

## Flow sitometrinin mikrobiyoloji alanında kullanımı

Ceren AY<sup>1</sup>, \*Zerrin CANTÜRK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Efeler mh. Atatürk blv. Alaçam cd. No:12/A Efeler/Aydın,

<sup>2</sup>Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, Eskişehir

### ÖZET

Bu derlemede, süspans hücrelerin bir akış kanalı boyunca geçerken tek tek deteksiyonunu ve ayrışımını sağlayan, çalışma prensibinin temelinde antijen-antikor reaksiyonu bulunan ve günümüzde lösemi, lenfoma gibi birçok hastalığın teşhisinde hızlı ve güvenilir sonuç veren flow sitometri cihazının mikrobiyolojiye olan katkısı ve son yıllarda kaydedilen gelişmeler ele alınmıştır. Flow sitometrinin ilk ortaya çıkış amacı hematolojik hastalıklara hızlı ve güvenilir tanı koyabilmektir. Bu amacına yıllarca hizmet ettikten sonra diğer bilim dalları tarafından da flow sitometriye olan ilgi gün geçtikçe arttı. Bunun nedeni, antijen-antikor reaksiyonunun geri dönüşümsüz (irreversibl) çalışması, hızlı, güvenilir ve doğru sonuçlar vermesiydi. Mikrobiyolojide özellikle su örneklerinden bakteri, maya ve küf varlığını tespit etmek için, patojen mikroorganizmaların hızlı tespiti için ve antimikrobiyal aktivite testlerinde de oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır.

### Anahtar

### Kelimeler:

Antimikrobiyal,  
flow sitometri,  
mikroorganizma

## The use of flow cytometry in microbiology

### ABSTRACT

In this study of review, flow cytometry device that detects and decomposes the suspended cells when they go through a flow canal, working principle based on antigen-antibody reaction and gives rapid and reliable results in the diagnosis of lots of diseases like leukemia and lenfoma, has been investigated in point of its contribution to microbiology and recent developments. The first attempt to develop this device had the purpose to diagnose the hematological diseases rapidly and safely. After the flow cytometry has been served to that purpose the attention on it has been increased day by day by the other disciplines. The cause was the antigen-antibody reaction works irreversibly and gives results which was rapid, reliable and correct. The device has recently introduced to identify the bacteria, yeast and mould presence from the water samples, the rapid determination of the pathogen microorganisms and in antimicrobial activity tests in microbiology

### Key Words:

Antimicrobial,  
flow cytometry,  
microorganism

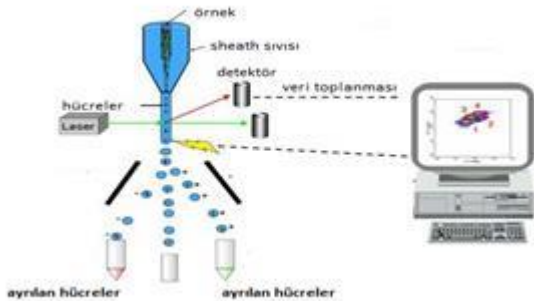
## Giriş

Flow sitometri, süspansen hücrelerin bir akış kanalı boyunca geçerken tek tek deteksiyonunu ve ayrışımını sağlayan bir cihazdır. 1934 yılında Moldaven isimli araştırmacının “akım boyunca kan hücrelerinin sayımı” tekniğini pekiştirmesi ile başlayan tarih süreci hızlı adımlarla gelişmiş ve günümüzde hücrelerin tek tek araştırılması aşamalarına kadar gelmiştir. Flow sitometri bu hızlı gelişimi sonrasında ışık mikroskopuna üstünlük sağlamıştır. Işık mikroskopunda bir defada  $10^2 - 10^3$  hücre yaklaşık 5 dakikada incelenebilirken, flow sitometride  $10^3 - 10^6$  hücre bir dakika gibi kısa bir sürede incelenebilmektedir (Dunphy., 2004). Ayrıca ışık mikroskopunda çalışma sonrası pozitif negatif olarak sonuç verilebilirken, flow sitometride yarı otomatik bir işlem sonrası çok parametrelili bilgiye ulaşılabilmektedir. Bu verilere dayanarak günümüzde flow sitometri pek çok araştırmada kullanılmaktadır (Laane et al., 2005) Flow sitometri, akım sitometri veya akış sitometri olarak da literatürlerde isimlendirilmektedir. Mikrobiyoloji alanında flow sitometri kullanılmasının en önemli özelliği, her bireysel hücre için veri toplanmasıdır. Bu durum, araştırmacının bir populasyon içindeki dağılım özelliğini veya özelliklerini ölçebilmesini sağlar (Karaboz et al., 2008).

### 1. Flow sitometrinin çalışma prensibi

Flow sitometrinin, her bir hücrenin lazer demetinin içinden geçerken dalga boyuna göre yönlendirilen lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan fluoresan ışığı ile bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar yardımıyla farklı dalga boylarına göre ayrılarak, sinyallere dönüştürüldüğü bir çalışma prensibi vardır. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur (Ormerod et al., 2000)

Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek olmalı kümeleşmemelidir. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, fluoresan ışığı yayarlar (Jaroszeski and Heller., 1998).



**Şekil 1:** Flow sitometrinin çalışma prensibini özetleyen illüstrasyon. Türkçeleştirilmiştir.

( <http://www.mpi-bremen.de/Page3829.html>)

### 2. Mikrobiyolojide flow sitometrinin yeri

Flow sitometri ilk olarak araştırma amacıyla kullanılmaya başlamıştır. Daha sonra; hematoloji, immünoloji, patoloji laboratuvarlarında normal ve kanserli hücre tiplendirilmesinde kullanımı giderek artmıştır. Son yıllarda ise klinik kullanımı daha da genişleyerek; mikrobiyolojide mikroorganizmaların canlılığını, sayısını, tanımlanmasını, patogenezi, antibiyotiklerin etki mekanizmalarını ve duyarlılıklarını saptamada kullanılmaktadır (Button and Robertson., 1993).

Mikrobiyologlar açısından flow sitometrik metodun en önemli özelliği, her bir mikroorganizma için veri toplanmasıdır. Bu durum, araştırmacının bir populasyon içindeki dağılım özelliğini veya özelliklerini ölçebilmesini sağlamaktadır (Shapiro., 1990).

Mikrobiyal populasyonlardaki heterojenitenin birçok farklı sebebi vardır. Genetik farklılıklar, mutasyon ve plazmid eksikliği sonucunda artış gösterir. Ayrıca heterojenlik, hücre çevrimindeki farklılıklara sebep olur. DNA içeriğini flow sitometrik ölçümü, heterojenitenin belirlenmesi ve anlaşılmasında, antibiyotiklerin ve diğer çevresel uyarıcıların etkilerinin anlaşılmasında önemlidir (Winson and Davey., 2000).

#### 2.1. Flow sitometri'nin mikrobiyolojide kullanımı ve tarihsel gelişimi

1987 yılında Human ve arkadaşları idrarda bakterileri flow sitometri kullanarak saptamışlar ve ilk klinik uygulamayı başlatmışlardır (Human and Rowe., 1987; Allman et al., 1992). Daha sonraları, 1990'lı yıllarda 'flow chamber'a yeni ilaveler yapılmış ve mikroorganizma çalışmaları için uygun hale getirilmiştir. Ayrıca 1990 yılında David Lloyd tarafından yazılan "Mikrobiyolojide flow sitometri" kitabı araştırmacılar için rehber olmuş ve sonraki yıllarda mikrobiyolojik çalışmalar hızla artmıştır (Lloyd., 1993).

#### 2.2. Mikrobiyolojide kullanılan flow sitometri parametreleri

##### 2.2.1. hücre büyüklüğü

Mikroorganizmalar, ökaryot hücrelerden boyut ve volüm olarak oldukça küçüktür. Bu nedenle, flow sitometride küçük partiküllerin hassas bir şekilde ölçümü; partikül büyüklüğü ile orifis büyüklüğünün uyumuna bağlıdır. Yeni geliştirilen flow sitometri cihazları ile karışık hücre populasyonunda mikroorganizmaları, kendi büyüklüklerine ve morfolojik karakterlerine göre ışık saçılımına göre ölçerek tespit etmek kolaylaşmıştır. Bu parametre ile mantarlar, bakterilerden boyut olarak büyük olduğundan; flow sitometride kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Howard., 2001).

##### 2.2.2. DNA içeriği

Mikroorganizmaların DNA içeriği, akrinin oranj, DAPI, mitramisin veya propidyum iyodid gibi floresan boyalarla çok rahatlıkla ölçülebilmektedir. Fakat bakteriler ve diğer bazı mikroorganizmalar DNA içeriğinden, çeşitli kültür ortamlarında DNA sentezi devam ettiğinden ve DNA içeriği çoğaldığından mikroorganizma tanımlanmasında kullanılmaktadır. Sadece steril koşullarda, antibiyotiklerin veya ilaçların etkilerini bir veya iki üreme zamanında hücre büyümesine etkisini flow sitometride ölçmek, DNA miktarını saptamakla mümkün olmaktadır (Steen et al., 1982).

### 2.2.3.DNA baz kompozisyonu

Bakterilerin sınıflandırılmasında bugün genetik inceleme yöntemleri önemli bir yer tutmaktadır. Kromozomda bulunan Guanin (G)+ Sitozin (C) miktarlarının toplamının, tüm DNA miktarlarına oranı, her bakteri türü için sabittir. Buna göre G+C/DNA sayıları aynı ya da birbirlerine çok yakın olan kökenlerin aynı türden sayılması temeline dayanmaktadır (Shapiro., 1990). G-C oranlarının değişimine bağlı olarak farklı bakteriler ayrılabilir. Flow sitometride, A-T veya G-C'ye değişik bağlanma afiniteleri olan floresan boyaları kullanarak, bakterilerin tanımlaması mümkündür. DNA boyalarından Hoechst boyası ve DAPI ultraviyole ışığında mavi floresan verir ve kuvvetli olarak A-T'ye özgüdür. Kromomisin A3 , mitramisin ve olivomisin mavi ışıkta yeşil ve sarı floresan verir ve kuvvetli olarak G-C baz çiftine özgüdür (Vandilla et al., 1983).

Hoechst 33258 ve Kromomisin A3 boyaları flow sitometride bakterileri tanımlaması ve kromozomların ayırımı için kullanılır. Eşit büyüklük ve DNA içeriği aynı olan kromozomları, A-T ve G-C'den zengin bölgelerin değişik büyüklüklerine göre tiplendirmek mümkündür. Bu kromozom bantları mikroskopta rahatlıkla görülebilmektedir. Van Dilla ve arkadaşları çift lazerli flow sitometri kullanarak 350 ve 457 nm'de, DNA baz çiftlerine göre örneğin; *Staphylococcus aureus* (%31 G-C) , *Escherichia coli* (%50 G-C) ve *Pseudomonas aeruginosa* (%67 G-C)'yı, Hoechst 33258 ve Chromomycin A3 boyasını kullanarak tiplendirmişlerdir (Van Dilla et al., 1983).

### 2.2.4.RNA içeriği

Floresan boyalardan akrinin oranj ve pyronin Y kullanarak, memeli hücrelerde RNA içeriğine göre identifikasyon yapılabilmektedir. Ökaryot hücre tanımlamasında, değişik büyüme ve gelişme aşamasında flow sitometride RNA içeriği ölçülerek kullanılmaktadır. Fakat bakterilerde RNA içeriği, büyüme sırasında aynı bakteri olmasına rağmen değişeceğinden, bakteri identifikasyonuna tek başına kullanılmamakta, fakat mikrobiyolojide diğer parametrelerle birlikte kullanılmaktadır (Wenisch et al., 1983).

### 2.2.5.Protein içeriği

Protein içeriği, bakteri identifikasyonu için RNA içeriğinden daha önemlidir. Boyalardan fluorescein isothiocyanate (FITC) proteinlere kovalent bağlarla bağlandığından, asit boyalara göre daha fazla tercih edilmektedir. Kovalent bağlarla bağlanmayan diğer boyalar kullanıldığı zaman, arka planda floresan vermekte ve yorum zorlaşmaktadır. FITC aynı zamanda propidyum iyodid ile birlikte kullanılarak, bakterinin DNA ve protein içeriğini birlikte değerlendirme olanağını sağlar. Protein içeriği ve DNA baz içeriğini kullanarak, bakteri, mantar, protozoa ve alg ayırımı literatürde rapor edilmiştir (Ormerod., 2000).

### 2.2.6.Hücre antijenleri ve yoğunlukları

Spesifik monoklonal antikorların bulunışı ve bunların floresan boyalarla bağlanması, klinik laboratuvarlarda ve araştırmalarda, flow sitometri ile hücre alt gruplarını tiplendirmek mümkün olmuştur. Yüzey antijen yoğunluğu bakımından, bakteri ve ökaryot hücre karşılaştırıldığında; hücre başına düşen antijen yoğunluğu bakteride 1000 civarında iken, ökaryot hücrede 100.000 kopya civarındadır. Bu kadar çok antijenin tanımlanmasında flow sitometri en uygun cihazdır. Mikroorganizmalara spesifik monoklonal antikorların bulunışı ve hazırlanabilmesi, mikrobiyolojik tanıda flow sitometrinin önemini göstermiş; bakteri, mantar, virüs ve parazit infeksiyonların tanımlanmasının kolay ve ucuz olmasını sağlamıştır (Lloyd., 1993).

### 2.2.7.Metabolik aktivite ve mikrobiyal canlılığın indikatörü olarak membran potansiyelinin kullanılması

Ökaryot hücrelerde, sitoplazmik membranda bulunduğu gibi 10-100 mV elektrik potansiyeli vardır. Aynı zamanda ökaryot hücrenin mitokondri membranında da 100 mV elektrik potansiyeli vardır ve metabolik aktivite için aktif enerji metabolizmasına gerek duyulur. Bakterilerde ise enerji metabolizması, sitoplazmanın iç membranında lokalizedir ve mitokondriyal membran potansiyelinin karakteristik özelliğini taşır. Bakteriler, yeterli enerji kaynağı olan ortama aktarıldığında 1-2 dakika sonra membran potansiyeli değişir. Bakterilerin bu özelliğinden yararlanarak membranı kimyasal veya fiziksel etkenlerle parçalamak mümkündür. Örneğin; bakteriyel penisilin veya ısı uygulanabilir. Ayrıca iyonoforlardan gramisidin ise hücre membran iyon gradientini değiştirerek, membran geçirgenliğini değiştirir (Jaroszeski and Heller., 1998). Membran potansiyelini (MP) direkt olarak mikroelektrotlar kullanarak ölçmek ökaryotik hücrede oldukça zordur ve özellikle bakterilerde imkansızdır. Bunun yerine MP'ni indirekt olarak floresan boyalarla flow sitometride ölçmek son derece kolaydır. Aynı ortamda, mikroorganizma ve membran potansiyeli olmayan benzer büyüklükte olan organik partiküllerin ayrılması önem taşır. Canlı organizmalar, canlı olmayan partiküllerden boyutları ve membran potansiyelleri ile ayırdedilebilirler. Flow sitometride basit bir örnekte mikroorganizmayı saptayabildiğimiz gibi bakteri ve mantar ayırımını, Gram pozitif ve negatif bakteri ayırımını 10 dakikalık kısa bir sürede floresan syanin boyasıyla ayırt edebiliriz. Flow sitometride, Gram boyasıyla karşılaştırmak için yapılan bazı çalışmalarda floresan MP prob (100nM heksametilindodikarbosiyanin) ve gramisidin birlikte kullanılır. Ayrıca eğer Gram negatif bakterilerle bir çalışma yapılacak ise, bu bakterilerin dış membranları daha kalın lipid tabakası içerdiğinden, boyaların ve inhibitörlerin geçebilmesi için ortama EDTA ilave edilmesi gereklidir. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonu büyüklük skalasında 2 dakikada sayılabilir ve 10<sup>4</sup> cfu/ml bakteriyi saymak için konsantrasyon işlemine gerek duyulmaz. Gram pozitif ve negatif bakteri ayırımı için EDTA içeren ve içermeyen tüpler kullanılmalıdır. EDTA içermeyen tüpte Gram pozitif bakteriler boyanacak, Gram negatif bakteriler ise kalın lipid tabakası nedeniyle boyanmayacaktır (Allman et al., 1992). Ayrıca, Gram boyaması ile eşdeğer olabilecek iki nükleik asit boyası; SYTO-9 (yeşil floresan) ve heksidium iyodid (kırmızı floresan) flow sitometride kullanılarak; canlı Gram pozitif bakterileri yeşil, Gram negatif bakterileri kırmızı boyayarak birbirlerinden ayırt etmek mümkündür. Fakat canlı olmayan bakterilerde hücre membranı bozulduğundan, boyanma stabil olmayıp değişken olduğundan; bakterilerin tanımlanması için kullanılmamaktadır. Normal kültür ortamında bakteriler, kendileri için gerekli olan besiyerlerinde üremeleri için saatlerden günlere kadar uzun bir süreye gereksinim duyarlar. Membran potansiyeli çalışmalarında ise dakikalarla ölçülebilen kısa bir zamanda flow sitometride bakteriler, üremelerine gerek olmadan saptanabilir. Antibiyotiklerin etkilerini göstermek amacıyla yapılan flow sitometri çalışmalarında, belli zamanda total bakteri sayısı ve membran potansiyelindeki değişikliklerle saptanabilir. Ayrıca ortamda tek bir mikroorganizma olduğu zaman da, antibiyotik duyarlılık çalışmaları flow sitometride yapılabilmektedir (Lloyd., 1993).

### 2.3.Mikrobiyolojide flow sitometrinin kullanım alanları

#### 2.3.1.direkt tanı

**Bakteri:**Bakterilerin saptanması ve tanımlanması, belli bir sürenin sonunda metabolik yan ürünlerinin ortaya çıkmasından sonra yapılabilir. Mikroorganizmanın öncelikle üretilmesi, sonra çoğaltılması gereklidir. Birinci inkübasyonun sonunda mikroorganizmanın, bazı besiyerlerinde üremesi, bazılarında ürememesi, koloni morfolojisi; bize mantar mı, yoksa bakteriyel bir köken mi olduğu hakkında bilgi verir. Üreyen mikroorganizmanın mikroskopik olarak boyanarak incelenmesi, Gram pozitif veya negatif olduğu hakkında bilgi vermektedir. Kesin olarak bakterilerin tiplendirilmesi, yapılacak yan testlerle mümkün olmaktadır. Antibiyotik hassasiyetleri de, farklı konsantrasyonlar içeren değişik antibiyotiklerle yapılarak tespit edilmektedir (Clark and Pinder., 1998). Bakterileri bulunan örnekte saptamak, flow sitometri yardımı ile kısa sürede mümkün olmaktadır. Bakterileri minimal bir inkübasyon süresi sonunda, tam olarak üremesi başlamadan saptamak ve aynı zamanda canlılığını tespit etmek mümkündür. Bakterinin canlılığını belirlemek için, normal kültür ortamında ATP içeriğini ve solunum aktivitesini ölçmek mümkün değildir. Ayrıca cansız bakteriler ortamda olduğu halde üremeyecek, sadece canlı bakteriler üreyecektir. Flow sitometri ile bu parametreler hızlı olarak ölçülür ve kantitatif olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle toplam bakteri sayımı flow sitometri ile daha doğru ve çabuk olarak yapılmaktadır (Clark and Pinder., 1998). Klinik mikrobiyolojide bakterilerin sayısını ve canlılığını saptamak için yapılan çalışmalar ilk kez steril vücut sıvılarında denenmiş, 1985 yılında Mansour ve arkadaşları etidium bromid floresan boyasını kullanarak kanda üreyen 10/ml *E.Coli*'yi saptamışlardır (Mansour et al., 1985). Flow sitometri kullanarak, özellikle üremesi zor ve uzun zaman alan bakterilerle yapılan çalışmalarda; özgül floresan antikor kullanılarak, *Haemophilus* (Shrikumar et al., 1992), *Mycobacterium* (Ozanne et al., 1996), *Brucella* (Bownds et al., 1995), *Branhamella catarrhalis* (Bhushan et al., 1997), *Mycoplasma fermentans* (Cheek et al., 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (Hughes et al., 1996), *Bacteroides fragilis* (Lotton et al., 1991) ve *Legionella* (Ingram et al., 1982) gibi bakteriler 30 dakika gibi kısa sürede, bir mililitrede 100 hücre gibi çok az miktardaki bakteri ile yapılan çalışmalarda saptanmıştır.

**Mantar:** Flow sitometri ile mantarlardan özellikle mayalarla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Chaffin ve arkadaşları 1998 yılında, spesifik antikorlara bağlanan *Candida albicans*'ın yüzey antijenlerini; flow sitometri yöntemini kullanarak saptamışlardır (Chaffin et al., 1998). Mayalarla yapılan diğer bir çalışmada, flow sitometri ile *Candida albicans*'ın A ve B olmak üzere iki önemli serotipi belirlenmiştir. Mercure ve arkadaşları tarafından yapılan bu epidemiyolojik çalışmada latron faktör 6 ve *Candida albicans* antiserumu kullanılmış ve *Candida albicans*'ın tiplendirmesi kolaylıkla yapılmıştır (Mercure et al., 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Candida albicans* ve *Saccharomyces*'in proteininde lokalize, yeşil floresan veren protein (GFP) bulunmuştur. Cormack ve arkadaşları tarafından gösterilen bu proteinin, ileride flow sitometride mantar elemanlarının tesbitinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir (Cormack et al., 1997).

**Parazit:** Flow sitometri ile bakteri ve mantarlarda olduğu gibi parazitlerle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Vesey ve arkadaşları *Cryptosporidium* ookist duvarına spesifik monoklonal antikorlarını flow sitometride kullanmış ve mikroskopi ile karşılaştırmışlar, flow sitometri sonuçlarının

daha hassas olduğunu göstermişlerdir (Vesey et al., 1997). Williams ve arkadaşları ise *Leishmania* membran antijenlerini; spesifik monoklonal antikor kullanarak, flow sitometri ile saptamışlar ve Western blot yöntemiyle karşılaştırmışlardır (Williams et al., 1986). Dixon ve arkadaşları da *Giardia lamblia* kistlerini; dışkıda ışık floresan mikroskopi ve flow sitometri kullanarak araştırmışlar; floresan mikroskopi ve flow sitometri birlikte kullanıldığı zaman çok az sayıda kistleri bile rahatlıkla saptayabildiklerini göstermişlerdir (Dixon et al., 1997).

**Virüs:** Flow sitometri ile yüzey veya infekte hücrelerde bulunan viral antijenler rahatlıkla saptanabilmektedir. Aynı zamanda monoklonal antikorlar kullanarak kantitatif antijen tayini de yapılabilmektedir. Flow sitometri ile virüsle infekte tek hücrede; birden çok virüs antijen parametresine bakılabilmektedir. Ayrıca virüsle infekte hücrelerin kantitatif sayımı da yapılabilmektedir. Hepatit ve herpes enfeksiyonlarının tanısında kullanılan antijenleri, flow sitometri yöntemiyle de saptamak mümkündür. Bu amaçla hepatit B enfeksiyonlarında araştırılan HbsAg, HbcAg, hepatit C enfeksiyonlarında HCV sitoplazma Ag, HCV core Ag, herpes enfeksiyonlarında HSV-1, HSV-2, HHV-8, ayrıca HIV ile enfekte hücrelerde p24, p17, gp41 antijeni flow sitometri ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Virüs nükleik asitleri, rutin viroloji laboratuvarlarında kullanılan; PCR, rPCR, RT-PCR gibi tekniklerle saptanabilmektedir. Bu teknikler çok duyarlı olup, viral nükleik asitleri; DNA veya RNA'yı virüsle infekte hücrede gösterebilmektedir. Fakat bu yöntemlerle; viral nükleik asitlerle infekte hücre arasındaki bağlantı ve infekte hücre popülasyonundaki çoğalma ile ilgili bilgiler elde edilememektedir. Flow sitometri; *in situ* hibridizasyon yöntemi ile birlikte bu problemi çözmektedir. Virüs salgılayan periferik kan hücrelerinde HIV-1 RNA, *in situ* hibridizasyon yöntemi ile birlikte flow sitometride gösterilmiştir. Ayrıca CMV-DNA pp65 antijeni, T lenfoblastik hücrelerde *in situ* hibridizasyon yöntemi ile birlikte flow sitometride dört saat gibi kısa sürede saptanabilmiş ve periferik kanda bulunan mononükleer hücreler, aktif CMV enfeksiyonlu hastalarda kantitatif olarak sayılabilmıştır. Ayrıca virüs enfeksiyonlarında, çeşitli hücrelerin yüzeylerindeki hücresel antijenlerin salınımı, ne yönde etkelediği ve bu olayların patogeneze nasıl yansıdığı flow sitometri yöntemi ile mümkün olmaktadır (Pavic et al., 1997).

#### **Bakterilerin antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi**

Bakterilerin antibiyotik hassasiyetleri ile ilgili; bakterilerin canlılığını, DNA içeriğini, hücre membranına etkisini, antikor bağlanması, metabolik etkileri, protein içeriğinden bir veya birden fazla parametreyi birarada kullanan birçok çalışmalar yapılmıştır. Suller ve arkadaşları metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un hızlı antibiyotik duyarlılık testini trimethine oxonol (DIBAC4) kullanarak 2 ile 4 saat içinde saptamışlardır (Suller et al., 1997). Antibiyotiklerle yapılan diğer bir çalışmada Jepras ve arkadaşları *Escherichia coli*'nin flow sitometride DIBAC4 boyasını kullanarak, çeşitli antibiyotiklerin duyarlılıklarını saptamışlardır. Bu çalışmada azithromycinin *E. coli* üzerine etkisini göstermişlerdir (Jepras et al., 1997).

#### **2.3.2.Serolojik tanı**

Mikroorganizmaların tanımlanması, direkt olarak yapılabildiği gibi, serumda bulunan bakteri, mantar, parazit ve virüs antikorlarını ölçerek de yapılabilmektedir. **Bakteri:***Helicobacter pylori* antikorlarını saptamak amacıyla; Best ve arkadaşları 55 hastadan alınan serum örneklerini flow sitometri yöntemiyle çalışmışlardır. Aynı araştırmacılar, serumları ELISA yöntemiyle de çalışmış, iki yöntemin hassasiyetinin aynı olduğunu göstermişlerdir (Best et al., 1992).

Ianelli ve arkadaşları ineklerin süt ve serumunda *Brucella abortus* ve *Staphylococcus aureus*'a ait antikorları araştırmışlar; bu çalışmada flow sitometri yöntemi ile iki bakteriye karşı oluşmuş antikorları aynı anda saptamışlardır (Ianelli et al., 1998). Flow sitometri ile bakteri toksinlerini de saptamak mümkündür. Tapp ve Stotzky, *Bacillus thuringiensis* toksinlerini saptamak amacıyla flow sitometri yöntemini kullanmışlar ve ELISA'dan daha hızlı ve daha sensitif olduğunu göstermişlerdir (Tapp and Stotzky., 1997). Lyme hastalığı olan hastalardan alınan serumlarda, Callister ve arkadaşları akrinin oranj floresan boyasını kullanarak; *Borrelia burgdorferi* bakterilerin canlılığına flow sitometri ile bakarak, hastalığın erken ve geç dönemde serolojik tanısını koymuşlardır (Callister et al., 1996).

**Mantar:** Mantar hastalıklarının tanısında, hasta serumunda antikorlara bakmak ve bunun için flow sitometri kullanımı ilk kez Libertin ve arkadaşları tarafından 1984 yılında tarif edilmiştir (Libertin et al., 1984). Bergbrant ise flow sitometriyi kullanarak, seboreik dermatitli hastaların serumlarında *Pityrosporum ovale* antikorlarını araştırmışlardır (Bergbrant., 1991).

**Parazit:** Parazit infeksiyonların serolojik tanısında da flow sitometri kullanılmış; Martins-Filho ve arkadaşları *Trypanosoma cruzi* membranına spesifik antikorlara bu yöntemle bakmışlardır (Martins et al., 1995). Cozoon ve arkadaşları da, *Toxoplasma gondii* IgM, IgG ve IgA antikorlarını kantitatif olarak flow sitometri ile ölçmüşlerdir (Cozon et al., 1993).

**Virüs:** Viral antijenlere karşı oluşan spesifik antikorlar, rutin olarak ELISA, kompleman fiksasyon, floresan antikor testi, Western blot gibi yöntemlerle bakılmakla birlikte flow sitometri ile de saptanabilmektedir. Bu konuyla ilgili CMV, HSV-1 ve HSV-2 HCV, HIV-1 gibi virüs antikorları flow sitometri ile kantitatif olarak ölçülmüştür. (McHugh et al., 1997) (Sligh et al., 1989).

#### 2.4. Flow sitometri ile antimikrobiyal etki ve antibiyotik hassasiyet çalışmaları

Flow sitometri ile ilk kez antimikrobiyal etki çalışmaları 1980'li yıllarda başlamış, 1990'lı yıllarda giderek hız kazanmıştır. Mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarında antibiyotik hassasiyetleri, National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) referans yöntemlerden disk difüzyon, mikrodilüsyon, makrodilüsyon veya agar dilüsyon yöntemleri ile yapılmaktadır. Bu yöntemlerle mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları, 18-24 saat süren inkübasyonun sonucunda saptanabilmektedir. Son zamanda geliştirilen florojenik ve kolorimetrik teknolojilerle, özellikle bakterilerin antibiyotik hassasiyetleri 4-6 saat gibi kısa sürede yapılmaya başlanmıştır. Fakat mikobakteri gibi bazı geç üreyen bakteriler ve mantarların antibiyotik hassasiyetleri, klasik yöntemlerle geç üremeleri nedeniyle uzun sürmektedir. Ayrıca parazit ve virüslerin antimikrobiyal hassasiyetleri yapılamamaktadır. NCCLS tarafından antiparaziter ve antiviral ilaçların hassasiyetlerini ölçebilen referans yöntemler henüz oluşturulamamıştır.

#### Bakterilerin antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi

Bakterilerin antibiyotik hassasiyetleri ile ilgili; bakterilerin canlılığını, DNA içeriğini, hücre membranına etkisini, antikor bağlanışı, metabolik etkileri, protein içeriğinden bir veya birden fazla parametreyi birarada kullanan birçok çalışmalar yapılmıştır. Suller ve arkadaşları metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un hızlı antibiyotik duyarlılık testini trimethine oxonol (DIBAC4) kullanarak 2 ile 4 saat içinde saptamışlardır (Suller et al., 1997).

Antibiyotiklerle yapılan diğer bir çalışmada Jepras ve arkadaşları *Escherichia coli*'nin flow sitometride DIBAC4 boyasını kullanarak, çeşitli antibiyotiklerin duyarlılıklarını saptamışlardır. Bu çalışmada azithromycinin E. Coli üzerine etkisini göstermişlerdir (Jepras et al., 1997). Ayrıca Bownds ve arkadaşları *M. tuberculosis* dışı atipik mikobakterilerin antibiyotik hassasiyetlerine flow sitometri yöntemi ile bakmışlar; klasik yöntemlerden daha hızlı sonuç elde etmişlerdir (Bownds et al.,

1996). Hücre içi bakterilerden *Rickettsia*'ların antibiyotik hassasiyetleri klasik yöntemle; mikroskopik olarak Giemsa boyası ile boyanmış hücrelerde bulunan bakterileri sayma yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntem oldukça uzun ve pahalıdır. Kelly ve arkadaşları *Rickettsia tsutsugamushi* bakterilerini, hücre kültür ortamında üretip; antibiyotik hassasiyetleri flow sitometri ile daha hızlı ve kolay olarak saptamışlardır (Kelly et al., 1995). Hücre içi bakterilerden diğeri *Chlamydia trachomatis*'in antibiyotik hassasiyeti, klasik yöntemle mikroskopik incelemeye dayanmaktadır. Dessus-Babus ve arkadaşları doksasiklin, oflaksasin, eritromisin *Chlamydia trachomatis*'e duyarlılıklarını, flow sitometride FITC ile konjuge edilmiş monoklonal antikorlar kullanarak saptamışlardır (Dessus-Babus et al., 1998). Bakterilerin antibiyotik hassasiyet çalışmalarının yanında, bakterilerin postantibiyotik etkileri de flow sitometri yöntemiyle çalışabilmektedir. Klasik yöntemle postantibiyotik etki bakteri koloni sayımı ile yapılmaktadır. Suller ve arkadaşları metisilinin *Staphylococcus aureus*'a postantibiyotik etkisini flow sitometride çalışarak göstermişlerdir (Suller and Lloyd., 1998).

#### Mantarların antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde ve HIV'li hastalarda mantar infeksiyonlarının giderek artması, son yıllarda mantarların antibiyotik hassasiyetleri ile ilgili çalışmalarına hız kazandırmıştır. Normal rutin laboratuvarlarda mantarların antibiyotik hassasiyetleri, NCCLS referans yöntemlerden makrodilüsyon yöntemi ile 48-72 saat inkübasyonun sonunda saptanabilmektedir. Ayrıca E-testi, mikrodilüsyon, kolorimetrik yöntemler de uygulanabilmektedir.

1990'lı yıllardan sonra flow sitometri ile özellikle mayaların antibiyotik hassasiyetlerinin belirlenmesi çalışmaları giderek artmıştır. Mayaların antibiyotik çalışmalarında; Peyron ve arkadaşları NCCLS referans broth makrodilüsyon metodu ile mayaların *in vitro* Amphotericin B duyarlılığını flow sitometri yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Araştırmalarında membran potansiyeline hassas katyonik boyalardan DIOC5 kullanmışlar ve sonuçlarını NCCLS yöntemiyle karşılaştırdıklarında iki yöntemin uyum gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışma flow sitometri metodu olarak hızlı antifungal duyarlılığının gösterilmesi açısından önemli bulunmuştur (Peyron and Favel., 1997). *Candida albicans* ile ilgili yapılan diğer bir antifungal duyarlılık çalışması; Wenisch ve arkadaşları tarafından yapılmış ve bu çalışmada maya canlılığını gösteren yeni bir floresan prob FUN-1 kullanılmıştır. Flow sitometride 1 saatlik inkübasyon sonucunda Amfoterisin B, flusistosin, flukonazol ve ketakonazol duyarlılıklarını saptamışlardır (Wenisch et al., 1997).

#### Parazitlerin antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi

Zor üreyen bakteriler, mayalarda olduğu gibi rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında teknik zorluklar ve standardize metodların geliştirilememesi nedeniyle parazitlerin antibiyotik hassasiyetleri, genellikle araştırmaların dışında yapılamamaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar, flow sitometri ile parazit infeksiyonlarında kullanılan kemoterapötiklerin hassasiyetleri ve rutin laboratuvara uygulanışı ile çeşitli çalışmalar yapmışlardır.

Azas ve arkadaşları pentamidin, allopurinol ve amfoterisin B'nin *Leishmania infantum* üzerine olan etkisini DIOC-5 kullanarak membran potansiyelindeki değişiklikleri flow sitometri yöntemiyle ölçmüşlerdir (Azas et al., 1997).

#### **Virüslerin antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi**

Bilindiği gibi rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, antiviral ilaçlara karşı hassasiyet çalışmaları, virüslerin üreme zorluğu nedeniyle yapılamamaktadır. Yapılan virüs antibiyotik hassasiyet çalışmalarında, viral antijenler ve viral nükleik asitlerin tayini gibi değişik parametreler kullanılmakta ayrıca virüslerin patogenezi olan etkisi de araştırılmaktadır. Viral enfeksiyonlarla ilişkili viral parametreler; flow sitometri yöntemiyle hızlı şekilde ölçülebilmekte ve yeni çıkan antiviral ilaçların etki mekanizmaları saptanabilmektedir.

Rosenthal ve arkadaşları HSV virüsünün birçok antiviral antibiyotiklere etkilerini; hücre içi HSV DNA içeriğindeki değişiklikleri PI floresan boyası kullanarak flow sitometride ölçmüşlerdir (Rosenthal et al., 1987). Pavic ve arkadaşları ise HSV-1 virüsün gpC salınımını ölçerek asiklovir, gansiklovir ve foskarnet'in hassasiyetlerini flow sitometride saptamışlardır (Pavic et al., 1997).

Kesson ve arkadaşları daha farklı yöntem kullanarak, CMV virüsünün gansiklovire etkisini; erken ve geç antijenlerin spesifik monoklonal antikorlarını flow sitometride ölçerek saptamışlardır (Kesson et al., 1998). Pauwells ve arkadaşları da HIV-1 ile infekte T4 lenfositlerine AZT, ddCyd etkisini araştırmışlar; antibiyotiklerin viral antijenlerine etkisini flow sitometride ölçmüşlerdir (Pauwells et al., 1987). Poliovirüs ile infekte insan fibroblast hücre kültüründe, morfolojik olarak; büyüklük ve sitopatik etki ölçülerek antiviral ilaçların etkinliği ölçülmüştür. Ayrıca antiviral ilaçların etki mekanizmalarını saptamak ve geliştirmek için de flow sitometride değişik çalışmalar yapılmıştır.

#### **2.5. Flow sitometrinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanımı ve problemleri**

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında amaç; infeksiyon hastalıklarına olabildiğince çabuk ve doğru tanı koymak ve klinisyenle işbirliği yaparak hastaya yardımcı olmaktır. Sonuca varmak için deneylerin olabildiğince azaltılması ve güvenilirliği etkilemeden sürenin kısaltılması amaçlanmalıdır. Son yıllarda rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanan yeni otomasyon cihazları, kısa sürede ve güvenli sonuç vermek için düzenlenmiştir. Tek bir koloniden hazırlanan süspansiyon, bu cihazlar yardımıyla otomasyon olarak çok kuyucuklu plaklara yayılmakta ve inkübe edilmektedir. Bakteri ürettiği zaman bilgisayar aracılığı ile bakteri tanımlanması ve antibiyotik hassasiyeti, hiçbir işleme gerek duyulmadan direkt olarak rapor edilmektedir. Flow sitometri mikrobiyoloji cihazları arasında sayılmakla birlikte daha çok kan hücrelerinin sayımı ve hücre ayırımı yapabilen bir cihaz olarak dizayn edilmiştir. Rutin laboratuvarında mikrobiyolojide fazla kullanılmama nedeni ise, cihazda otomasyon düzenlemenin mikrobiyoloji için yapılmamasıdır.

#### **SONUÇ**

Flow sitometrinin bu olumsuzluklara rağmen üstün olduğu yönler de vardır ve şu şekilde özetlenebilir. Çok az sayıdaki mikroorganizmayı spesifik probalar kullanarak flow sitometride saptamak, yapılması ve üretilmesi oldukça zor olan, zaman alan virüs veya parazit kültürleri yerine spesifik probalar kullanarak bu mikroorganizmaları tanımlamak flow sitometride oldukça ucuz ve kolaydır. Tedaviye hemen başlanması gereken bazı durumlarda özellikle mantar enfeksiyonlarında, mayaların antibiyotik duyarlılıklarını

saptamada, yapılması zor olan ve zaman alan virüs veya parazit antibiyotik duyarlılıklarını flow sitometride kısa sürede sonuçlandırmak ucuz, kolay ve hızlıdır.

#### **KAYNAKLAR**

1. Allman RA, Hann C, Manchee R, Lloyd D. Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometer. *J. Appl. Bacteriol* 73: 438, 1992.
2. Azas N, Di GC, Delmas F, Gasquet M, Timon-David P. Assessment of Amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* promastogotes by flow cytometry membrane potential assay. *Cytometry* 28: 165, 1997.
3. Bergbrant IM. Seborrhic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: cultural, immunological and clinical studies. *Acta Dermatol. Vener. Suppl* 167: 1, 1991.
4. Best LM, Veldhuyzen van Zanetn SJ, Benzanson GS. Serological detection of *Helicobacter pylori* by a flow microsphere immunofluorescence assay. *J. Clin Microbiol* 30: 2311, 1992.
5. Bhushan R, Kirkham C, Sethi S, Murphy TF. Antigenic characterization and analysis of the human immune response to outer membrane protein E of *Branhamella catarrhalis*. *Infect. Immun* 65: 2668, 1997.
6. Bownds SE, Cloeckert A, Zygmunt MS. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun* 63: 3945, 1995.
7. Bownds SE, Kurzynski TA, Norden MA, Dufek JL, Schell RF. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. *J. Clin. Microbiol* 34: 1386, 1996.
8. Button, D.K., Robertson, B.R., Use of High-Resolution Flow Cytometry to Determine The Activity and Distribution of Aquatic Bacteria, In: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. (Eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, Ann Arbor, MI, pp. 163-173, 1993.
9. Callister SM, Jobe DA, Schell RF, Pavia CS, Lovrich SD. Sensitivity and specificity of the borreliacidal-antibody test during early Lyme disease: a gold standart? *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 3:339, 1996.
10. Chaffin W, Ringler L, Larsen HS. Interactions of monospecific antisera with cell surface of *Candida albicans*. *Infect. Immun* 56: 3294, 1998.
11. Cheek RF, Olszak I, Madoff S, Prefer FI. *in vitro* detection of *Mycoplasma fermentans* binding to B lymphocytes in fresh peripheral blood using flow cytometry. *Cytometry* 28: 90, 1997.
12. Clarke RG, Pinder CA. Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. *J. Appl. Microb* 84: 577, 1998.
13. Cormack BP, Bertram G, Egerton M, Gow NA, Falkow S, Brown AY. Yeast-Enhanced Green Fluorescent Protein (YEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. 143: 303, 1997.
14. Cozon G, Roure C, Lizard G, Greenland T, Larget-Piet D, Gandilhon F, Peyron F. An improved assay for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in human serum by flow cytometry. *Cytometry* 14: 569, 1993.

15. Dessus-Babus S, Belloc F, Bebear CM, Poutiers F, Lacombe F, Barbeyrac B. Antibiotic susceptibility testing for *Chlamydia trachomatis* using flow cytometry. *Cytometry* 31: 37, 1998.
16. Dixon Br, Parenteau M, Martineau C, Fournier J.A. A comparison of conventional microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry in the detection of *Giardia lamblia* cysts in beaver fecal samples. *J. Immunol. Methods* 202: 27, 1997.
17. Dunphy, C.H., Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128:9, 1004-1022, 2004.
18. Howard MS. New applications of flow cytometry, microbiology. *Clinics in Lab. Med* 21: 897, 2001. Hughes E. E, Matthew-Greer JM, Gilleland HJ. Analysis by flow cytometry of surface exposed epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microb* 42: 859, 1996.
19. Human RP, Rowe GD. Automated screening for bacteriuria. *Med Lab Sci* 35: 223, 1987.
20. Ingram M, Cleary TJ, Price BJ, Castro A. Rapid detection of *Legionella pneumophila* by flow cytometry. *Cytometry* 3: 134, 1982.
21. Jaroszeski, M.J., Heller, R., Flow Cytometry Protocols, Volume 91, Humana Press Inc, Totowa, Nj, 1998.
22. Jepras RY, Paul FE, Peorson SC, Wilkinson MY. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by Trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrob. Agents and Chemoth* 41: 2001, 1997.
23. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Flow sitometri ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 6: 1-18, 2008.
24. Kelly DJ, Salata KF, Strickman D, Hershey JN. *Rickettsia tsutsugamushi* infection in cell culture: antibiotic susceptibility determined by flow cytometry. *Am. J. Top. Med. Hyg* 53: 602, 1995.
25. Kesson AM, Zeng F, Cunningham LA, Rawlinson WD. The use of flow cytometry to detect antiviral resistance in human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* 71: 177, 1998.
26. Laane,E., Tani,E., Bjorklund,E., Elmberger,G., Everaus,H., Skoog,L.,Porwit-MacDonald.A.,Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* 64B1, 34-42, 2005.
27. Lanelli D, L D'Apice, Fenizia D, Serpe L, Cottone C, Viscerdi M, Capparelli R, Simultaneous identification of antibodies to *Brucella abortus* and *Staphylococcus aureus* in milk samples by flow cytometry. *J. Clin. Microb* 36:802, 1998.
28. Libertin CR, Woloschak GE, Wilson WR, Smith TF. Analysis of *Pneumocystis carini* cysts with a fluorescence in activated cell sorter. *J. Clin. Microbiol* 20: 877 , 1984.
29. Lloyd D. Flow cytometry in microbiology. Springer-Verlag, London, United Kingdom, 1993.
30. Lotton DA, Patrick S, Crockard DA, Flow cytometric analysis of within strain variation in polysaccharide expression by *Bacteroides fragilis* by use of murine monoclonal antibodies. *J. Med. Microb* 35: 229, 1991.
31. McHugh TM, Miner RC, Logan LH, Stites DP. Simultaneous detection and quantitation of antibody to HCV by using flow cytometry and a microsphere based immunoassay. *J. Clin. Microbiol* 26: 106, 1997.
32. Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JR, Cancado JR, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 2: 569, 1995.
33. Mansour JD, Robson JA, Arndt CW. Detection of *Escherichia coli* in blood using flow cytometry. *Cytometry* 6: 186, 1985.
34. Mencure S, Senechol S, Avger P, Lemoy C, Montplaisir S. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. *J. Clin Microbiol* 34: 2106, 1996.
35. Ormerod, M., Flow Cytometry, A practical approach. Third Edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 2000.
36. Ozanne V, Ortalo-Magne A, Vercellona A. Cytometric detection of Mycobacterial surface antigens: exposure of mannosyl epitopes and of the arabian segment of arabinomannans. *J. Bacteriol* 178: 7254, 1996.
37. Pavic I, Hartmann A, Michel D, Hampl W, Schleyer I, Mertens T. Flow cytometric analysis of herpes simplex virus type 1 susceptibility to acyclovir and foscarnet. *Antimicrob Agents Chemoth* 41: 2686, 1997.
38. Pauwells R, Clerc ED, Desmyner J, Balzarini J, Goubau P, Herdwijn P. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J. Virol. Methods* 16: 171, 1987.
39. Peyron F, Favel A. Evaluation of a flow cytofluorometric method for rapid determination of Amphotericin B susceptibility of yeast isolates. *Antimicrob Agents Chemoth* 41: 1537, 1997.
40. Rosental KS, Hodnichak CM, Summers JL. Flow cytometric evaluation of anti-herpes drugs. *Cytometry* 8: 392, 1987.
41. Shapiro M. Flow cytometric approaches to clinical microbiology. *Labmedica*, 4: 20, 1990.
42. Sligh JM, Roodman ST, Tsai C. Flow cytometric indirect immunofluorescence assay with high sensitivity and specificity for detection of antibodies to human immunodeficiency virus(HIV). *Am. J. Clin. Pathol* 91: 210, 1989.
43. Srikumar R, Chin CA, Vachon V. Monoclonal antibodies specific to porin of *Haemophilus influenza* type b: localization of their cognate epitopes and tests of their biological activities. *Mol. Microb* 6: 665, 1992.
44. Steen HB, Boye E, Skarstad K. Applications of flow cytometry on bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects and quantitation of antibody binding. *Cytometry* 2: 249, 1982.
45. Suller MTE, Stark JM, Lloyd D. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimic. Chemoth* 40: 77, 1997.
46. Suller MT, Lloyd D. Flow cytometric assessment of the postantibiotic effect of methicilin on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth* 42: 1195, 1998.

47. Tapp H, Stotzky. Monitoring the insecticidal taxinis from *Bacillus thurigiensis* in soil with flow cytometry. Can. J. Microbial 43:1074, 1997.
48. Van Dilla MA, Langlois RG, Pinkel D. Bacterial characterization by flow cytometry. Science 220: 620, 1983.
49. Vesey G, Griffiths KR, Gauci MR, Deere D, Williams KL, Veal DA. Simple and rapid measurement of *Cryptosporidium* excystation using flow cytometry. Int Y. Parasitol 27: 1353, 1997.
50. Wenisch C, Linnav KF, Parschalk B. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. J. Clin. Microb 35: 5, 1997.
51. Williams KM, Sacci JB, Anthony RL. Characterization and quantitation of membrane antigens of New World *Leishmania* species by using monoclonal antibodies in Western blot and flow microfluorometric assays J. Protozool 33: 490, 1986. Winson, M.K., Davey, H.M., Flow Cytometric Analysis of Microorganisms, Methods, 21, 231-240, 2000.
52. Tapp H, Stotzky. Monitoring the insecticidal taxinis from *Bacillus thurigiensis* in soil with flow cytometry. Can. J. Microbial 43:1074, 1997.