFORIO e cols, 2002). Além da avaliação rápida e quantitativa, esta ferramenta fornece uma análise com grande sensibilidade da invasão de células epiteliais pulmonares por *M.tuberculosis* marcados com SYBR (CHAPETON-MONTES e cols, 2008). Outra grande vantagem da técnica é a possibilidade da utilização simultânea de marcadores, como o CFSE e o CD11b/CD18, importantes para a observação da expressão de integrinas importantes na interação entre *Leishmania* e macrófagos caninos (GONÇALVES e cols. 2005).

### 2.3 O modelo murino

São incontáveis os artigos existentes na literatura apresentando resultados experimentais em diferentes doenças humanas ou de outros animais domésticos, utilizando o modelo murino. Ademais, tais estudos são facilitados pela grande disponibilidade de reagentes para os mais diversos ensaios biológicos com estes animais.

Os estudos com modelos experimentais murinos permitiram avanços no entendimento da patogênese da *C. pseudotuberculosis*. As primeiras observações das infecções de camundongos com estas bactérias foram realizadas no século XX (WOLFF, 1950). Assim sendo, as linhagens existentes com perfis imunes distintos e as possíveis modificações genéticas, tornam estes animais ferramentas importantes para a elucidação do paradigma parasito hospedeiro em diversas doenças, inclusive para a infecção com o mencionado bacilo, tanto estudando aspectos da resposta imune na linhagem mais amplamente utilizada, Balb/c (VALE e cols., 2005), como

em variantes *knockout* da linhagem C57Bl/6 (GALDINO & SANTOS, 2011). Desta forma, este trabalho traz a padronização de uma tecnologia de uso abrangente, a citometria de fluxo, para avaliar aspectos da relação parasita – hospedeiro, a bactéria *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias, no modelo murino.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- padronizar técnicas, através da citometria de fluxo, para avaliar aspectos da interação entre *C.pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- avaliar, por citometria de fluxo, a viabilidade de *C. pseudotuberculosis* em diferentes tempos de cultura, em meio BHI;

- avaliar a capacidade de fagocitose de células peritônicas de duas linhagens murinas após infecção experimental por *C. pseudotuberculosis*.

- avaliar a viabilidade de *C. pseudotuberculosis* após a fagocitose por macrófagos de duas linhagens murinas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultivo e marcação fluorescente da bactéria

Para a análise da viabilidade foi utilizado a cepa T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, cultivada em meio líquido BHI (infusão de cérebro e coração) com Tween 80 0,5%. Esta concentração deste detergente possibilita o crescimento segregado deste microrganismo. Foram retirados 3,0 mL da cultura com 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. As bactérias foram lavadas (solução salina 0,9%) e centrifugadas por 4 minutos a 8.000g, após o que o sobrenadante foi desprezado, acrescentou-se o SYBR Safe™ (corante que se intercala a fita dupla de DNA, não dependendo de permeabilidade da membrana) e incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Depois da incubação procedeu-se outra lavagem para retirada do excesso dos reagentes, ressuspensão do *pellet* bacteriano e adição de iodeto de propídio, 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 =  $(N^{\circ} \text{beads eventos bacterias} / N^{\circ} \text{ de beads A+B}) \times N^{\circ} \text{ de Beads por } \mu\text{l}$ .

### 4.2 Animais e obtenção de macrófagos

Para a determinação da atividade fagocítica de macrófagos foram utilizados 10 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 foram submetidos à água e ração livres e as condições controladas de iluminação e temperatura. Os animais foram condicionados no laboratório pelo menos uma hora antes do experimento. O protocolo de utilização animais, resumido abaixo (figura 1), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS – UFBA) no processo de número 006/2010.

Figura 1. Delineamento do ensaio para avaliação da fagocitose



Injetou-se 3,0 mL de tioglicolato na cavidade peritoneal, após 4 dias realizou-se sacrifício. Realizou-se a assepsia do abdômen 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-se o precipitado duas vezes com 5,0 mL de solução salina estéril (a 1.500 g por 5 min a 4°C). Após precipitação celular desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de RPMI. Realizou-se a contagem das células para obter a concentração  $2 \times 10^5$  células por poço de cultura.



### 4.3 Ensaio para avaliação da fagocitose

Células peritoneais ( $2 \times 10^5/\text{ml}$ ) foram acondicionadas em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , 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 *Corynebacterium pseudotuberculosis*, após 1h30 min 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 foi utilizada a mesma metodologia de cultivo descrita acima. Após 1h30 min 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 *Dot Plot* de complexidade – SSC por fluorescência específica (FL1), sendo ainda utilizado um sistema de computador contendo o *software CELLQuest* para aquisição, armazenamento e análise imediata ou posterior dos dados referentes ao material estudado.

## 5 RESULTADOS

Após cultivo seriado e análise de diversos pontos de coleta, onde os experimentos foram realizados em triplicata (tabela1), obteve-se uma curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Desta forma foi possível observar-se um período de crescimento similar a uma curva padrão de crescimento microbiano (fases lag, log, estacionária e de declínio), contudo a técnica utilizada permitiu a distinção entres diferentes estados fisiológicos, associados ao sistema de contagem absoluta (tubos Trucount da BD), o que possibilitou se mensurar o número de bactérias viáveis, em injúria e mortas por cada microlitro presente na suspensão do cultivo (gráfico 1).

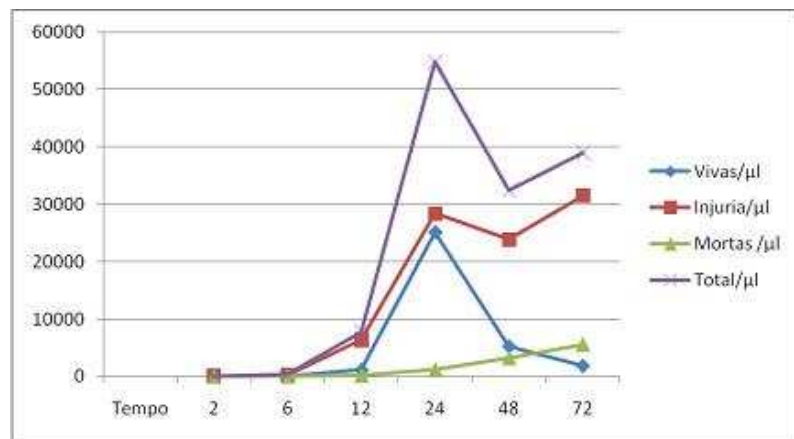


Gráfico 1. Curva de crescimento *Corynebacterium pseudotuberculosis* meio BHI. A técnica de citometria de fluxo permite a distinção dos diferentes estados fisiológicos, sendo as vivas (marcação de SYBRsafe exclusivamente), as mortas (IP exclusivamente), células em injúria (coexpressam dos marcadores SYBR e IP) e total as soma das duas populações.

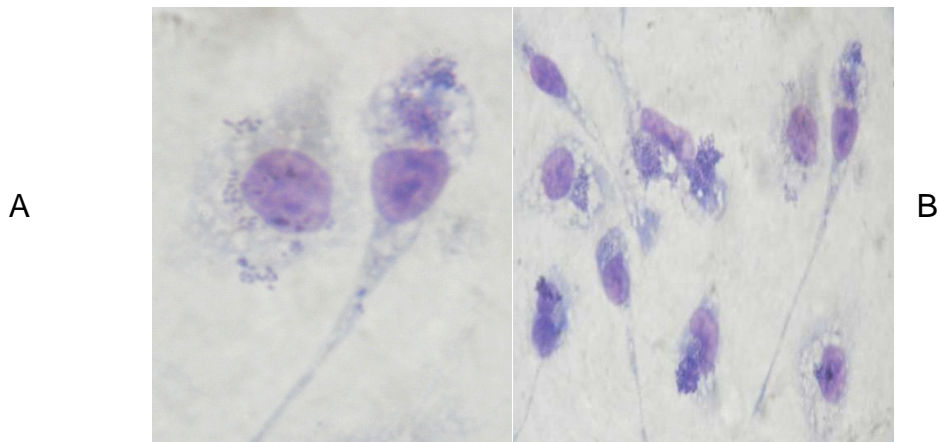
Tabela 1- Valores absolutos de contagens bacterianas, diferenciando pelo o estado fisiológico, média dos valores em triplicata.

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

No ensaio de fagocitose com visualização por microscopia óptica, obteve-se uma boa adesão celular em lamínulas evidenciando fagocitose por parte de

macrófagos e de células compatíveis com linfócitos, em ambas as linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Foi possível visualizar a formação de vacúolos citoplasmáticos nas células fagocíticas, mostrando a ativação devido à presença de microrganismos, provavelmente pela a produção de radicais livres e óxido nítrico para combater o microrganismo (figura 2).

Figura 2. Fotomicrografias ópticas, evidenciando a participação de células fagocíticas em resposta ao microrganismo. Formação de vacúolos citoplasmáticos provavelmente pela formação de radicais livres e NO na linhagem murina CBA (A, aumento de 1.000 X, B, aumento de 400 X).



Os dados obtidos na citometria 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).

Como pode ser observado na figura 4 e 5, existe uma clara diferença entre a complexidade interna nas células provenientes das duas linhagens murinas. 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).

Figura 3. Gráficos *Dot Plot*, mostrando a auto fluorescência celular. A: linhagem CBA; B: linhagem suíça.

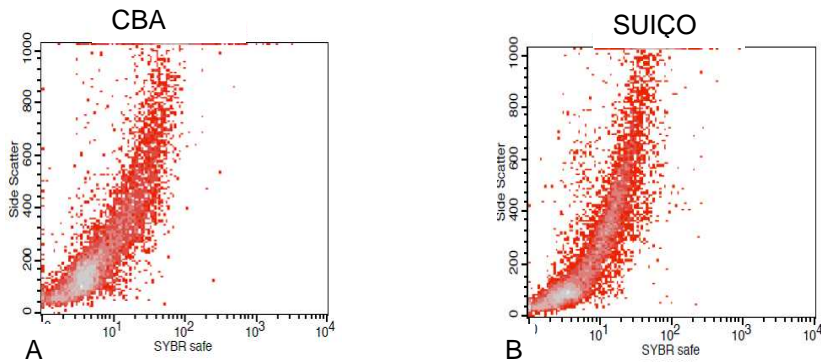


Figura 4. Gráficos *Dot Plot*, mostrando a população de macrófagos e células compatíveis com linfócitos participando da fagocitose de microrganismos da linhagem T1. A: linhagem CBA; B: linhagem suíça.

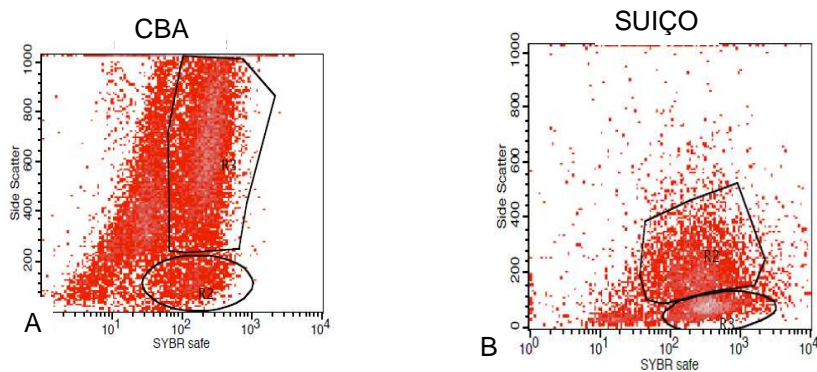
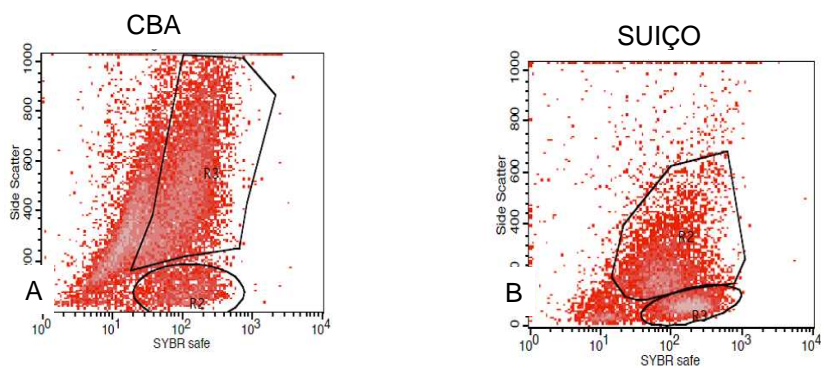


Figura 5. Gráficos *Dot Plot*, mostrando a população de macrófagos e células compatíveis com linfócitos participando da fagocitose de microrganismos da linhagem C57. A: linhagem CBA; B: linhagem suíça.



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 aquela 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 (gráficos 2 e 3).

Comparando-se as cepas bacterianas estudadas, observou-se que a cepa C57 de *Corynebacterium 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.

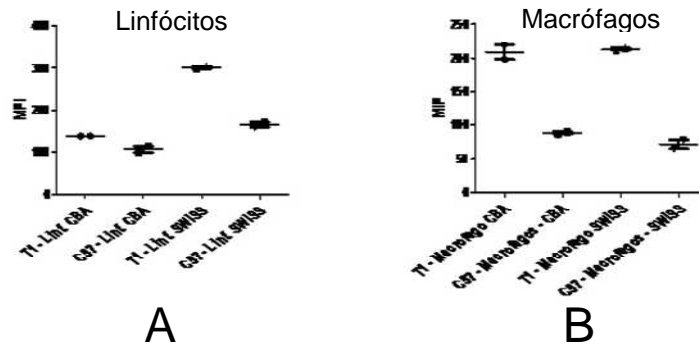


Gráfico 2. Diferença entre MFI entre as duas cepas de *C. pseudotuberculosis*, sendo a intensidade de fluorescência diretamente relacionada com a quantidade de bactéria fagocitada (T1 > C57,  $P < 0,001$ ). A, células compatíveis com linfócitos; B, células mononucleares fagocíticas.

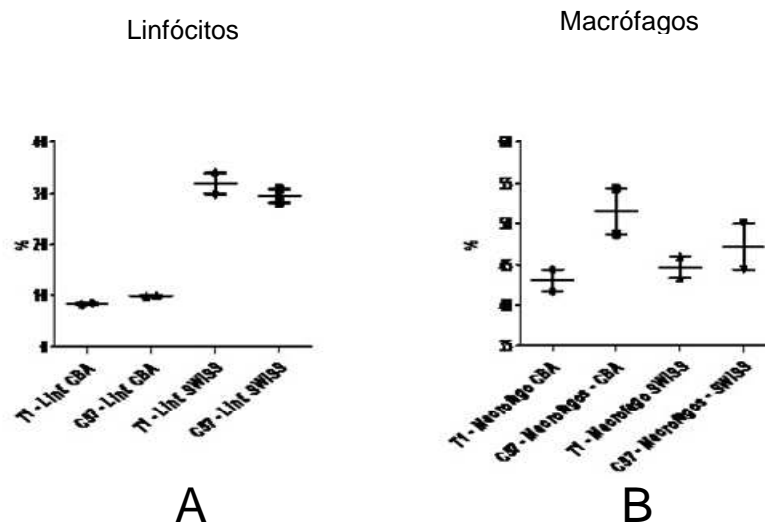


Gráfico 3. Diferença de percentual de células infectadas, evidenciando um maior percentual de células tipo linfócitos na linhagem de camundongo suíça do que CBA ( $p < 0,001$ ). A, células compatíveis com linfócitos; B, células mononucleares fagocíticas.

## 6 DISCUSSÃO

As técnicas de cultivo e marcação fluorescente utilizadas no estudo possibilitaram a mensuração e distinção entre diferentes estados fisiológicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A viabilidade em microrganismos é definida de forma clássica, pela capacidade destes 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 crescimento bacteriano, o que só pode ocorrer na presença dos nutrientes corretos e condições de osmose, temperatura e aerobiose ou anaerobiose.

Para os microrganismos fastidiosos ou aqueles que não se adaptam as condições artificiais de laboratório o resultado da viabilidade seria negativo. A técnica de citometria de fluxo associada ao uso de múltiplos fluorocromos é capaz de detectar subpopulações dentro de uma população, o que corresponde a diferentes níveis de funcionalidade da célula. Desta forma pode ser observado em uma população de células “viáveis”, mas não cultiváveis, sendo metabolicamente ativas e nem estando mortas (FIGUEIREDO, A.N., 2010; SHAPIRO, H.M; 2007).

As técnicas de microbiologia clássica utilizadas para monitorizar a proliferação e a viabilidade celular apresentam vários inconvenientes. A densidade óptica, o peso seco e a contagem padrão de colônias dão uma indicação do crescimento associado à divisão celular, mas não dão maiores informações sobre o estado fisiológico das bactérias. 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 (P. ASSUNCAO e cols., 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 *Corynebacterium pseudotuberculosis* em torno de 95% das bactérias em na concentração final 2X do SYBR, diferentemente do estudo realizado por Chapeton-Montes e cols, 2008, que utilizou o SYBR safe na concentração final de 20X.

O primeiro ponto da curva foi realizado apenas 2 horas após o inóculo, com uma concentração inicial de 890 células/mL. O tempo de geração (tempo necessário para que uma célula se duplique) é variável para as diferentes espécies bacterianas, podendo ser de 10 a 20 minutos ou até dias. Estes achados corroboram com dados

obtidos por Figueiredo (2010) que utilizou cepa *Escherichia coli* Dh10b o qual possui um tempo de geração (2344 células/mL) mais curto que a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Este experimento apresentou as fases Lag e Log semelhantes entre as curvas de crescimento, entretanto a técnica permite distinguir o declínio de populações de células viáveis após 24 horas de cultivo e um leve declino da populações de células em injúria (Santiago L.B e cols.,2010). Com 48 horas há um discreto aumento de células no momento de injúria fisiológica, junto com o aumento de bactérias em processo de morte, evidenciando o controle do crescimento populacional, onde ocorre uma maior disputa pelos poucos nutrientes ainda presentes no meio, em consequência do aumento de metabolitos tóxicos presentes no meio.

Na Microbiologia, a CF tem mostrado várias potencialidades, nomeadamente no estudo da susceptibilidade a antimicrobianos (PINA-VAZ, 2010; RAMANI e cols., 1997; RUDENSKY e cols., 2005) e a participação no desenvolvimento de novas substancias com atividades antimicrobianas. O uso do SYBR safe associado ao IP, permite avaliar microbicidas que atuam em nível do DNA e/ou a parede celular do microrganismo, medindo os diversos parâmetros celulares da bactéria. A necessidade do uso de diferentes técnicas torna-se necessário avaliar de modo eficaz e em tempo útil os padrões de susceptibilidade aos diferentes agentes microbicidas e a sua atividade combinada in vitro (SHAPIRO, 2007), associadas a poderosa ferramenta que é a citometria de fluxo a possibilidade para se avaliar a resistência de um microrganismo para um determinado fármaco, pois em curto período de tempo podemos obter esta informação.

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 diferente fluorocromos para diferentes estruturas da célula. A CF tem sido utilizado para medir a capacidade das bactérias intracelulares (Ex.: *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*) para invadir a linhagem celular de macrófagos murinos J774A (RAYBOURNE & BUNNING., 1994).

Esta técnica também tem sido utilizada no estudo da biologia de *M. tuberculosis* para identificar os antígenos de superfície celular (OZANNE, V., e cols.,1996), perfil proteínas secretadas, interações com o sistema imune (BONECINI-ALMEIDA.,2000) e para determinar a suscetibilidade a drogas. A marcação bacteriana tem facilitado a observação dos processos de invasão, permitindo a distinção entre as células-alvo invadidas e não invadidas.

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.

A 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 micróbio – célula e tais constatações tem sido apresentadas por outros autores, em outros modelos experimentais (CHAPETON-MONTES e cols.,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.



## 7 CONCLUSÕES

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

## REFERÊNCIAS

- ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C. ; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, v. 59 , p. 67–81, 2003.
- ASHFAQ MK, CAMPBELL SG. 1979. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. *Vet Med Small Anim Clin* 74(8): 1161-1165.
- AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *JAVMA*, n. 171, p. 1251-1254, 1977
- AZGHANI AO, IDELL S, BAINS M, HANCOCK RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is na adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog* 2002;33:109–114.
- BARRIENTOS, A.A.; ARROYO, J. CANTÓN, R. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, p.167-195, 2000.
- BATEY, R. G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. *Vet.Microbiol.*, v. 11, n
- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.*, n. 63, p. 269-272, 1986b.
- BAIRD GJ, FONTAINE MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Pathol*. 2007; 137: 179-210.
- BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. *Commonwealth Bureau of Animal Health*, n. 32, p. 645-657, 1962.
- BERGQUIST, P.L., HARDIMAN, E.M., FERRARI, B.C., AND WINSLEY, T. (2009). Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* 13, 389-401.
- BIBERSTEIN EL, KNIGHT HD, JANG S. 1971. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Rec* 89(26):691-692.
- BILLINGTON SJ, ESMAY PA, SONGER JG, JOST BH. 2002. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 208(1): 41-45.
- BONECINI-ALMEIDA MG 2000. Modelos animais para o estudo in vivo da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos. Macacos. In TC Araújo-Jorge, SL

de Castro (eds), *Doença de Chagas: Manual de Experimentação Animal*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 134-174.

BREHM-STECHER, B., AND JOHNSON, E. A. (2004) Single-cell microbiology: Tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 538–559.

BROWN CC, OLANDER HJ, ALVES SF. Synergistic haemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in slaughterhouse suvery of goats and sheep in northeastern brazil. *Can J Vet Res.* 1987; 51: 46-9.

BURRELL DH. 1981. Caseous lymphadenitis in goats. *Aust Vet J* 57(3): 105-110.

CAMERON, M.L., SCHELL, W.A., BRUCH, S., BARTLETT, J.A., WASKIN, H.A., AND PERFECT, J.R. (1993). Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 2449-2453.

CAMUS JEAN-CHRISTOPHE, MELINDA J. PRYOR, CLAUDINE MDIGUE, AND STEWART T. COLE Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* 2002; 148: 2967 - 2973.

CARNE HR, ONON EO. 1978. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature* 271(5642):246-248.

CERDENÕ-TA´RRAGA, A. M., EFSTRATIOU, A., DOVER, L. G., HOLDEN, M. T., PALLEN, M., BENTLEY, S. D., BESRA, G. S., CHURCHER, C., JAMES, K. D. & other authors (2003). The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129. *Nucleic Acids Res* 31, 6516–6523.

CETINKAYA B, KARAHAN M, ATIL E, KALIN R, DE BAERE T, VANEECHOUTTE M. 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88 (1): 75-83.

CHAPETON-MONTES, J.A., PLAZA, D.F., BARRERO, C.A., AND PATARROYO, M.A. (2008). Quantitative flow cytometric monitoring of invasion of epithelial cells by *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Biosci.* 13, 650–656.

CHATURVEDI, V., RAMANI, R., AND PFALLER, M.A. (2004). Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 42, 2249-2251.

COLE ST, HONORE N, EIGLEMEIER K. Preliminary analysis of the genome sequence of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2000; 71(Suppl.):S162-167.

COSTA, L. R. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet. Microbiol.*, n. 62, p. 135-143, 1998.

- DAVEY, H. M., AND KELL, D. B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations—The importance of single-cell analyses. *Microbiol.Rev.* **60**, 641–696.
- de BOER EC, BEVERS RF, KURTH KH, SCHAMHART DH. Double fluorescent flow cytometric assessment of bacterial internalization and binding by epithelial cells. *Cytometry* 1996;25:381–387.
- DEB JK, NATH N. 1999. Plasmids of corynebacteria. *FEMS Microbiol Lett* 175: 11-20.
- DERCKSEN DP, BRINKHOF JM, DEKKER-NOOREN T, MAANEN K, BODE CF, BAIRD G, KAMP EM. 2000. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol* 75(2):167-175.
- DORELLA, F ; ESTEVAM, E ; CARDOSO, P ; SAVASSI, B ; OLIVEIRA, S ; AZEVEDO, V ; MIYOSHI, A . An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology (Amsterdam), Estados Unidos*, v. 114, p. 298-303, 2006.
- EGGLETON DG, DOIDGE CV, MIDDLETON HD, MINT DW. 1991. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: Comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust Vet J* 68: 317-319.
- ELLIS, e cols. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. *J.A.V.M.A.*, v. 196, p. 1609-1613, 1990.
- EVANGELISTA, D. T. Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos. 2008. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FADL AA, VENKITANARAYANAN KS, KHAN MI. Identification of *Salmonella enteritidis* outer membrane proteins expressed during attachment to human intestinal epithelial cells. *J Appl Microbiol.* 2002;92:180–186.
- FIGUEIREDO, ANA REIS DE., 2010. Mineração de Dados Citométricos: Obtenção de Conhecimento de Padrões Celulares para Otimização de Processos Biotecnológicos/ Ana Reis de Figueiredo – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010. Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/ Programa de Engenharia Civil, 2010.
- FINLAY BB. Fluorescence and confocal microscopy reveal host-microbe interactions. *ASM News* 2000;66:601–608.
- FLEISHCHMANN RD, ALLAND D, EISEN JA, CARPENTER L, WHITE O, PETERSON J, DEBOY R, DODSON R, GWINN M, HAFT D, HICKEY E, KOLONAY JF, NELSON WC, UYAMAM LA, ERMOLAEVA M, SALZBERG SL, DELCHER A, UTTERBACK T, WEIDMAN J, KHOURI H, GILL J, MIKULA A, BISHAI W, JACOBS JR. WR, VENTER JC, AND FRASER CM Whole-genome comparison

of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* 2002; 184(19): 5479 - 5490.

GAFORIO JJ, SERRANO MJ, ORTEGA E, ALGARRA I, ALVAREZ DE CIENFUEGOS G. Use of SYTOX green dye in the flow cytometric analysis of bacterial phagocytosis. *Cytometry* 2002;48:93–96.

GONÇALVES, R.; VIEIRA, E.R.; MELO, M.N.; GOLLOB, K.J.; MOSSER, D.M.; TAFURI, W.L. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. infantum* chagasi to canine peritoneal macrophages. *BMC. Infect. Dis.*, v.24, p.39, 2005.

HARD GC. 1975. Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect Immun* 12: 1439-1449

HARA-KAONGA B & PISTOLE TG. OmpD but not OmpC is involved in adherence of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium to human cell. *Can J Microbiol* 2004;50:719–727.

HEDDEN J.A.; CYNTHIA T.; SONGER J.G.; OLSON B.G. Characterization of lectinbinding lymphocytes in goat with caseous lymphadenitis. *American Journal of Veterinary Research.* 47 (6): 1265-1267. 1986.

HODGSON AL, KRYWULT J, CORNER LA, ROTHEN JS, RADFORD AJ. 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect Immun* 60: 2900-2905.

HOLSTAD G, TEIGE J JR. 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. VII. Clinical, pathological, serological and hematological changes after subcutaneous inoculation of the organism. *Acta Vet Scand* 29(3-4):287-294.

HOLSTAD G, TEIGE J JR. 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. VI. Clinical and pathological changes after intravenous inoculation of the organism. *Acta Vet Scand* 29(3-4): 281-286.

IKEDA, M., AND S. NAKAGAWA. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:99–109.

JOLLY RD. 1965. Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis*. *NZ Vet J* 13: 148-153.

JOLLY RD. 1965. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *NZ Vet J* 13: 141-147.

JOLLY RD. 1965. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. *J Comp Pathol* 75: 417-431.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. Editora Manole, 6ª ed. 2000. 499-508p.

JUDSON R, SONGER JG. 1991. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet Microbiol* 27(2): 145-150.

KRYLOVA MD, LYSENKO AM. 1984. [DNA homology study of *Corynebacterium diphtheriae* v. *gravis* groups I, II and III, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis (ovis)*] *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (3): 48-55

KURIA JK, MBUTHIA PG, KANG'ETHE EK, WAHOME RG. 2001. Caseous lymphadenitis in goats: The pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet Res Commun* 25 (2): 89-97.

LENZ DH, WEINGERT CL, WEISS AA. Phagocytosed *Bordetella pertussis* fails to survive in human neutrophils. *Infect Immun* 2000;68:956–959.

LIPSKY BA, GOLDBERGER AC, TOMPKINS LS, FLORDE JJ. 1982. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Rev Infect Dis* 4(6): 1220-1235. *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, (*Corynebacterium ovis*), *Corynebacterium haemolyticum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium xerosis*, and corynebacteria of group JK.

LOGAN RPH, ROBINS A, TURNER GA, COCKAYNE A, BORRIELLO SP, HAWKEY CJ. A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J Immunol Methods* 1998;213:19–30.

McNAMARA, P. J.; CUEVAS, W. A.; SONGER, J. G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene*, n. 156, p. 113-118, 1995.

MEYER R, REGIS L, VALE V, PAULE B, CARMINATI R, BAHIA R, e cols. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 107: 249-54.

MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da prevalência, do diagnóstico e da imunidade. 2003. Tese (Doutorado em Imunologia) no Instituto de Ciências da Saúde Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *R. Ci. Méd. Biol.*, v. 1, n. 1, p. 42-48, nov. 2002.

MENZIES, P.I.; HWANG, T.-I.; PRESCOTT, J.F. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of

*Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.*, v. 100, p.129– 137, 2004.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A., *Bacteriología y Virología Veterinarias*. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1975. p. 437-452

MOURA-COSTA, L.F. (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológicoda linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.*, Salvador, v. 1, n. 1, p. 105-115, nov. 2002.

MOSMANN, T. R, H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN, AND R L. COFFMAN. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can. J. Comp. Med.*, n. 46, p. 206-208, 1982

M. G. Bonecini-Almeida: Flow cytometry as a tool to identify *Mycobacterium tuberculosis* interaction with the immune system and drug susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 491-494 (2000)

NAIRN ME, ROBERTSON JP. 1974. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: Role of skin lesions and dipping fluids. *Aust Vet J.* 50 (12): 537-542.

NEGM RS & PISTOLE TG. Macrophages recognize and adhere to an OmpD-like protein of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;20:191–199. NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P. J., HEWITT, C. J., POWELL, J. R., AND BADLEY, R. A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Meth.* **42**, 97–114. (Note: The full text of this paper may be downloaded without charge from <http://www1.elsevier.com/homepage/sah/mimet/speciss/1378.pdf>.)

NOBLE, R & FUHRMAN, J.A; 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol* 14: 113-118.

OZANNE, V.; ORTALO-MAGNE, A.; VERCELLONE, A.; FOURNIE, J. AND DAFPE, M. Cytometric detection of mycobacterial surface antigens: exposure of mannosyl epitopes and of the arabinan segment of arabinomannans. *J Bacteriol* 178, 7254-7259 (1996)

PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; FROTA, M.N.L.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; ALVES, F.S.F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR Assay for Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Pure Cultures and for Rapid Detection of this Pathogen in Clinical Samples. *J. Med. Microbiol.*, v. 56, p. 480-486, 2007

PEEL MM, PALMER GG., STACPOOLE AM., KERR TG. 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*:Report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis* 24: 185-191.

PÉPIN M, PATON M, HODGSON LM. 1994. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Curr. Top. Vet. Res.* 1:63-82.

PINA-VAZ C, R.A. (2010). Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry Methods *Mol Biol* 9, 638:281.

PINA-VAZ, C., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., RODRIGUES, A.G., AND ESPINEL-INGROFF, A. (2005). Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 43, 4674-4679.

PINA-VAZ, C., SANSONETTY, F., RODRIGUES, A.G., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J., AND FONSECA, A.F. (2001A). Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J Med Microbiol* 50, 375-382.

PINA-VAZ, C., SANSONETTY, F., RODRIGUES, A.G., COSTA-OLIVEIRA, S., TAVARES, C., AND MARTINEZ-DEOLIVEIRA, J. (2001b). Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin Microbiol Infect* 7, 609-618.

POWRIE, F., M.W. LEACH, S. MAUZE, L.B. CADDLE, AND R.L. COFFMAN. 1993. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 5:1461–1471.

PUGH, D. G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: Roca, 2005. 140-141p.

P. ASSUNCAO, R. S. ROSALES, M. RIFATBEGOVIĆ, N. T. ANTUNES, C. DE LA FE, C. M. RUIZ DE GALARRETA AND J. B. POVEDA: Quantification of mycoplasmas in broth médium with sybr green-I and flow cytometry. *Front Biosci* 11, 492-497 (2006)

QUINN, P. J. e cols. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolf Publishing, 1994. p. 137-143.

RAMANI, R., RAMANI, A., AND WONG, S.J. (1997). Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 35, 2320-2324.

RAYBOURNE RB & BUNNING VK. Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. *Infect Immun* 1994;62:665–672.

REDENBACH M, SCHEEL J, SCHMIDT U. 2000. Chromosome topology and genome size of selected actinomyces species. v. 78, n. 3-4, p. 227-235

RIEGEL P, DE BRIEL D, PREVOST G, JEHL F, MONTEIL H. 1994. Genomic diversity among *Corynebacterium jeikeium* strains and comparison with biochemical characteristics and antimicrobial susceptibilities. *J Clin Microbiol* 32(8):1860-1865.



RIBEIRO OC, SILVA JAH, PEREIRA FILHO M. 1988. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. Rev Bras Med Vet 10: 23-24.

RIBEIRO, M.G.; JÚNIOR, J.G.D.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; JÚNIOR, G.N.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. Arq. Inst. Biol., v. 68, p. 23-28, 2001.

RUDENSKY, B., BROIDIE, E., YINNON, A.M., WEITZMAN, T., PAZ, E., KELLER, N., AND RAVEH, D. (2005). Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. J Antimicrob Chemother 55, 106-109.

SANGLARD, D., AND ODDS, F.C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2, 73-85.

SANTIAGO, L. B. ; ALVES, F.S.F. ; PINHEIRO, R. R. ; SANTOS, V. W. S. ; RODRIGUES, A. S. ; CHAPAVAL, Lea ; BRITO, I. F. ; SOUSA, Francisca Geovânia C de . Avaliação in vitro da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento. Arquivos do Instituto Biológico (Online), v. 77, p. 593-600, 2010.

SHAPIRO, H. M. (2000) Microbial analysis at the single-cell level: Tasks and techniques. *J. Microbiol. Meth.* **42**, 3–16. (Note: The full text of this paper may be downloaded without charge from <http://www1.elsevier.com/homepage/sah/mimet/speciss/1368.pdf>.)

SHAPIRO, H. M. (2003) *Practical Flow Cytometry*, 4th ed. Wiley-Liss, Hoboken, NJ - available online at: <http://probes.invitrogen.com/products/flowcytometry/practicalflowcytometry.html>

SHAPIRO, H.M; Flow Cytometry of Bacterial Membrane Potential and Permeability; Series: Methods in Molecular Medicine | Volume: 142 | Pub. Date: Dec-01-2007 | Page Range: 175-186 | DOI: 10.1007/978-1-59745-246-5\_14

SILVA TL, REIS A, HEWITT C, ROSEIRO JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Bol Biotecnol, p.32-40, 2001.

SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. Bulletin of the IDF, n. 358, p.36-48, 2000.

SMITH PB. Large animal internal medicine. 4th. St Louis: Mosby; 2003.

SONGER, J. G. e cols. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am. J. Vet. Res., v. 49, n. 2, p. 223-226, 1988.

SONGER JG, LIBBY SJ, IANDOLO JJ, CUEVAS WA. 1990. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58(1):131-136.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Vet. Microbiol.*, n. 49 p. 1-9, 1996.

TAGUCHI H, OSAKI T, YAMAGUCHI H, KAMIYA S. Flow cytometric analysis using lipophilic dye PKH-2 for adhesion of *Vibrio cholerae* to Intestine 407 cells. *Microbiol Immunol* 1995;39:891–894.

TASHJIAN JJ, CAMPBELL SG. 1983. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: An electron microscopic study. *Am J Vet Res* 44(4): 690-693.

UNANIAN MM, FELICIANO SILVA AE, PANT KP. 1985. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Trop Anim Health Prod* 17(1): 57-62.

WILLIAMSON LH. 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17 (2): 359-371. [Lwilliam@vet.uga.edu](mailto:Lwilliam@vet.uga.edu)

WOLF, S. Effects of suggestion and conditioning on the action of chemical agents in human subjects – The pharmacology of placebos. *Journal of Clinical Investigation*, v. 29, p. 100-109, 1950.

VALE, V., Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2000. Dissertação- (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

VALE, V. L. C. ; RCARMINATI ; CARMINATI, R. ; COSTA, L. M. ; SCHAER, R. ; SCHAER-BARBOSA, H. ; REGIS, L. F. ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. . Evaluation of the subclasses of immunoglobulin IgG in Balb/ c immunized with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005, São Pedro - S. P.. XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005. p. 254-254.