

# **APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MICROBIOLOGÍA, VETERINARIA Y AGRICULTURA**

## **APPLICATIONS OF FLOW CYTOMETRY IN MICROBIOLOGY VETERINARY SCIENCE AND AGRICULTURE**

José Laguado, M.Sc.

BD Biosciences, Becton Dickinson de Colombia Ltda, Calle 20 No. 44-41 Bogotá DC, Colombia. Correspondencia: jglaguado@hotmail.com

Recibido: Agosto 22 de 2007; Aceptado: Noviembre 12 de 2007

### **RESUMEN**

La citometría de flujo es un método automatizado, multiparamétrico y cuantitativo que analiza las señales dispersadas y fluorescentes producidas por una célula al pasar por un haz de luz. El potencial de los nuevos métodos de análisis en el laboratorio en el campo de la microbiología viene creciendo de manera enorme en los últimos años donde la citometría de flujo se ha consolidando como una herramienta rápida, sencilla, suficientemente sensible, económica, de fácil automatización para las crecientes necesidades de desarrollo de Colombia. La citometría permite obtener información sobre la fisiología, morfología, genética y diversidad de microorganismos, animales y plantas. Las variadas aplicaciones de la citometría en la microbiología de alimentos, la microbiología ambiental, la medicina veterinaria y la agricultura busca ahora complementar o reemplazar técnicas ya existentes adaptándonos a la continua evolución de las necesidades de los mercados globales de la ciencia y la economía.

**Palabras clave:** Citometría de flujo, microbiología, veterinaria, agricultura.

### **ABSTRACT**

Flow cytometry, an automated, multiparametric and quantitative method, analyzes the scattering and fluorescence signals produced as series of single cell pass through a laser beam. The potential of the new methods of analysis in the microbiology laboratory has grown enormously in the past few years and flow cytometry has consolidated itself as a fast, simple, sensitive, economic and automated analysis tool for the increasing development needs of Colombia. Accordingly, flow cytometry can be used to obtain data on the physiology, morphology, genetics and diversity of microorganisms, animals and plants. The diverse flow cytometric applications in food and, environmental microbiology, veterinary medicine and agriculture can complement or replace existing techniques in order to adapt research laboratories to the growing necessities of the global science and economy markets.

**Key words:** Flow cytometry, microbiology, veterinary, agriculture.

## INTRODUCCIÓN

Citometría es un término genérico que se aplica a cualquier tecnología que se usa para la medición, recuento, comparación u otra caracterización de células. La citometría de flujo es una tecnología de rápido crecimiento y desarrollo que permite examinar muchas propiedades de un gran número de células en poco tiempo. Algunos autores (1) definen a la citometría de flujo como una tecnología analítica que permite la medición simultánea de varias características de muestras biológicas. Se pueden realizar recuentos celulares, para separar células o para realizar análisis de marcadores bien sean de superficie o intracelulares (1). Desde sus inicios en la década del 70 para el estudio de poblaciones de células en inmunología la citometría se convirtió en una técnica cuantitativa apreciada, de baja complejidad, económica y fácil de mantener en el laboratorio dada la evolución en la química de los reactivos y modernidad de los instrumentos. Ésta se ha convertido en un método innovador de análisis que permite tener una aproximación lo suficientemente sensible, específica y rápida para diversas aplicaciones en estudios básicos (2,3), microbiología clínica (4) y recientemente en biotecnología (5).

Son extensos los beneficios de aplicar la citometría de flujo en el laboratorio. Algunos ejemplos son: identificación rápida de microorganismos de interés clínico (6), estudios de susceptibilidad o resistencia a medicamentos (7), disminución de los tiempos de procesamiento, análisis y toma de decisiones terapéuticas (8) o la detección temprana de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes (9,10). Asimismo, en la microbiología ambiental presenta nuevas oportunidades para entender la adaptación de los microorganismos a ambientes extremos, nuevos ecosistemas o para realizar la

detección rápida de bacterias o virus que son viables pero se encuentran en un estado no cultivable y por lo tanto no detectable por métodos convencionales de cultivo. Si bien muchas estrategias de cultivo redundan en los aislamientos previstos de diferentes fuentes naturales, la gran variedad filogenética y fisiológica de estos aislamientos demuestran la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de detección cualitativa y cuantitativa. Los análisis por citometría de flujo proveen información sobre el número de células, los tamaños del genoma, la variabilidad de las poblaciones, entre otras características (11-13).

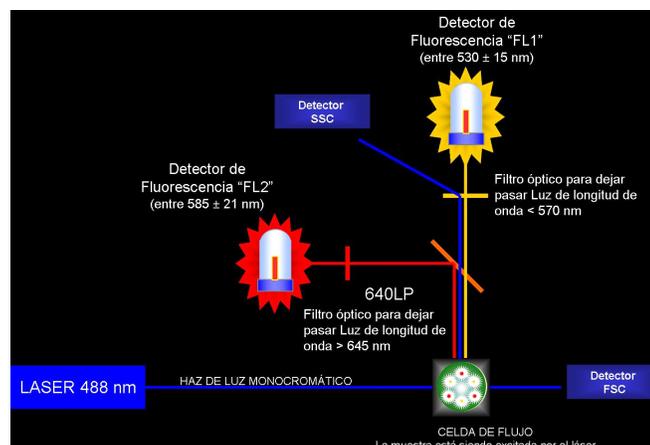
El principio de la citometría de flujo se basa en que las células suspendidas en un líquido son pasadas individualmente al frente de una fuente de luz intensa (generalmente un láser) y los datos de la luz reflejada, y en la mayoría de los casos, de la fluorescencia, son recogidos y organizados en un archivo. Los análisis posteriores de las poblaciones y sub-poblaciones se producen mediante el uso de programas de cómputo especializados lo cual permite obtener información valiosa para el investigador o el clínico. Debido a su capacidad de recolectar información de miles o millones de células al mismo tiempo, la citometría de flujo facilita el análisis multiparamétrico como lo realizan otras técnicas de laboratorio (microarreglos o microarrays, proteómica). Esta característica de analizar millones de células también facilita la obtención de datos estadísticamente significativos en un período de tiempo corto (14). Hoy se consiguen en el mercado sistemas con capacidad de analizar más de 15 parámetros de manera simultánea con tasas de análisis superiores a 70.000 células por segundo y con la posibilidad de tener estaciones robóticas automatizables para reducir los costos de los análisis e incrementar la eficiencia operativa.

Los recientes avances de la citometría de flujo permiten a los microbiólogos explorar las complejas interacciones entre los microorganismos y su medio ambiente incluso al detalle de poder realizar análisis de una sola célula (15). La información sobre la expresión génica o la combinación de la citometría de flujo con otros métodos moleculares más modernos ha permitido, también, visualizar cambios, adaptaciones e identificación de comunidades específicas y novedosas al igual que células individuales dentro de una población heterogénea (16,17). Con los tópicos descritos en esta revisión se pretende ilustrar de una manera sencilla los fundamentos básicos de la citometría de flujo y sus aplicaciones en las áreas de la microbiología, la medicina veterinaria y la agricultura. Asimismo, las limitaciones de los métodos tradicionales y los avances tecnológicos de la citometría son motivo de discusión y análisis.

## FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

El lector puede consultar a otros autores que han realizado revisiones sobre los fundamentos de la citometría de flujo (18) o visitar la página web <http://www.cyto.purdue.edu> donde podrá

acceder a un curso en línea sobre la teoría, principales aplicaciones de la citometría de flujo, fuentes de información adicional, material bibliográfico y seminarios especializados. De manera sencilla, lo que sucede en un citómetro de flujo es que a partir de una muestra biológica (la gran mayoría de los casos son células) que es colocada en suspensión en un líquido, se hace pasar, en lo posible, célula por célula, a través de una celda de flujo que está siendo impactada por una fuente de luz monocromática. Los rayos de luz al encontrarse con las células son difractados a todos lados o son bloqueados. La información de esta dispersión o bloqueo es filtrada, recolectada y detectada por los componentes especiales del instrumento para convertirlas en valores digitales que son guardados en un archivo con el fin de ser analizados luego por un *software* especializado (Figura 1). Este proceso físico-químico que ocurre con la muestra se logra por intermedio de los tres componentes principales de un citómetro de flujo (Tabla 1) el cual es un instrumento muy reconocido en la práctica clínica de rutina pero que ahora ha incrementado su uso en otras aplicaciones no clínicas (2,3,5).



**Figura 1.** Diagrama simplificado de los principales componentes de un citómetro de flujo y su funcionamiento interno. Tomado y modificado de BD Biosciences (USA).

**Tabla 1.** Principales sistemas y componentes de un citómetro de flujo.

SISTEMA	FUNCIÓN
Fluidos	Transportar la muestra hacia el haz de luz del láser y mantener sus propiedades fisicoquímicas.
Óptico	Iluminar las partículas de la muestra y obtener las señales de luz resultantes en los filtros y detectores apropiados
Electrónica	Convertir las señales de luz en señales electrónicas que un computador y programa de cómputo puedan interpretar.

El análisis citométrico requiere de una preparación y formulación de estrategias con el ánimo de garantizar el éxito de los experimentos. Esto se hace a través de protocolos que generalmente involucran tres fases (Tabla 2) pero que de manera general siguen el siguiente comportamiento: 1) hacer una suspensión de las células; 2) continuar con pasos sucesivos donde las células, lavadas o no, son incubadas en tubos o microplacas con anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes o fluorocromos (isotiocianato de fluorescencia o FITC, ficoeritrina o PE, alofococianina o APC); 3) lavados periódicos para remover el exceso de

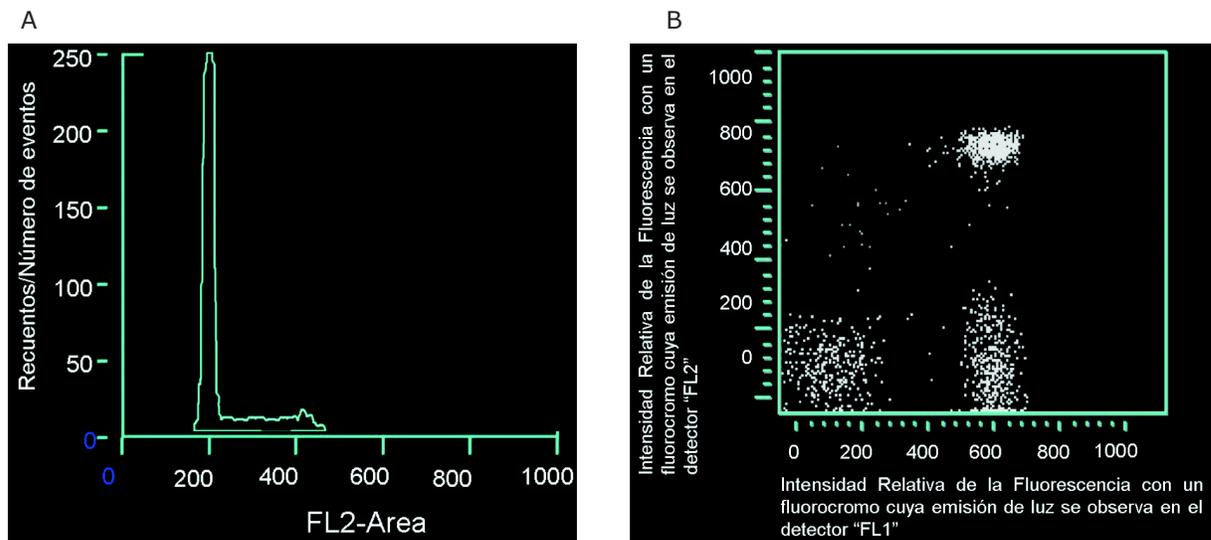
búferes, anticuerpos, fluorocromos o impurezas.

En términos técnicos la citometría de flujo indica tres cosas fundamentales sobre una muestra en un experimento (Figuras 1, 2).

- El tamaño relativo de las partículas o células a lo cual se le denomina *Forward Scatter* ó FSC. Esto no es más que la luz que la partícula o célula no deja transmitir de forma frontal y está relacionado con la superficie celular o su tamaño. El instrumento transforma la señal que es recolectada en el detector FSC.

**Tabla 2.** Principales etapas para la realización de un experimento usando la técnica de citometría de flujo.

ETAPA	OBJETIVO	ACTIVIDADES
Preparación	Visualizar el experimento en un análisis previo (pre-citometría) mediante la adecuación de las condiciones de la muestra y del citómetro.	Selección de parámetros a medir y reactivos necesarios. Diseño de Protocolos de preparación. Tinción de células. Selección de fluorocromos.
Citometría de Flujo	Realizar la lectura de la muestra y un pre-análisis de su comportamiento.	Procesamiento de las muestras en un citómetro de flujo. Medición de los parámetros seleccionados en la fase de preparación.
Análisis de datos	Interpretar los archivos y convertirlos en información útil.	Revisión de los datos en un programa de cómputo especializado.



**Figura 2.** Ejemplos de visualización de los resultados de los datos obtenidos con un citómetro de flujo. A) Los histogramas monoparamétricos donde se observan el parámetro seleccionado en el eje de las "X" (en este caso la intensidad de la fluorescencia recibida en el detector para FL2) y el número de células o eventos en el eje de las "Y". B) Los histogramas biparamétricos o *dot-plots* que permiten observar las células o eventos distribuidos como una función de la intensidad de la señal con respecto a cada parámetro (en este caso de las fluorescencias relativas). En el Eje X se visualiza la intensidad de una de las fluorescencias y en eje Y la otra fluorescencia. Los puntos blancos son los *plots* de las células detectadas y definidos como negativos para ambas Fluorescencias aquellas que están cercanas al punto 0 de los dos ejes, positivas para la fluorescencia en el eje de las X aquellos puntos cercanos a 600 y positivos para ambas fluorescencias aquellos puntos que se visualizan en la intersección de los ejes X y Y entre 600 y 800.

- La complejidad relativa interna o granularidad. Esto es, la luz que es dispersada a un ángulo de 90° de la luz incidente del láser o *Side Scatter* o SSC. Este parámetro está asociado con la rugosidad de la superficie celular y la cantidad de organelos dentro de la célula. A mayor cantidad de organelos o elementos en el interior de la célula mayor será la complejidad registrada en el detector SSC.
- La Intensidad de la fluorescencia de manera relativa (cuando la muestra ha sido teñida con anticuerpos marcados con fluorocromos o con algún tipo de molécula fluorescente) indicando marcadores en la célula contra los cuales los anticuerpos usados o los fluorocromos han sido dirigidos.

Debido a que el tema de fluorescencia es de vital importancia para preparar la

estrategia y los estudios por citometría de flujo (Tabla 3). De manera breve, la fluorescencia ocurre cuando los fotones de una luz incidente chocan contra una molécula (un fluorocromo) permitiendo que los electrones de los dobles enlaces pasen a un nivel energético más alto (excitado). El retorno de la molécula a un estado de energía más bajo está acompañado por la emisión de luz (la fluorescencia) y la pérdida de energía (19). Los métodos de tinción con fluorescencia generalmente son rápidos y facilitan la visualización de las células en mezclas complejas de acuerdo a sus características bioquímicas, fisiológicas o propiedades taxonómicas. También representan componentes específicos de las células como organelos, enzimas o marcadores de superficie (20). Los fundamentos de la fluorescencia al igual que otras técnicas de tinción para células se han descrito previamente (13, 21).

**Tabla 3.** Ejemplos de lasers y fluorocromos utilizados en aplicaciones de citometría de flujo.

FUENTE DE EXCITACIÓN (en nm)	CANAL DE FLUORESCENCIA	EJEMPLOS DE FLUOROCROMOS	EXCITACIÓN (nm)	EMISIÓN (nm)	CARACTERÍSTICA PARA APLICACIÓN EN CITOMETRÍA DE FLUJO
488 (laser azul)	VERDE	FITC	494	519	Alta Eficiencia de transferencia de Energía, 3-5 moléculas por conjugado (anticuerpo)
	AMARILLO	PE	496, 564	578	Tiene 34 fluorocromos de ficoeritrobilina por molécula lo que lo hace altamente "brillante"
635 (laser Rojo)	ROJO	PerCP-Cy 5.5	482	695	Conjugado doble. El PercP transfiere su energía a la molécula de Cianina dando una emisión más larga que el PerCP sólo
	ROJO	PerCP	482	678	Fenómeno de Fotodegradación (1)
405/407 (laser violeta)	ROJO	APC	650	660	Tiene 6 cromóforos de ficocianobilina por molécula (similar a la ficoeritrobilina del PE) lo que lo hace también muy "brillante"
	VERDE	AmCyan	457	491	Requiere de una óptica apropiada para ser visualizado. Alta estabilidad y bajo ruido de fondo (background).
633 (laser rojo)	AZUL	Pacific Blue® (2)	405	455	Use este conjugado para sus antígenos/proteínas más brillantes.
	AZUL	Alexa Fluor® 405 (2)	401	421	Es un fluorocromo menos brillante que Pacific Blue®
	INFRAROJO	APC-Cy7	650	785	Se requieren filtros especiales para su detección

(1): fenómeno en el cual el fluorocromo va perdiendo su capacidad de ser excitado y emitir fotones y por lo tanto de fluorescer

(2): Alexa Fluor® y Pacific Blue® son marcas registradas. [http://www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols/Fluorochrome\\_Absorption.shtml](http://www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols/Fluorochrome_Absorption.shtml)  
<http://www.ebioscience.com/ebioscience/appis/Dyes.htm> - <http://www.invitrogen.com/flowcytometry>

Los citómetros de flujo son instrumentos flexibles que documentan una gran variedad de aplicaciones. Sin embargo, es esta misma flexibilidad la que inherentemente se asocia con la posibilidad de obtener resultados errados. Dentro de las causas más frecuentes de resultados inválidos se encuentran los siguientes factores:

- 1) Como cualquier otra técnica de laboratorio, asumir los supuestos errados por parte del operador cuando se formulan las estrategias experimentales tales como la selección y estabilidad de los fluorocromos o el número de moléculas blanco en la célula.
- 2) La inadecuada selección o ajuste del voltaje para la lectura quizás perdiendo las poblaciones de interés en el estudio.
- 3) La falta o sobre estimación de la compensación del instrumento.
- 4) El deterioro del equipo por la falta de mantenimiento bajo las condiciones y parámetros establecidos por el fabricante.

Si bien los detalles técnicos no son parte de esta revisión, algunos comentarios se hacen para ilustración del lector. Las condiciones técnicas del instrumento deben ser ajustadas de acuerdo al tipo de células que se está evaluando. La gran mayoría de los operarios visualizan los análisis cuantitativos como se describen en la Figura 2 pero lo más importante a tener en cuenta es que el instrumento debe estar ajustado hasta que las poblaciones sean visibles en el centro de los histogramas en un análisis de FSC versus SSC, es decir, un histograma tipo ploteo de puntos o *dot-plot* (Figura 2 B). Generalmente los experimentos que involucran fluorescencia se visualizan con los histogramas tipo *dot-plots* y los experimentos deben ser *compensados* para cada intensidad de la fluorescencia lo cual se hace mediante los reactivos o

controles adecuados. Finalmente, hay que ajustar el *Threshold*, o punto de corte, lo que permitirá al operador seleccionar los datos a partir de los cuales quiere obtener información. Teniendo en cuenta estas sencillas recomendaciones, el trabajo en citometría de flujo se facilita para el operario y para el análisis posterior que se realiza.

## **APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MICROBIOLOGIA**

Algunas de las técnicas más usadas para el diagnóstico o detección de microorganismos incluyen el cultivo, inmunoensayos, aglutinación, microscopia óptica y de fluorescencia y biología molecular. Estas técnicas se han utilizado a lo largo de los años por su sencillez de uso, tradición, disponibilidad en el laboratorio y bajos costos. A pesar de esto, muchos métodos tradicionales consumen tiempo durante la preparación de las muestras, se basan en el examen visual por parte del operador, presentan dificultades técnicas al momento de implementarlas o están limitadas a pocos centros especializados. La citometría de flujo, al igual que otros métodos modernos, se convierte en una herramienta fundamental en la microbiología combinando la detección directa y rápida de microorganismos (o partes de éstos), el estudio de la distribución de su tamaño (a través de los parámetros de FSC y SSC, tamaño y complejidad respectivamente) al igual otras características bioquímicas y fisiológicas de una población o de células individuales. Estudios previos resaltan las ventajas y beneficios de utilizar la citometría de flujo en muestras ambientales pero que por su generalización pueden ser extensibles a cualquier aplicación en microbiología: 1) La velocidad con la cual se obtienen y

procesan los datos; 2) la capacidad de separación (*cell sorting*) que tienen algunos citómetros lo que permite el aislamiento de poblaciones específicas e incluso células individuales para un posterior estudio físico, químico, biológico o molecular; 3) la adquisición rápida de múltiples datos para su posterior análisis; 4) la posibilidad de ser una técnica tanto cualitativa como cuantitativa (14, 15, 22).

Si bien las aplicaciones de la citometría de flujo al campo de la microbiología no son nuevas (2,4,19) esta herramienta está poco desarrollada en Colombia en aplicaciones distintas a la clínica o la investigación básica. Las nuevas aplicaciones en temas diferentes permitirá el avance e incluso la reorganización de varios métodos usados en ciencias biológicas tal y como se vienen practicando en la actualidad. El cultivo tradicional usado en un período de tiempo variable, a temperaturas adecuadas hasta observar colonias visibles para luego ser contadas e identificadas. Esta labor, además de tomar tiempo y esfuerzo, tiene limitaciones ya que los medios no satisfacen los requerimientos de crecimiento de todas las especies o se deben utilizar varios medios para lograr la identificación de varias especies en una misma muestra.

En el mundo globalizado de hoy la citometría de flujo ha mostrado a lo largo y ancho del planeta ser de gran utilidad para la detección o identificación de microorganismos tales como *Staphylococcus aureus* (6), *Plasmodium* (4), *Cyclospora* (9), diferentes familias de Virus incluyendo *Baculoviridae*, *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Picornaviridae* y *Retroviridae* (12, 13), *Chlamydia* (23), *Rotavirus* (24), *Leptospira* (25), *Salmonella* (26), *Listeria* (26), *Escherichia coli* (27), *Francisella tularensis* (28) y hongos de varias especies (29) entre otros.

## **APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL.**

La citometría de flujo no sólo se usa con muestras clínicas sino que también se aplica en una variedad de muestras ambientales y de alimentos tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo. Mediante el uso de las propiedades de dispersión de la luz dentro del citómetro y/o un panel adecuado de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos se puede realizar prácticamente la identificación de cualquier microorganismo de interés. Algunos autores revelan lo valiosos que pueden ser los análisis por citometría llegando a ser incluso más sensibles comparados con los métodos de cultivo tradicionales en la industria de alimentos (27,30). Para la exitosa comercialización de nuevos productos con mejores características para los consumidores es fundamental desarrollar métodos analíticos que logren detectar a tiempo riesgos para la salud pública. También para las empresas es crítico reducir los tiempos de análisis para dar vía libre a los productos en el mercado nacional o internacional. Un ejemplo de estas aplicaciones es el monitoreo de la calidad de los productos lácteos el cual requiere de un análisis detallado de la carga microbiana. La citometría de flujo en conjunto con técnicas fluorescentes, después de realizar una clarificación de la muestra removiendo los lípidos y proteínas, se puede hacer la detección de bacterias viables y no viables en la leche lo que convierte a esta técnica en un método de análisis rápido que puede ser incorporado a la rutina de un laboratorio (31). Otro modelo es el de las bacterias ácido lácticas que son de vital importancia en la industria de lácteos. Los "probióticos", como se conocen comercialmente, son ingredientes microbianos benéficos para la salud y son incorporados al yogur, la

leche, el queso e incluso a otros alimentos cárnicos. Para resolver algunos inconvenientes de su mejora en el laboratorio tales como la optimización del crecimiento, la regularización de la producción y la determinación de la resistencia a las sales, entre otras variables, se necesitan de modernos métodos para su enumeración y valoración de la viabilidad. De nuevo, el método de recuento en placa es tedioso presentando ciertas desventajas como la subestimación del número real de bacterias presentes debido a daños en la célula o agregación de las mismas en cadenas durante la formación de las colonias. Aquí la citometría de flujo, como método moderno de análisis en el laboratorio de microbiología industrial, consigue una mejor aproximación a la evaluación de los cultivos primarios y de las poblaciones bacterianas en los alimentos (32).

Los métodos tradicionales de recuentos totales de microorganismos en placas tienen desventajas; otros métodos usados son manuales sin posibilidad de automatización y muchos no permiten la diferenciación rápida entre las distintas especies. En contraste, un citómetro de flujo, como instrumento y método, admite realizar la detección y discriminación de microorganismos cultivables, además de otros que son viables pero no cultivables con la posibilidad de obtener células individuales de características fisiológicas o morfológicas especiales (lo que se llama en el lenguaje citométrico "*eventos raros*") que podrían beneficiar a la industria de alimentos. La producción de nuevos compuestos anti-bacterianos inocuos para el hombre, la selección direccionada de nuevas cepas de bacterias o levaduras para la fermentación o el simple hecho de usar una técnica que no use marcadores genéticos son algunos de los beneficios que se obtienen al utilizar la citometría

de flujo en la industria de alimentos. El lector puede consultar a Shapiro (1,19) y Mattanovich y Borth (5) para una revisión completa de las aplicaciones de la citometría de flujo como un método rápido para la separación celular (*cell sorting*).

El tema ambiental es otro de los campos interesantes donde nuevas aplicaciones de la citometría de flujo se han implementado con éxito. El creciente interés en microorganismos acuáticos y de ambientes extremos crece debido a que estos ecosistemas representan un importante reservorio de diversidad genética y fisiológica donde las concentraciones de nutrientes son escasas y las temperaturas excesivas. Es aquí, en estos nuevos entornos, donde las oportunidades para descubrir nuevas especies de microorganismos, entender novedosas vías metabólicas diferentes a las del carbono donde la metanogénesis y los organismos sulfato-reductores predominan o simplemente para reestructurar el conocimiento taxonómico están a la orden del día (16, 17). En la medida en que se realicen descubrimientos y caracterización de microorganismos la industria biotecnológica comenzará la búsqueda de nuevos productos que redundarán en mejores beneficios y superiores técnicas para el laboratorio. El ejemplo clásico de esta bioprospección por parte de la industria privada son las modernas enzimas resistentes y estables a las altas temperaturas que se usan para desarrollar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (ó PCR) y que procesan material genético con alto contenido de Guanina-Citosina (GC) con gran fidelidad superando a sus homólogas tradicionales (i.e. *Taq* Polimerasa). Para estar en sintonía con un tema de actualidad nacional, Genencor (<http://www.genencor.com>), una división de la empresa Danesa Danisco, ha lanzado recientemente el producto Maxaliq™

ONE, una enzima termoestable que consigue un mayor rendimiento en las plantas de producción de biocombustibles y una mayor eficiencia en la producción de etanol a partir de biomasa.

Otro ejemplo de la importancia de la aplicación de la citometría de flujo en el tema ambiental es la degradación de hidrocarburos. En un ambiente natural, o durante los derrames accidentales, la degradación de hidrocarburos se da mayormente por microorganismos en el suelo o agua donde éstos son derramados. No obstante, dicha capacidad de degradación es dependiente de la salinidad del medio y de las comunidades involucradas en estos ambientes. Si bien métodos modernos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa, el uso de isótopos radiactivos o la determinación del ARN ribosomal (ó ARNr) consiguen identificar genes que se encuentran involucrados en las vías metabólicas de degradación (33), éstos tienen las limitaciones de ser técnicas costosas, especializadas y de necesitar gran destreza por parte del operador para que el experimento se desarrolle con éxito. En este contexto, la citometría de flujo, en conjunto con otras técnicas modernas de laboratorio, permite la identificación, estudiar la adaptación y observar la evolución de las diferentes comunidades de bacterias involucradas en la degradación de hidrocarburos. Es así como se encontró que la bacteria *Sphingomonas spp* predominaba en ambientes donde las concentraciones de sales son bajas mientras que otros halófilos extremos tales como *Ralstonia spp*, *Halomonas*, *Dietzia* y *Alcanivorax* fueron identificados en ambientes con salinidades más altas (33).

Estos ejemplos impulsan a creer que el análisis por citometría de flujo de muestras ambientales para la determinación y viabilidad de microorganismos conseguirá realizar una

mejor caracterización microbiológica del agua, suelos y aire buscando un mejor control o prevención de riesgos para la salud humana o animal. También, permitirá continuar con las actividades de bioprospección en busca de recursos genéticos o bioquímicos que tenga aplicación industrial.

## **APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN VETERINARIA.**

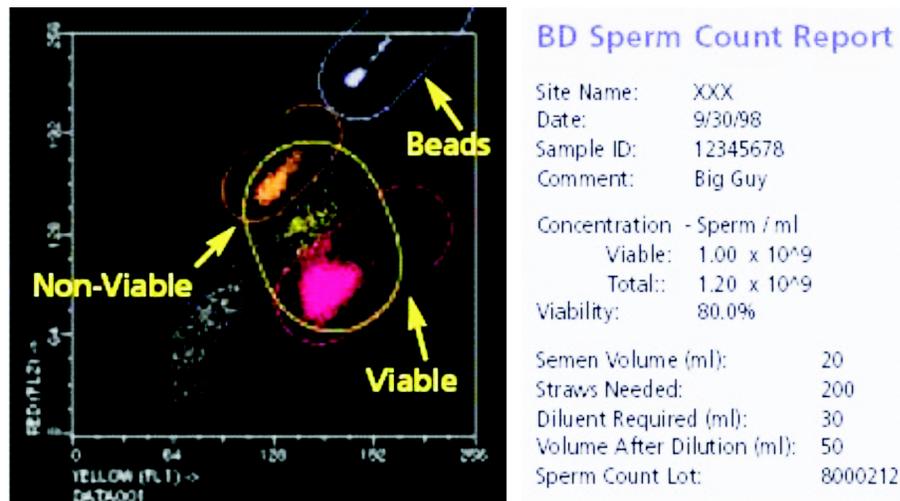
Si bien la citometría de flujo no se aplica mucho en veterinaria, su uso en futuro cercano aumentará de manera considerable en la medida que sea difundida la posibilidad de su aplicación en otras especies distintas a pequeños roedores. Los viajes modernos, las migraciones, los cambios demográficos, el comercio y el abuso de antibióticos son algunos de los factores que incrementan la amenaza de brotes, emergencia y re-emergencia de varias enfermedades infecciosas desde el sector pecuario. Simultáneamente, el comercio internacional de alimentos se ha incrementado en los últimos años imponiendo barreras no arancelarias, más exigencia sanitaria, mejor tecnología de producción y sofisticadas técnicas de control de calidad para ser competitivos.

La citometría surge como una nueva tecnología en los laboratorios clínicos veterinarios al igual que las aplicaciones clínicas en humanos. La citometría en veterinaria permite el análisis de una variedad de células animales incluyendo aplicaciones como el recuento de reticulocitos, recuento de plaquetas, inmunofenotipificación de leucemias y linfomas o recuentos diferenciales en médula ósea en felinos, caninos, bovinos y equinos (34). También se usa la citometría de flujo para el recuento de subpoblaciones de linfocitos en ovejas (35), diagnóstico veterinario de anemia

hemolítica y neoplasias en equinos (36). Como es de anticipar, los instrumentos, reactivos y estrategias de análisis deben ser adecuados para este tipo de aplicaciones al igual que las condiciones de trabajo de los experimentos.

Quizás las aplicaciones más importantes de la citometría en veterinaria se basan, aunque no se limitan, a los estudios de la respuesta inmune de infecciones económicamente relevantes para: a) la fabricación de vacunas; b) el mejoramiento de las vacunas ya existentes; c) el mejoramiento genético de especies bovinas y equinas; d) el desarrollo de modelos de respuesta inmune en animales como primates no humanos (especies de Mandriles-*Baboon*, monos Rhesus-*Macaca spp* y *Cynomolgus*, *Macaca fascicularis*) con el fin de adquirir

un entendimiento profundo de la patogénesis de ciertas enfermedades infecciosas y la experimentación de vacunas antes de comenzar ensayos en humanos. Trabajos previos describen el seguimiento de la respuesta inmune humoral de vacunas contra *Mycoplasma gallisepticum* (37), los cuales refieren no sólo la prevención del establecimiento del microorganismo, sino también a la prevención y seguimiento de la enfermedad. En el caso de *Brucella*, la inmunidad protectora no está del todo deducida en animales pero la evidencia sugiere que la inmunidad celular, al menos en prospectos de vacunas ADN para *B. ovis* y *B. mellitensis*, está mediada por Linfocitos T citotóxicos (incluyendo CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y ésta juega un papel importante en la protección contra el microorganismo en modelos murinos (38).



**Figura 3.** Ejemplo de un reporte y análisis por citometría de flujo de una muestra de esperma de un bovino. El sistema BD FACSCount™ AF (BD Sperm Counting System) usa un Láser de 488 nm que excita la fluorescencia de dos fluorocromos. Uno realiza la tinción del ADN en todas las células y emite un color amarillo cuando se excita a 488 nm. El otro, sólo entra las células que tienen la membrana averiada (células presuntamente muertas o poco viables); este fluorocromo emite un color rojo cuando se excita a 488 nm. El volumen de la muestra analizado es determinado por un estándar interno (las microesferas fluorescentes o "beads") y los reactivos específicos. El reporte establece una relación de concentración precisa entre el volumen de la muestra y el recuento de las microesferas permitiendo la producción de dosis de inseminación más uniformes con un número específico de esperma.

© 2004. Becton, Dickinson and Company. Todos los derechos reservados. Material cortesía de la oficina centralizada en Bélgica de BD Biosciences. Prohibida su reproducción, almacenamiento, transmisión en cualquier forma mecánica, electrónica, magnética, óptica o química, total o parcial sin el consentimiento previo por escrito de BD Biosciences. BD, BD FACS y BD FACSCount son marcas registradas de Becton, Dickinson and Company.

Otra aplicación son las infecciones por *Mycobacterium bovis*, las cuales revisten implicaciones económicas para los productores de ganado y son una amenaza constante para la salud humana. Al ser parásitos intracelulares que sobreviven y se replican dentro de las células del hospedero su detección por métodos tradicionales es limitada y se requiere una aproximación más avanzada como la biología molecular o la citometría de flujo. Algunos países usan el Interferón Gama (INF-g) como marcador pronóstico de los estadios iniciales de la tuberculosis bovina en animales no obstante, en bovinos menores a 18 meses se presentan reacciones inespecíficas en el CF que pueden dificultar la interpretación de los resultados (39).

La otra aplicación importante de la citometría de flujo en veterinaria es la correlación que existe entre la concentración y viabilidad del esperma y la fertilidad en ganado. Desde los comienzos de la inseminación artificial en bovinos y aves el método primario para la evaluación de la calidad del semen se basa en la inspección visual de la motilidad del esperma bajo un microscopio con la técnica de contraste de fase. Este método, si bien es barato y rápido, es subjetivo e impreciso dependiendo en gran medida de la experiencia del operador. Los múltiples trabajos de Christensen, Hansen y colaboradores en el Departamento de Ciencias Animales de la Real Universidad Veterinaria y Agrícola de Dinamarca son famosos por combinar métodos fluorescentes con un citómetro de flujo modificado para el análisis de esperma bovino en estaciones de inseminación artificial (40). Al usar una versión modificada de un citómetro clínico se ha desarrollado un método rápido, preciso que permite: la selección del mejor semen de toros y cerdos. El CF puede evaluar la calidad, estructura, función y

motilidad del esperma luego de ciclos de congelación/descongelación; y, valorar daños en el esperma y su calidad para la fertilización. De igual manera, este desarrollo tecnológico evidencia la importancia de unificar los esfuerzos entre las necesidades del sector productivo (las Sociedades de Inseminación Artificial Danesas), la empresa privada y los centros de investigación de excelencia (la Universidad) para brindar soluciones innovadoras al servicio de la comunidad.

## **APLICACIONES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO EN AGRICULTURA.**

Las aplicaciones de la citometría de flujo en veterinaria son poco conocidas, al igual que las aplicaciones en el área agrícola en Colombia es mucho menos avanzado. Cuando se menciona la palabra planta se hace referencia a briofitas, gimnospermas, angiospermas y demás sin distinción alguna a menos que se especifique lo contrario.

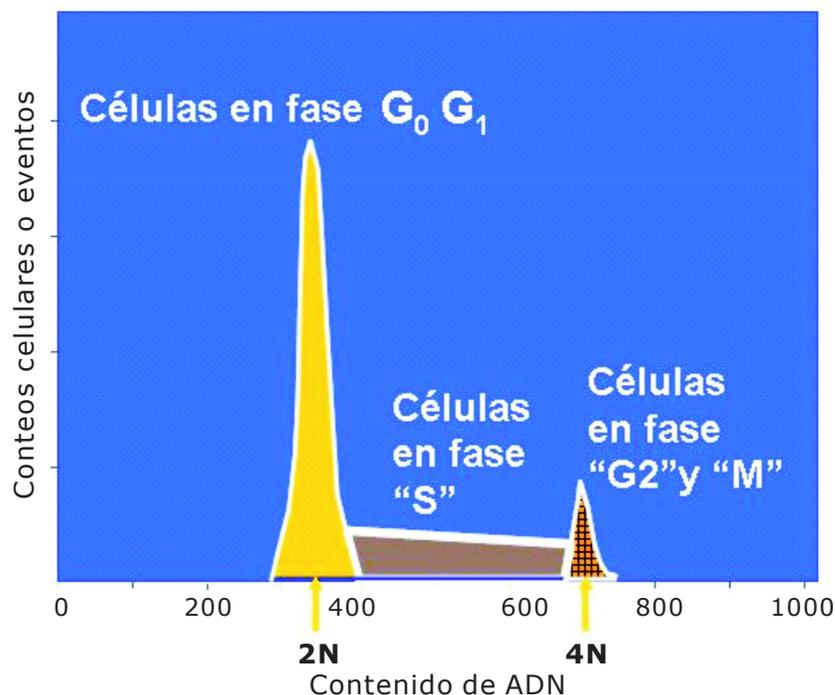
El maíz, el arroz, el trigo, el sorgo, la avena, la caña de azúcar, el algodón, el banano y la palma de aceite son cultivos importantes desde el punto de vista económico, ecológico y de nutrición para Colombia sin embargo las oportunidades para avanzar tecnológicamente con la citometría de flujo están lejos. Hay bancos de germoplasma o extensas tierras cultivadas de cereales para consumo humano o para su uso posterior como biocombustibles por mencionar los ejemplos más relevantes. Dado lo extenso de la aplicación de la citometría de flujo en plantas, que llevaría una revisión adicional más detallada, esta revisión se refiere a los aspectos básicos sin profundizar en la terminología especializada usada por los expertos. La aplicación de la citometría de flujo en la agricultura plantea problemas

adicionales. Las plantas tienen paredes gruesas ó rígidas, contienen cloroplastos y otros organelos que son autofluorescentes lo que de por sí plantea un reto adicional para la preparación de la muestra o para los análisis posteriores de los datos. También es necesaria la inclusión de estándares de comparación que estén previamente caracterizados o tengan valores conocidos para la práctica del análisis citométrico en plantas. Nuevos métodos de preparación, procesamiento de muestras y estándares de análisis se han materializado para resolver estos inconvenientes como la preparación de núcleos completos en soluciones acuosas que luego pueden ser separados físicamente en un instrumento (41). La obtención de un ADN de alta calidad es mandatorio para realizar clonación y organizar librerías genómicas.

La terminología, al no ser de uso cotidiano, tiende a ser confusa y

requiere de atención adicional por parte del lector para hacer seguimiento a los resultados de un trabajo o a las metodologías propuestas en las publicaciones científicas. Expresiones como *tamaño del genoma* o valor C (*C-Value*), contenido de ADN nuclear y ciclo celular son incorporadas al análisis por citometría de flujo en plantas. De manera ilustrativa, un aspecto trascendental, como lo es el ciclo celular, está comprendido por las siguientes fases: Preparación para la síntesis de ADN o "G1"; Síntesis de ADN o "S"; Período previo a la separación de la célula o "G2" donde se encuentra la doble cantidad de ADN que en la fase G1; Finalmente, la separación de las células o "M"

La citometría de flujo permite medir la cantidad de ADN presente en cada célula y la cantidad de éstas en cada fase. El histograma que resulta de esta medición es similar a los presentados en la Figura 2 A y Figura 4.



**Figura 4.** Visualización representativa de un histograma monoparamétrico del ciclo celular y análisis del contenido de material genético (ADN) por citometría de flujo

La ploidia es un término que describe el número de grupos o juegos de cromosomas dentro de una célula. Una célula haploide contiene la mitad ( $n$ ) del número normal de cromosomas ( $2n$ ). Un diploide ( $2n$ ) posee dos series de cromosomas y un poliploide contiene un incremento del número de cromosomas característico ( $4n$ ). La ploidia juega un papel importante en la evolución de las plantas permitiendo su adaptación a una amplia variedad de ambientes geográficos y climas a lo largo del tiempo. De ahí la importancia de realizar estudios para determinar la evolución de la ploidia, estudiar sus categorías, modos de formación, atributos ecológicos y moleculares, mecanismos de especiación, comportamiento citogenético y consecuencias genéticas. La citometría de flujo aporta información valiosa para los estudios de ploidia en plantas tales como: 1) cambios en el contenido de ADN y caracterización del genoma; 2) determinación de la prevalencia y el tiempo en que ocurren estos cambios; 3) relación de la genética al comportamiento de la planta en su ambiente; 4) La identificación de plantas híbridas (1, 42). Como el lector puede anticipar, la cantidad de ADN presente en cada planta o célula dependerá de su nivel de ploidia. Por ejemplo, las plantas tetraploides ( $4n$ ) tienen el doble de contenido de ADN y cromosomas que sus pares diploides y es en este mismo sentido que se plantea la estrategia para realizar el análisis de los histogramas y del ciclo celular. La identificación de híbridos es necesaria cuando se quiere realizar cruces entre plantas ya que diferentes niveles de ploidia pueden resultar en inestabilidad genómica o número impar de cromosomas lo que acarrea la infertilidad y bajos niveles de productividad de estos cultivos.

Una de las grandes ventajas del uso de la citometría de flujo en plantas es que para los experimentos se pueden utilizar

partes (como hojas) que permiten dejar a la planta intacta en el laboratorio o el campo sin necesidad de pérdida adicional de los sujetos materia de estudio. Nuevamente una gran cantidad de muestras pueden ser procesadas en poco tiempo o muchas células son leídas en una corrida produciendo datos con significado estadístico.

Quizás la aplicación más importante de la citometría de flujo en la agricultura sea la determinación del contenido de ADN. Algunos ejemplos de esta aplicación se publicaron para cultivos de café (43), algodón (44), más de 21 especies de Sorgo (45), banano y plátano (46) o palma de aceite (*Elaeis guineensis*) (47), entre otros. En el caso de *Musa*, para describir el patrón, la clasificación de la ploidia de las plantas se basa en las características morfológicas y un sistema de permutaciones genómicas que limitan su aplicación debido a los largos ciclos de vida del cultivo o de las extensiones de tierra necesarios para su cultivo. El cultivador querrá tener la información, por lo menos básica, de la ploidia de sus plantas o la composición del genoma para planificar las estrategias de apareamiento. La citometría de flujo presenta su utilidad, en conjunto con otros sistemas de marcadores genéticos, como un método para discriminar de una manera rápida las colecciones de germoplasma y confirmar el tamaño o composición del genoma (46).

Además, como método alternativo rápido y confiable, la citometría presenta de modo inicial sus ventajas y beneficios para los cultivadores o investigadores del sector agrícola que requieran hacer análisis del contenido de ADN en plantas o descubrir la estabilidad genética de cultivos autóctonos colombianos y los niveles de ploidia en diferentes siembras de café (43), algodón (44) o caña de azúcar. El significado biológico o evolutivo que arroje el análisis de las posibles

inserciones o deleciones o variaciones en el tamaño del genoma por otros mecanismos aporta interesante perspectivas para proyectos de investigación, sean básicos o aplicados. Los diversos proyectos genoma que se han iniciado a nivel mundial no son ajenos al sector agrícola. Los análisis filogenéticos son necesarios para entender los orígenes y evolución de las especies y en el caso de las plantas no es la excepción. En este sentido ya se comenzaron trabajos para tener un mejor entendimiento de las especies de arroz (*Oryza*) mediante la construcción de librerías genómicas donde la citometría de flujo jugó un papel destacado en la determinación del contenido de ADN, el tamaño del genoma de nueve de las doce especies de *Oryza* y el análisis de las células en división. Incluso, con los modernos métodos de secuenciación y análisis molecular las predicciones humanas sobre la generación de "genomas" o su composición pueden estar erradas y necesitar de clarificación o corrección en bajo las circunstancias apropiadas (46). Además, la citometría de flujo presenta una alternativa distinta que permite fraccionar el genoma nuclear en plantas realizando *sorting* de los cromosomas individuales y así tener un método alternativo a la secuenciación molecular.

Para lograr esto, la sincronización del cultivo celular y el análisis de datos que permita realizar tanto el análisis del ADN como el *sorting* de los cromosomas se puede utilizar un citómetro de flujo de última generación los cuales son bastante sencillos de utilizar a diferencia de sus antecesores.

## **AVANCES CIENTÍFICOS Y PROGRESOS TECNOLÓGICOS**

La disponibilidad de métodos de alta capacidad de procesamiento (*High-*

*Throughput*), el incremento continuo de las capacidades de los sistemas de cómputo, los nuevos desarrollos en los *software* para análisis y la creatividad de los investigadores han acelerado los descubrimientos en la genómica, proteómica y los campos relacionados en el mundo. El conocimiento obtenido en estas áreas augura un futuro promisorio para entender el impacto directo que los microorganismos tienen en la vida humana, las aplicaciones industriales direccionadas o como fuente de alimento para animales de crianza. Es común observar la integración de varias áreas del conocimiento científico para ayudar a la resolución de problemas. La histología, la citometría de flujo, los modelos matemáticos, la biología sistemática y los ensayos funcionales han unificado esfuerzos para la investigación de la respuesta inmune de un individuo (48); o la integración de la separación celular (*Cell Sorting*), usando citómetros de flujo modernos, sirve para purificar poblaciones de células e integrar estos análisis a programas más avanzados de proteómica (49).

Por otro lado, los métodos tradicionales de cultivo determinan sólo células cultivables en una muestra, requieren de largos tiempos de incubación o dependen de las lecturas del observador. Esta aproximación limitada de la ciencia permite anticipar que aquellos microorganismos que estén en un nivel de detección bajo por daño en la membrana celular, que tengan baja viabilidad, que se encuentren en escaso número o que sean de crecimiento intracelular obligados no podrán ser observados (10, 25). Otros, tomarán tiempos mucho más largos para ser visibles en los cultivos (39). En este sentido una sola célula podría, bajo las condiciones adecuadas, dar comienzo a una enfermedad, causar una epidemia o estropear toda la comercialización de un lote de alimentos. Técnicas innovadoras

que permitan detectar partículas de 0.5  $\mu$ m e identificar células individuales como la citometría de flujo cobran importancia para describir mejor los posibles riesgos para la salud o para detectar infecciones antes de su diseminación. Asimismo, el uso de nuevos métodos de tinción fluorescentes que permitan discriminar dentro de una población los microorganismos vivos de los no viables facilitará la detección rápida y confiable de incluso parásitos intracelulares obligados que en otras circunstancias necesitarían de métodos de inoculación *in vivo* para determinar la infección o de cultivos celulares. *Lawsonia intracellularis*, que es un microorganismo que produce diarreas y muertes súbitas en cerdos de engorde, no crece en medios de cultivos convencionales debido a que necesita condiciones atmosféricas especiales para su crecimiento o cuya viabilidad se observa en monocapas de cultivos celulares de enterocitos (50).

Al integrarse a métodos modernos (3, 6) la citometría permite el desarrollo de nuevos procedimientos de cultivo bacteriológico para el aislamiento de microorganismos desconocidos o en ambientes inhóspitos (11). Dadas las múltiples capacidades de la citometría o de los instrumentos modernos se puede modificar las propiedades de detección del FSC (detección de tamaño) por la detección y cuantificación de la aglutinación de partículas. En este caso el análisis se modifica mediante la observación y comparación de los *dot-plots* de las bacterias agregadas de aquellas no aglutinadas como se observa en el caso de *Leptospira* (25). También se puede tomar ventaja de esta modificación de la medición de las propiedades del citómetro para la detección de enfermedades neurodegenerativas en ganado como la Encefalitis Espongiforme Bovina como una potencial prueba diagnóstica en suero en animales *ante mortem* y no mediante el

análisis en tejidos por inmunohistoquímica *post mortem* (51).

## CONCLUSIONES

Colombia tiene un gran potencial exportador en la industria agropecuaria, una enorme biodiversidad y la reciente implementación de plantas para producción de biocombustibles. Sin embargo, el país enfrenta permanentemente cruzadas para desafiar las barreras no arancelarias que cada día son más notorias en los tratados de comercio. Esto, se ha convertido en serias limitaciones para la entrada en otros mercados de nuestras exportaciones o de lograr una mayor participación internacional con nuevas tecnologías. Es posible, por ejemplo, estudiar el contenido de ADN de las actuales y futuras plantaciones de caña de azúcar, maíz, palma o yuca con el ánimo de mejorar la genética de estos cultivos buscando una mayor productividad y competitividad en pro de satisfacer la creciente demanda local e internacional por bioetanol o biodiésel. Como país en vía de desarrollo Colombia requiere un enfoque distinto que le permita plantear serias estrategias proactivas del uso de sus recursos naturales que puedan derivarse del uso de la citometría de flujo en las áreas de la microbiología, veterinaria y agricultura. Si bien la aplicación de la citometría en espacios distintos a la clínica apenas comienza en Colombia, se perciben grandes contribuciones por los distintos grupos de investigación que actualmente usan esta tecnología como herramienta en sus laboratorios. La búsqueda de novedosos microorganismos, el entendimiento de la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas, la producción de biomoléculas para uso medicinal, la construcción de genotecas de ADN o la búsqueda de alianzas de cooperación internacional son algunos de los esfuerzos sostenidos que se conciben

en tiempos recientes a nivel nacional con el ánimo de unificar el desarrollo de actividades académicas permanentes, la transferencia de tecnología y la investigación conjunta.

### Conflicto de intereses

El autor declara que actualmente es empleado de la empresa Becton Dickinson en Colombia. Becton Dickinson and Company es una de las compañías más reconocidas a nivel mundial por su aplicaciones en citometría de flujo. Aún así, la revisión incluye información de productos en el campo de la citometría de flujo incluyendo instrumentos, reactivos y tecnología de punta de otras empresas. No obstante, el autor proclama que las

opiniones expresadas en este artículo son basadas en su conocimiento, experiencia, investigación académica y desarrollo profesional y que no comprometen en absoluto a la empresa Becton Dickinson and Company o su representación en Colombia, Becton Dickinson de Colombia Ltda.

### Agradecimientos

A todos aquellos que realizaron la revisión crítica de este manuscrito cuyos aportes fueron fundamentales. A Becton Dickinson, por permitirme ser parte de su propósito de "ayudar a las personas a vivir saludablemente". Finalmente al apoyo incondicional de mi esposa Liliana Sierra quien me alentó con esta revisión.

## REFERENCIAS

1. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. New York. John Wiley & Sons Inc. 2003. 4<sup>th</sup> Edition.
2. Bouix M. and Leveau JY. The applications of flow cytometry in microbiology. Bull Soc Fr Microbiol 2001; 16:210-218.
3. Rollenhagen C, and Bumann D. *Salmonella enterica* Highly Expressed Genes Are Disease Specific. Infect Immun 2006; 74 (3): 1649-1660.
4. Alvarez-Barrientos AM, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, and Sánchez-Pérez, M. Applications Of Flow Cytometry To Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev 2000;13:167-195.
5. Mattanovich D, and Borth N. Applications of Cell Sorting in Biotechnology. Microbial Cell Factories 2006; 5:12-22
6. Hartmann H, Stender H, Schäfer A, Autenrieth IB, and Kempf VA. Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* in Blood Cultures by a Combination of Fluorescence *In Situ* Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes and Flow Cytometry. J Clin Microbiol 2005;43 (9):4855-4857
7. Suller MT, and Lloyd D. Fluorescence Monitoring Of Antibiotic Induced Bacterial Damage Using Flow Cytometry. Cytometry 1999;35:235-241.
8. Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, and Ingroff AE. Comparison of Two Probes for Testing Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Voriconazole, Itraconazole and Caspofungin by Flow Cytometry. J Clin Microbiol 2005;43(9):4674-4679.

9. Dixon BR, Bussey JM, Parrington LJ and Parenteau M. Detection of *Cyclospora cayetanensis* Oocysts in Human Fecal Specimens by Flow Cytometry. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2375-2379
10. Jiménez-Díaz MB, Rullas J, Mulet T, Fernández L, Bravo C, Gargallo-Viola D y Angulo-Barturen I. Improvement of Detection Specificity of *Plasmodium*-Infected Murine Erythrocytes by Flow Cytometry Using Autofluorescence and YOYO-1. *Cytometry Part A* 2005; 67 A : 27-36
11. Moser DP, Gihring TM, Brockman FJ, Fredrickson JK, Balkwill DL, Dollhopf ME, et al. *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp Dominate a 4-to 5 Kilometer-Deep Fault. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(12):8773-8783
12. Brussaard, Corina PD. Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(3):1506-1513
13. Brussard C, Marie D, and Bratbak G. Flow Cytometric Detection of Viruses. *J Virol Meth* 2000;85:175-182
14. Herzenberg L, Tung J, Moore M, Herzenberg L, Parks D. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 2006;7:681-5
15. Brehm-Stecher B and Johnson E. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. 2004. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(3):538-559
16. Park H, Schumacher R, and Kilbane I. New method to characterize microbial diversity using flow cytometry. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005;32:94-102
17. Mou X, Moran M, Stepanauskas R, González J, and Hodson R. Flow-cytometric cell sorting and subsequent molecular analyses for culture-independent identification of bacterioplankton involved in dimethylsulfoniopropionate transformations. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:1405-1416.
18. Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. *Meth Cell Biol* 2001;63:19-50
19. Shapiro, HM. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *J Microbiol Meth* 2000;42:3-16.
20. Barer MR, and Harwood CR. Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol* 1999;41:93-137.
21. Haughland, R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Eugene, OR. Molecular Probes, Inc. 2002. 9th Ed.
22. Vives-Rego J, Lebaron P, and Neberson-Caron G. Current And Future Applications Of Flow Cytometry In Aquatic Microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:429-448.
23. Cirino F, Webley WC, West C, Croteau NL, Andrzejewski C, and Stuart ES. Detection of *Chlamydia* in the Peripheral Blood Cells of Normal Donors Using *in vitro* Culture, Immunofluorescence Microscopy and Flow Cytometry Techniques. *BMC Infect Dis* 2006;6:23-36.
24. Abad FX, Pintó RM, and Bosch A. Flow Cytometry Detection of Infectious Rotaviruses in Environmental and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(7):2392-2396.

25. Yitzhaki S, Barnea A, Keysary A, and Zahavy E. New Approach for Serological Testing for Leptospirosis by Using Detection of *Leptospira* Agglutination by Flow Cytometry Light Scatter Analysis. J Clin Microbiol 2004;42(4):1680-1685
26. McClelland R and Pinder A. Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with Flow Cytometry and Monoclonal Antibodies. Appl Environm Microbiol 1994;60:4255-4262.
27. Gunasekera T, Attfield P and Veal D. A flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. Appl Environ Microbiol 2000;66(3):1228-1232
28. Porsch-Özcürümez M, Kischel N, Priebe H, Splettstösser W, Finke E, and Grunow R. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Western Blotting, Microagglutination, Indirect Immunofluorescence Assay and Flow Cytometry for Serological Diagnosis of Tularemia. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11(6):1008-1015
29. Prigione V, Lingua G and Marchisio VF. Development and Use of Flow Cytometry for Detection of Airborne Fungi. Appl Environ Microbiol 2004;70(3):1360-1365
30. Budde B and Rasch M. A Comparative Study on the Use of Flow Cytometry and Colony forming Units for Assessment of the Antibacterial Effect of Bacteriocins. Int J Food Microbiol 2001;63(1-2):65-72
31. Gunasekera T, Veal D and Attfield PV. Potential For Broad Applications Of Flow Cytometry And Fluorescence Techniques In Microbiological And Somatic Cell Analyses Of Milk. Int J Food Microbiol 2003;85(3):269-79
32. Bunthof CJ, and Abee T. Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. Appl Environm Microbiol 2002;68(6):2934-2942.
33. Kleinsteuber S, Riis V, Fetzer I, Harms H, and Müller S. Population Dynamics within a Microbial Consortium During Growth on Diesel Fuel in Saline Environments. Appl Environm Microbiol 2006;72(5):3531-3542.
34. Weiss, D. Application of Flow Cytometric Techniques to Veterinary Clinical Hematology. Vet Clin Pathol 2002;31:72-82.
35. Szczotka M, Kawiak J, and Winnicka A. Determination Of Lymphocyte Subsets And Pdna Activity In Sheep Experimentally Infected With Bovine Leukemia Virus (BLV). Bull Vet Inst Pulawy 2003;47:45-50.
36. Davis E, Wilkerson M and Rush B. Flow Cytometry: Clinical Applications In Equine Medicine. J Vet Intern Med. 2002;16(4):404-410.
37. Javed M, Frasca S, Rood D, Cecchini K, Gladd M, Geary S and Silbart L. Correlates of Immune Protection in Chickens Vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* Strain GT5 following Challenge with Pathogenic *M. gallisepticum* Strain R<sub>low</sub>. Infect Immun 2005; 73(9):5410-5419.
38. Cassataro J, Velikovskiy C, De la Barrera S, Estein S, Bruno L, Bowden R, Pasquevich K, Fossati C and Giambartolomei G. A DNA Vaccine Coding for the Brucella Outer Membrane Protein 31 Confers Protection against *B. melitensis* and *B. ovis* Infection by Eliciting a Specific Cytotoxic Response. Infect Immun 2005; 73(10):6537-6546.

39. Buddle B, McCarthy A, Ryan T, Pollock J, Vordermeier H, Hewinson R, Andersen P and De Lisle G. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet Rec* 2003; 153:615-620.
40. Christensen P, Stenvang J and Godfrey W. A Flow Cytometric Method For Rapid Determination Of Sperm Concentration And Viability In Mammalian And Avian Semen. *J Androl* 2004;25:255-264.
41. Dolezel J and Bartos J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Ann Bot* 2005;95:99-110.
42. Doust A. Architectural Evolution and its Implications for Domestication in Grasses. *Ann Bot* 2007; 100 (5): 941-950
43. Noirot M, Poncet V, Barre P, Hamon P, Hamon S and De Kochko A. Genome Size Variations in Diploid African *Coffea* Species. *Ann Bot* 2003; 92:709-714.
44. Hendrix B and Mcd. Stewart J. Estimation of the Nuclear DNA Content of *Gossypium* Species. *Ann Bot* 2005; 95:789-797.
45. Price H, Dillon S, Hodnett G, Rooney W, Ross L and Johnston J. Genome Evolution in the Genus *Sorghum* (*Poaceae*). *Ann Bot* 2005; 95:219-227.
46. Pillary M, Ogundiwin E, Tenkouano A, and Dolezel J. Ploidy and Genome Composition of *Musa* Germplasm and the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *Afri J Biotech* 2006; 5(13):1224-1232.
47. Srisawat T, Kanchanapoom K, Pattanapanyasat K, Srikul S and Chuthammathat W. Flow Cytometric Analysis Of Oil Palm: A Preliminary Analysis For Cultivars And Genomic DNA Alteration. *Songklanakarin J Sci Technol* 2005;27(suppl 3):645-652.
48. Chan C and Kepler T. Computational Immunology: From Benchtop to Virtual Reality. *Ann Acad Med Singapore* 2007;36(2):123-127.
49. Bernas T, Grégori G, Asem E and Robinson J. Integrating Cytomics and Proteomics. *Mol Cell Prot* 200; 5:2-13.
50. Wattanaphansak S, Gebhart C, Olin M, and Deen J. Measurement of the Viability of *Lawsonia intracellularis*. *Can J Vet Res* 2005; 69:265-271.
51. Trieschmann L, Navarrete A, Kaschig K, Torkler S, Maas E, Schätzl H, and Böhm G. Ultra-Sensitive Detection of Prion Protein Fibrils by Flow Cytometry in Blood from Cattle Affected with Bovine Spongiform Encephalopathy. *BMC Biotech* 2005;5:26-30.