

18-22 Kasım 2015

22.11.2015

14:23:46

**SADI  
KÖKSOY**

3. Ulusal  
Klinik Mikrobiyoloji  
Kongresi-2015

18-22 Kasım 2015  
Düzce, Konya Bülent  
Ecevit Akademi



# Tıbbi Mikrobiyolojide Flow Sitometri

**Prof. Dr. Sadi Köksoy**  
**Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Tıbbi Mikrobiyoloji AD**  
**Temel İmmünoloji BD**

# Sunum Planı

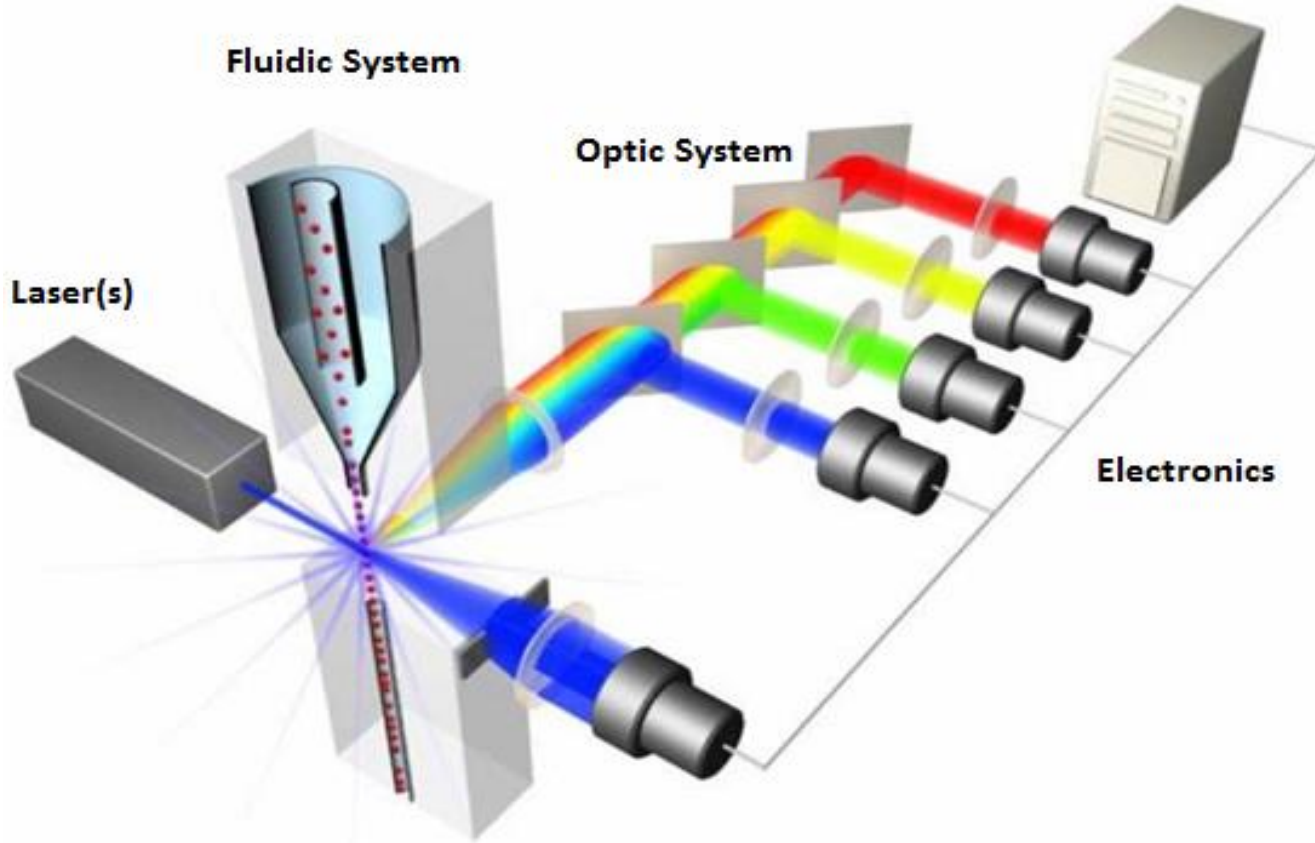
- Flow sitometri çalışma prensipleri
  - İmmünolojide kullanım alanları
  - Mikrobiyolojide kullanım alanları

# Kullanım Amacı

- Süspansiyon halindeki veya süspansiyon haline getirilmiş heterojen hücrelerin, kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesi
  - Fiziksel ve kimyasal özellikleri ve bu özelliklerdeki değişimlerin tespiti
  - Populasyon içindeki alt grupların oranları ve bu oranlardaki artış azalış gibi durumların tespiti
    - Absolut sayıları
  - Cihaza göre değişmekle birlikte yaklaşık 20 parametre
  - Cihaz uygunsa saflaştırıp izole ederek analiz ve manipülasyon

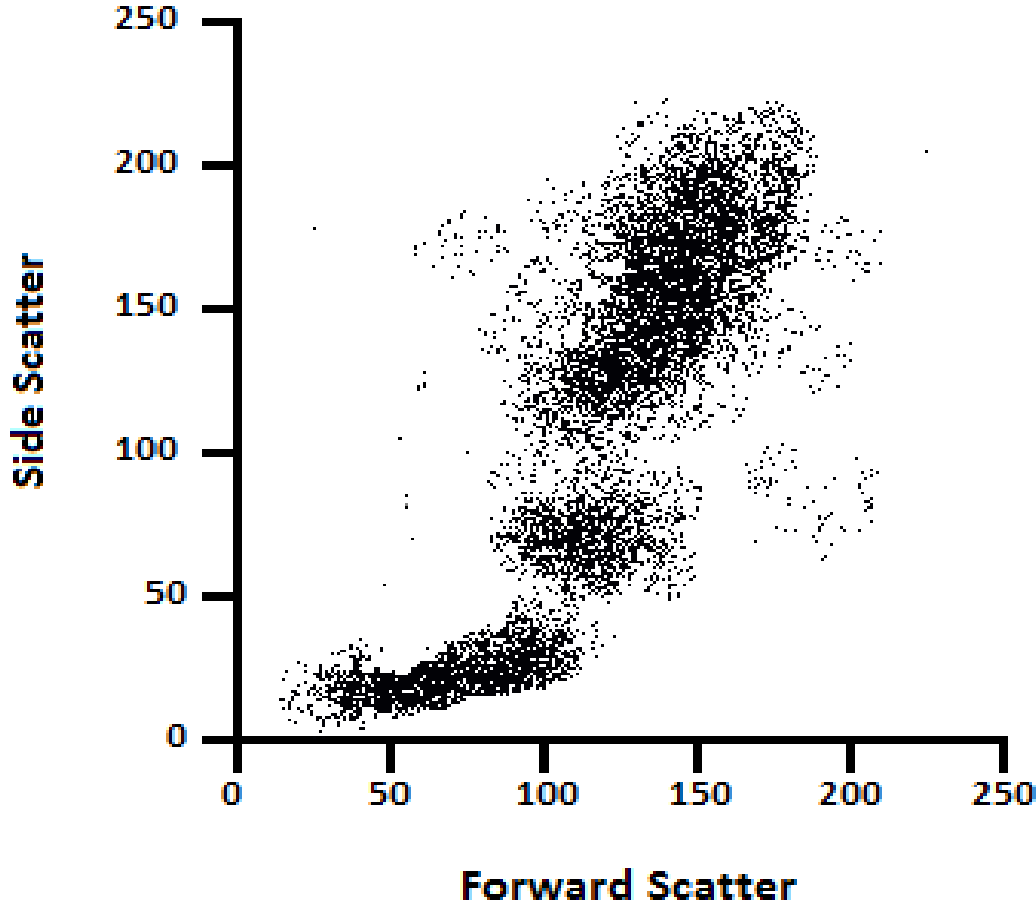
# Flow Cyometer (FC): sadece analiz

## FACS: analiz ve sort



1. Büyüklük ve granülarite
2. Flöresan ışım

# Dot Plot



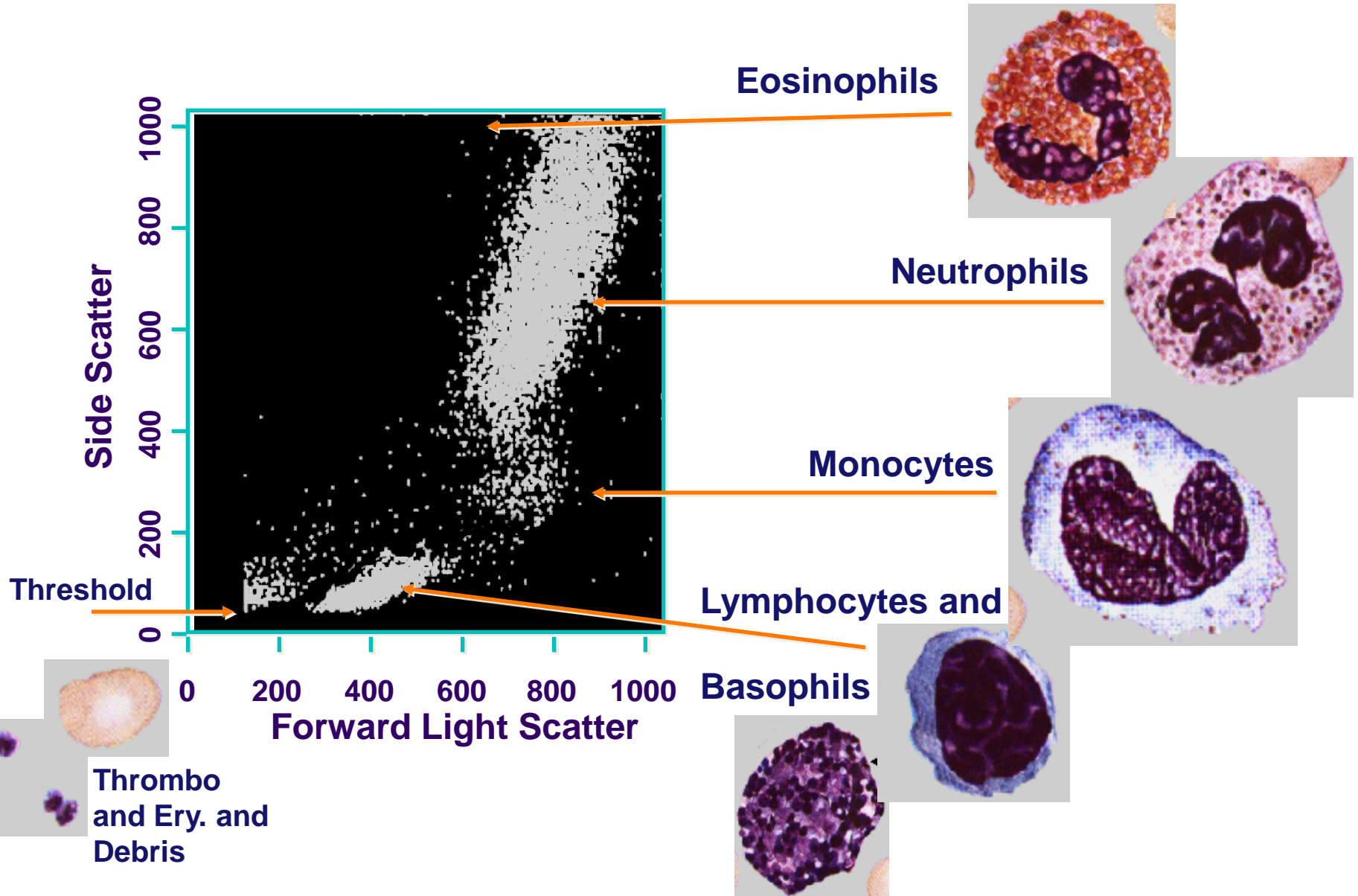
3 çeşit ışık dağılımı ile hücreler hakkında ilk bilgiyi ediniriz:

1. Düşük açılı ışık saçılımı forward scatter olarak isimlendirilir ve hücre çapı (büyüklüğü) ile ilişkilidir.
2. Orthogonal, 90° veya yana saçılım ise "side scatter" olarak adlandırılır ve granüleri belirler. Nötrofiller granüllü, lenfositler granülsüz.
3. Flöresan saçılımı (onlarca flöresan boya; dalga boylarına göre ayrıştırılır)

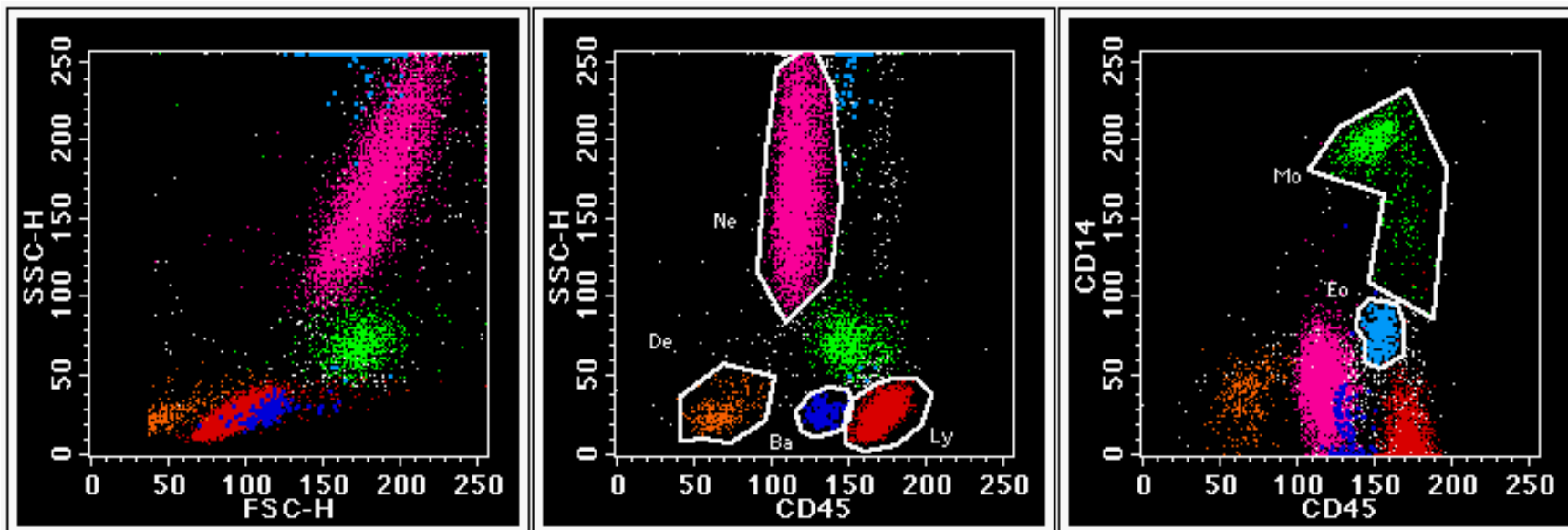
KAPI ALMA: GATING

# Dot Plot:

## Tam Kan: Büyüklük ve Granülarite



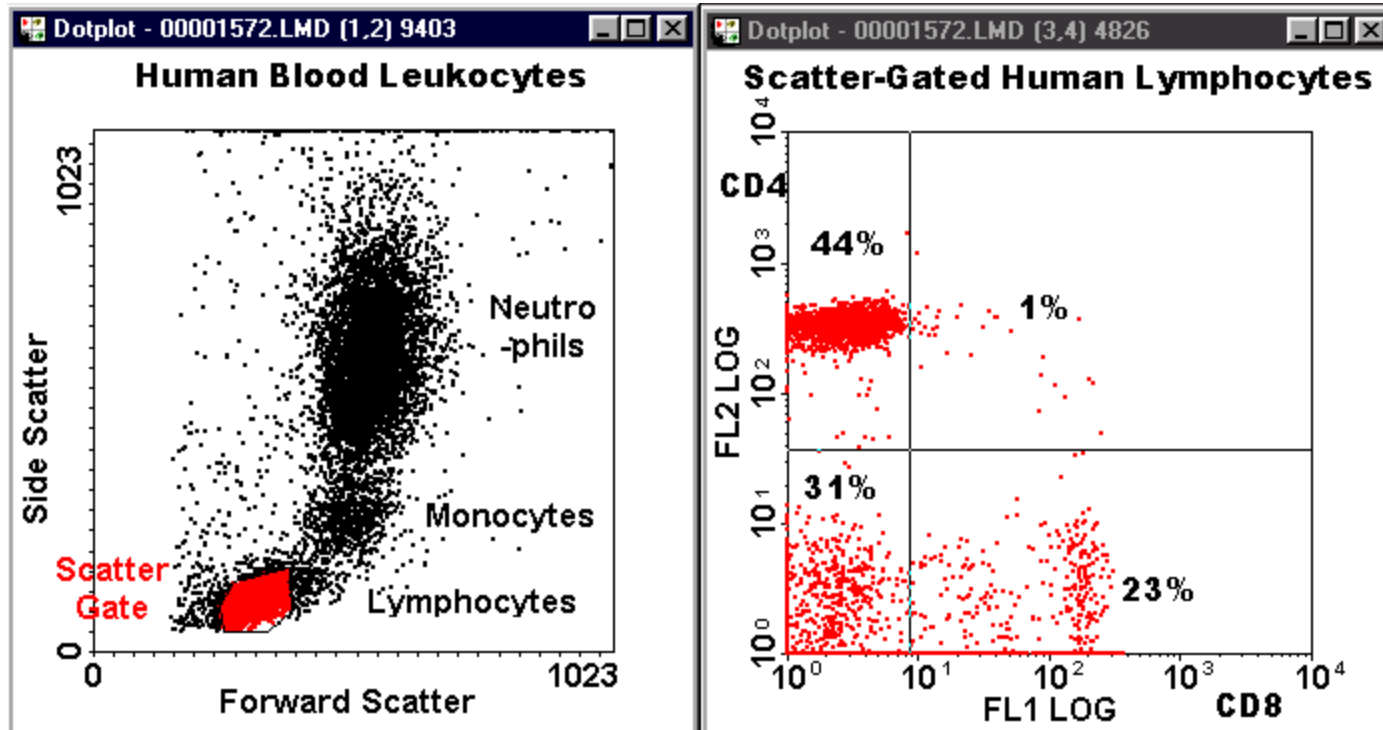
# CD45 kapılanması



Ba = Basophils,  
De = Debris,  
Eo = Eosinophils,  
Ly = Lymphocytes,  
Mo = Monocytes,  
Ne = Neutrophils

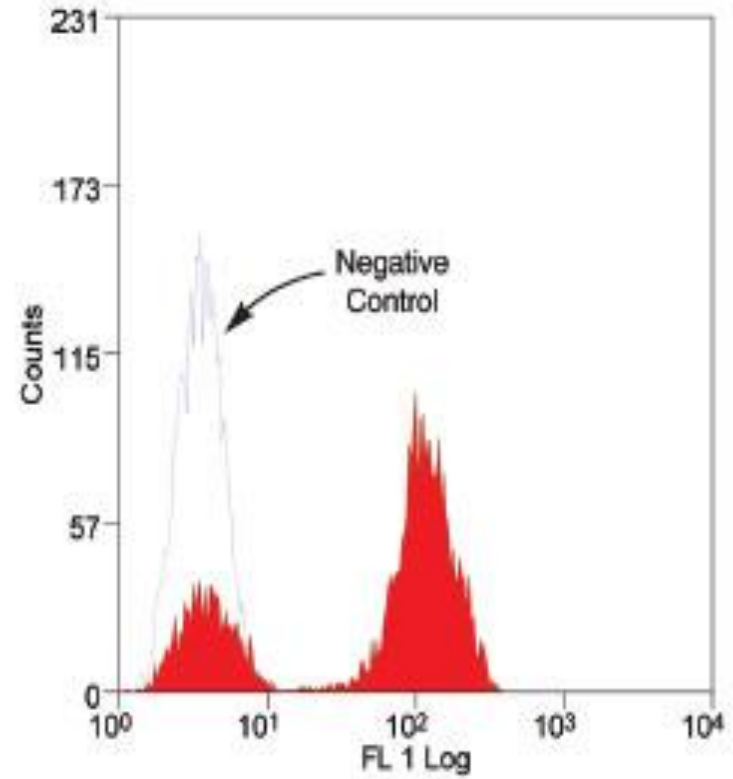
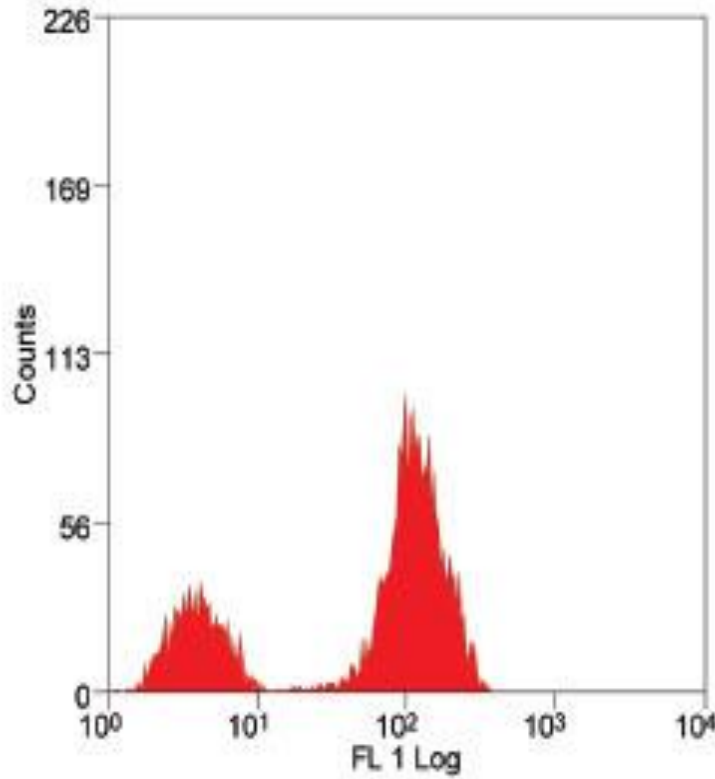


# Quadran Plot



iki parametre

# Histogram



Tek parametre

# İmmünolojide Yaygın Kullanım Alanları

- İmmün hücrelerdeki sayısal değişikliklerin tespiti:
  - Lösemi-lenfoma tanısı ve tiplendirmesi
  - İmmün yetmezliklerin tanısı
- İmmün hücrelerdeki fonksiyonların değerlendirilmesi ve değişikliklerin tespiti
  - İmmün yetmezliklerin tanısı
  - Oto immün hastalıkların tanısı
- Transplantasyonda hastaların vericilere karşı hücresel ve humoral yanıt açısından nakil öncesi ve sonrası değerlendirilmesi

# İmmün hücre fenotiplendirme

- T lenfositler
  - CD3, CD4, CD8, TCR,...
- B lenfositler
  - CD19, CD23,...
- NK hücreleri
  - CD56, CD16
- Monositler
  - CD14

# T Hücre Testleri

## ➤ Fenotipik testler

- Flöresan monoklonaller ile:
  - Aktivasyon belirteçleri ve adhezyon molekülleri
  - Tetramer

## ➤ Fonksiyonel testler

- Proliferasyon
  - Flöresan boyalar
- Hedef hücre öldürülmesi (sitotoksik T hücre)
  - Flöresan boyalar
- Hücre içi Sitokin üretimi
  - Flöresan anti-sitokin monoklonalleri ile

# Hangi amaçla sitokin ölçülür?

- Antijen spesifik T hücreleri (yardımcı T hücre ve veya sitotoksik T hücreleri)
- Fonksiyonel/efektör/bellek hücrelerin sayısal oranı (CD4 veya CD8)
- CD4+T Hücre alt grupları (Hücresel; Th1 veya humoral; Th2 veya İnflamatuvar; Th17)
- İsteddiğiniz fenotip ile kombine şekilde

# Hangi aplikasyonlar?

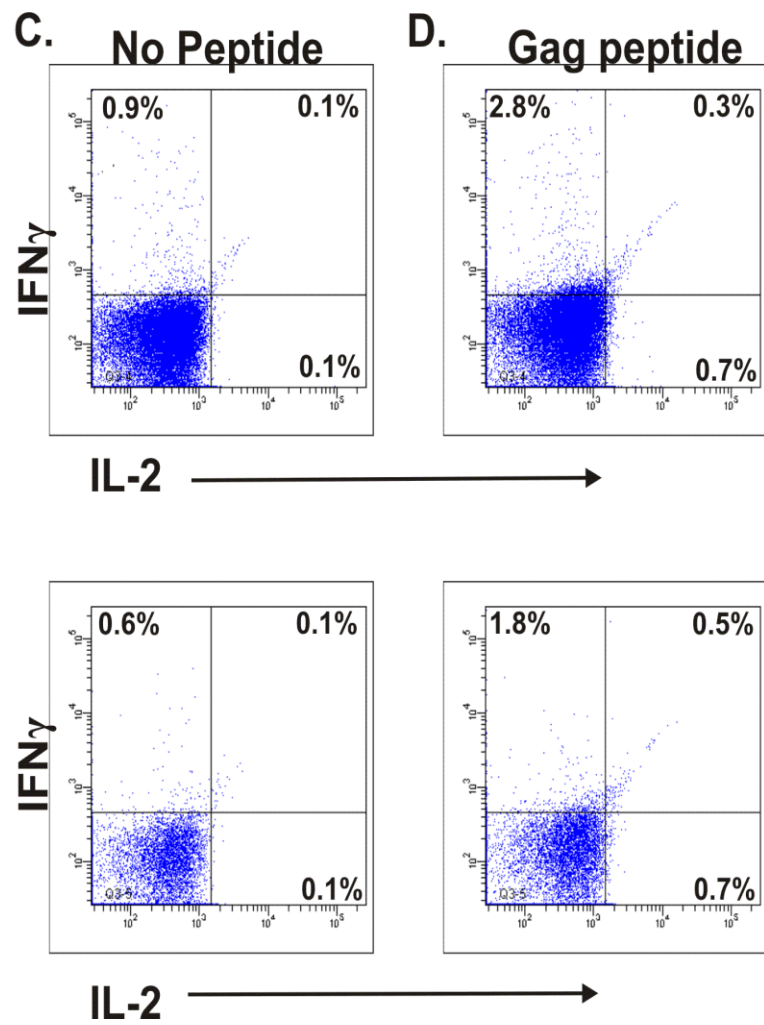
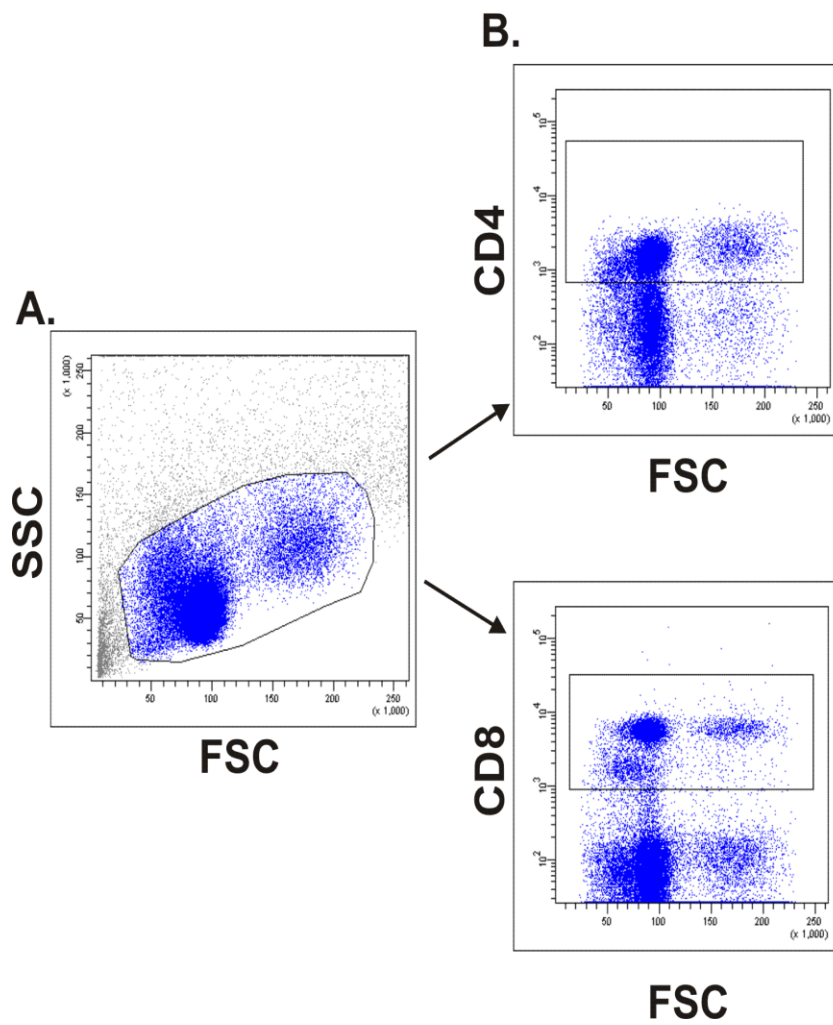
- Antijene spesifik immun yanıtın izlenmesi
  - Viral enfeksiyonlar
  - Kanser
  - Oto immün hastalıklar
  - Transplantasyon
  - Tüberküloz
- Genel immün tarama (immün yetmezlik tanısı)
  - Mitojen uyarımına karşı
- Aşıların etkinliği (immünojenite belirlenmesi)

**Table 1**

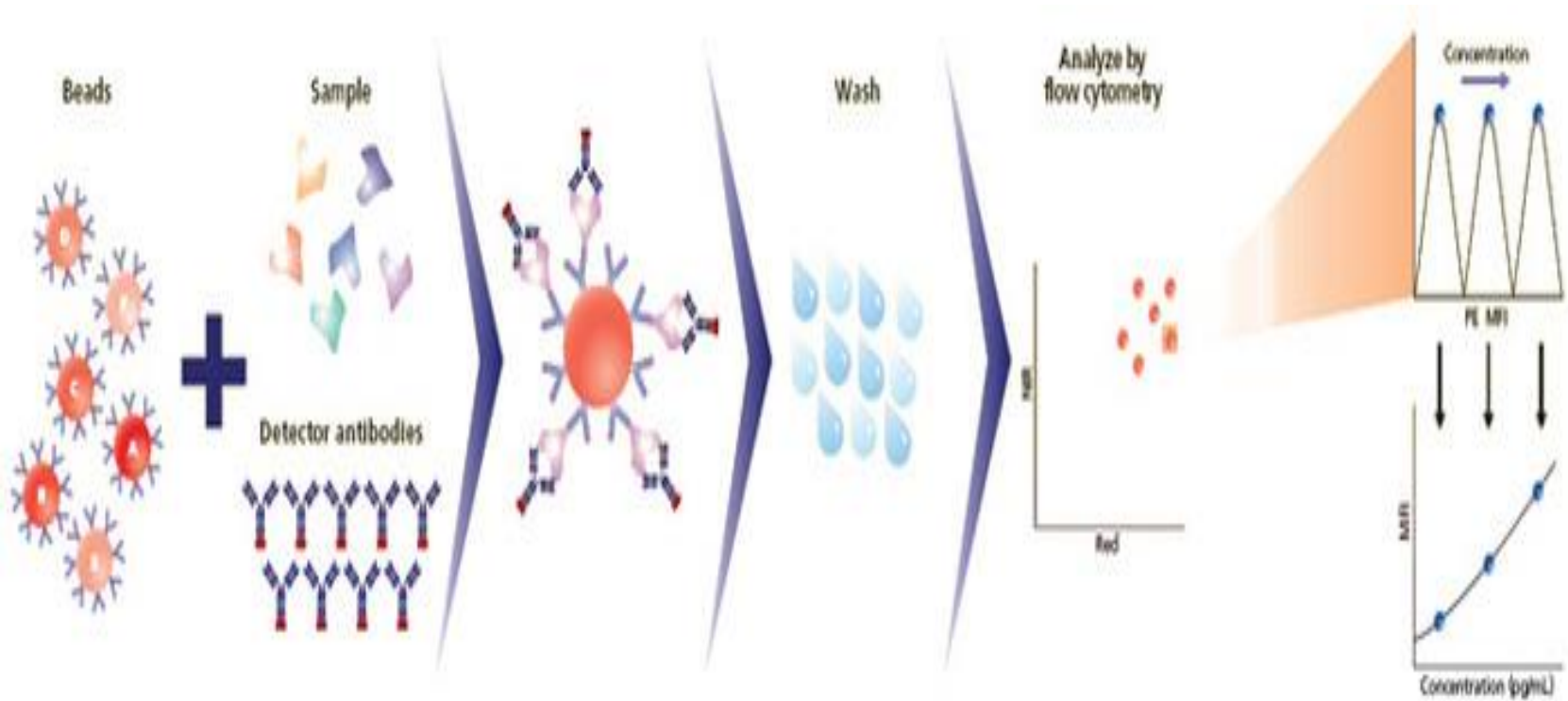
Recent studies using ICS to monitor cellular immunity.

Pathogen	Type of study	Cell source	Cytokines	Reference
HIV	Vaccine trial/determination of cellular immunity during disease	PBMC, whole blood	IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2	[50-55,44,66-71]
CMV	Determination of cellular immunity during disease	Whole blood	IFN $\gamma$	[72]
HSV-2	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2	[73,74]
Influenza virus	Vaccine trial/determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2	[56-58, 76-78]
Measles virus	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IL-10	[79]
Dengue virus	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$	[80]
HBV	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-21	[81,82]
HCV	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$ TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10, IL-4	[83,84]
HEV	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$ TNF $\alpha$ ,	[85]
JC virus	Determination of cellular immunity during disease	PBMC	IFN $\gamma$	[86]
West Nile virus	Vaccine trial	PBMC	IFN $\gamma$ TNF $\alpha$ , IL-2	[75]
Ebola virus	Vaccine trial	PBMC	IFN $\gamma$ IL-2	[87]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Vaccine trial/determination of cellular immunity during disease	PBMC; BAL; mononuclear cells; T cells; whole blood	IFN $\gamma$ IL-6, IL-17, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-10	[15,26,88-91]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Determination of cellular immunity during disease	Whole blood	IFN $\gamma$	[92]
<i>Plasmodium falciparum</i>	Vaccine trial/determination of cellular immunity during disease	Whole blood; PBMC	IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TNF $\alpha$ , IL-2	[61,62,93]
<i>Leishmania</i>	Vaccine trial	PBMC	IFN $\gamma$ TNF $\alpha$ , IL-2	[63]



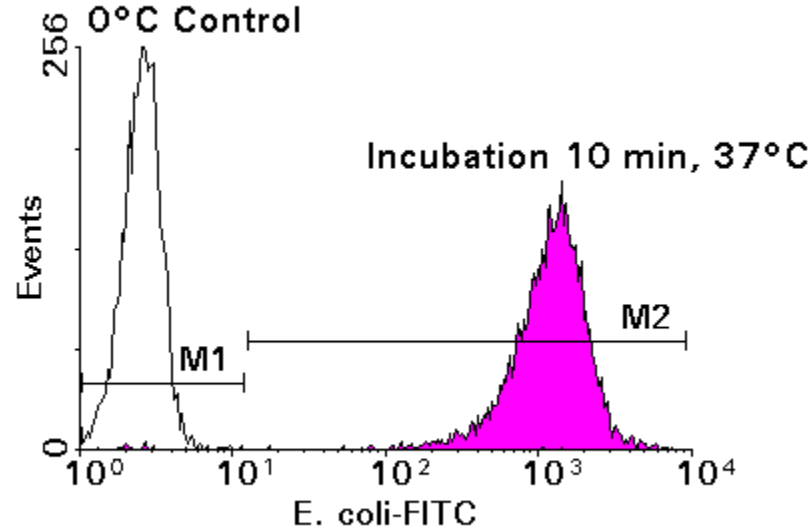


# Sitokin Array



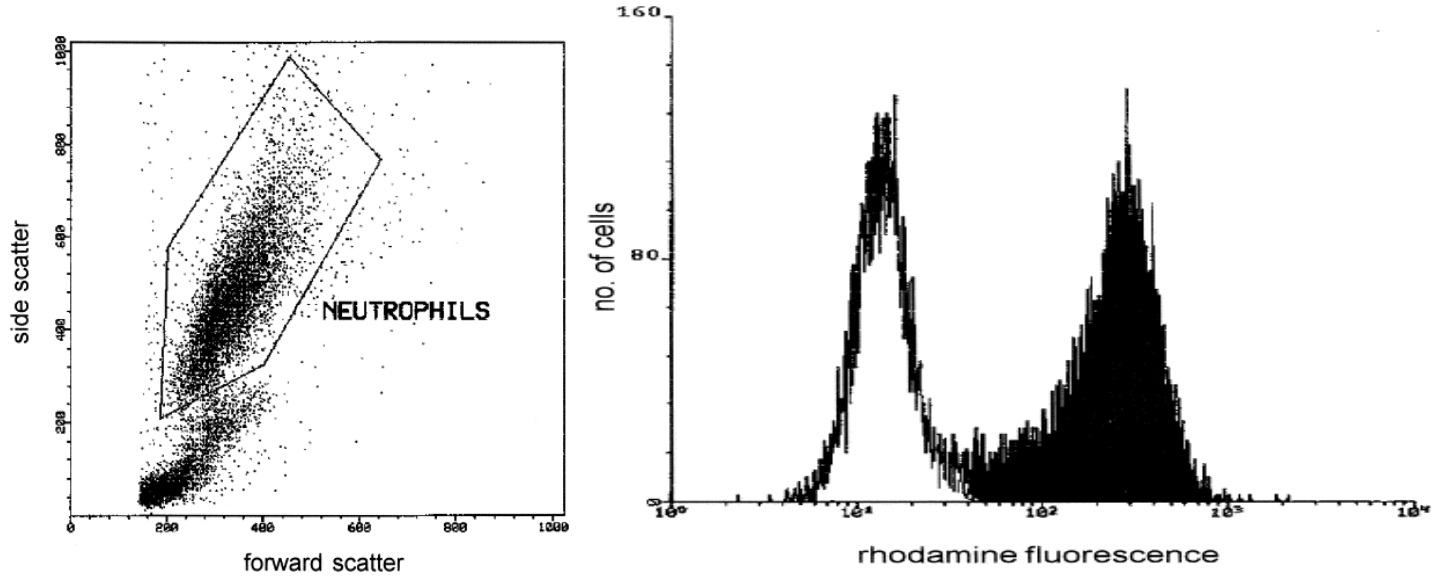
BD Cytometric Bead Array assay

# Fagositoz



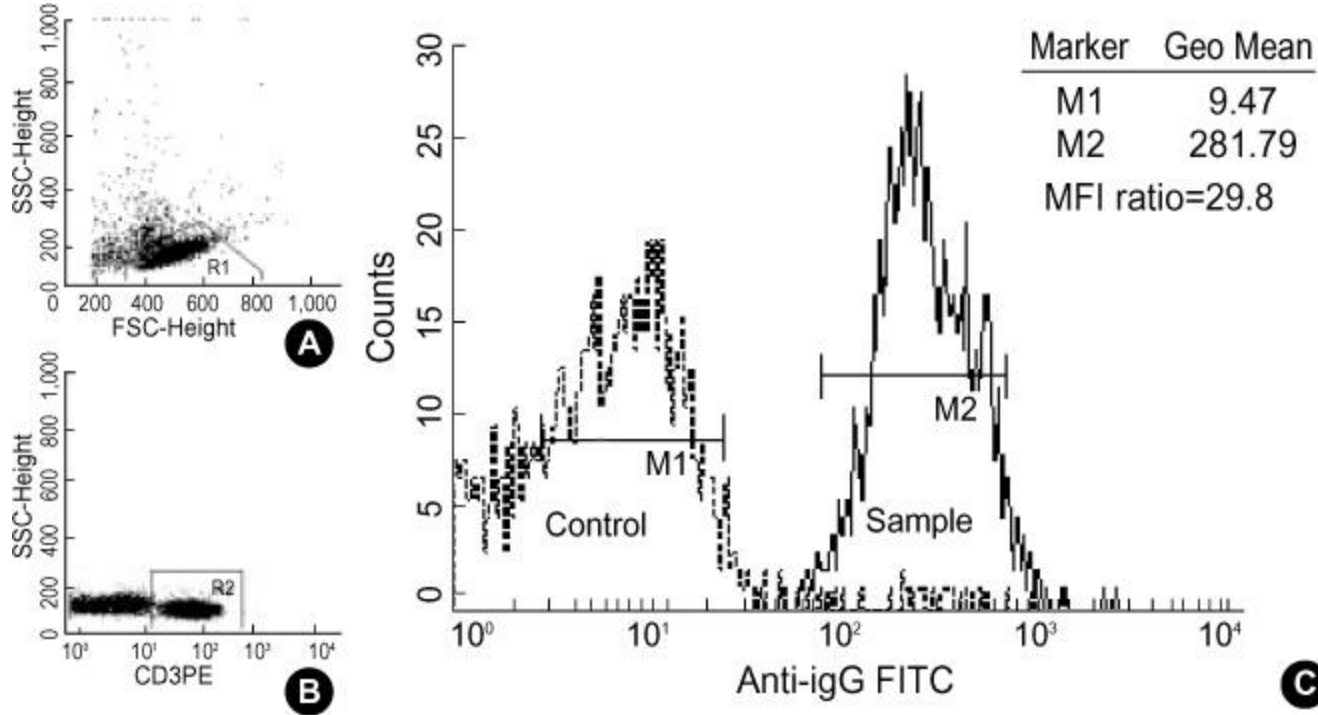
- Flöresan boyalı bakteriler PKMH lerle inkübe edilir
- Nötrofil ve monositlerin flöresan boyayı alması pozitif olarak değerlendirilir

# Oksidatif Patlama



- Hücre içine verilen di-hydrorhodamine 123 PMA ile uyarıldığında “**yeşil fluoressan**“ veren rhodamine 123’e dönüşür.
- uyarılan ve uyarılmayan nötrofillerde karşılaştırılır. Uyarılan nötrofillerde en az iki katı rhodamine oksidasyonu beklenir.

# Lenfosit Crossmatch



- Organ alıcı adaylarında vericilerin HLA antijenlerine karşı antikor olup olmadığının tespiti

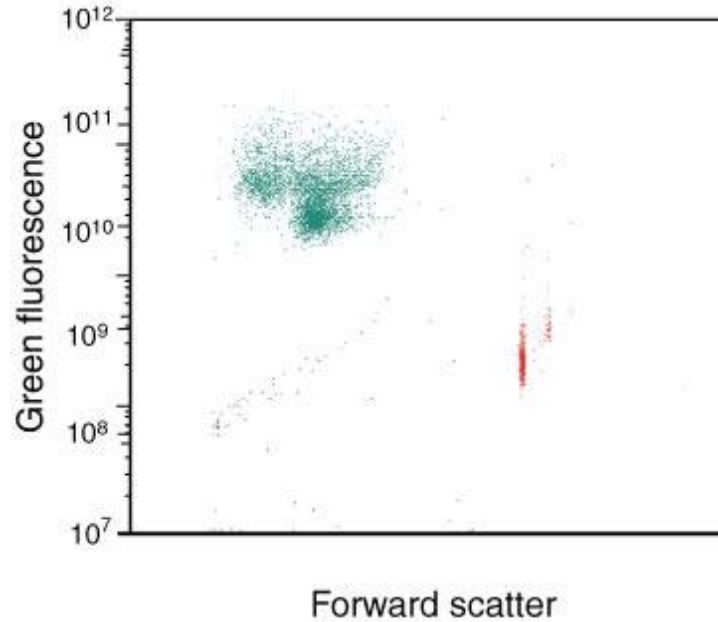
# Mikrobiyoloji-uygulama

- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının güncel organizasyonlarında özellikle
  - Sıvı ortamda (kan ve vücut sıvıları) canlı/ölü bakteri, maya ve mantar saptanmasında ve sayımında
  - antimikrobiyal duyarlılık testlerinde
  - idrar yolları enfeksiyonlarının taramasında

# Mikrobiyoloji-uygulama

- Mikroorganizmaların metabolik çalışmalarında
- DNA analizlerinde
- Protein ve peroksidaz üretimlerinin saptanmasında
- Hücre içi pH tayininde
- İkili florokrom boya vasıtası ile bakterilerin Gram-pozitif Gram-negatif ayırımında
- Mantar ve bakterilerin gen ekspresyonlarının incelenmesinde

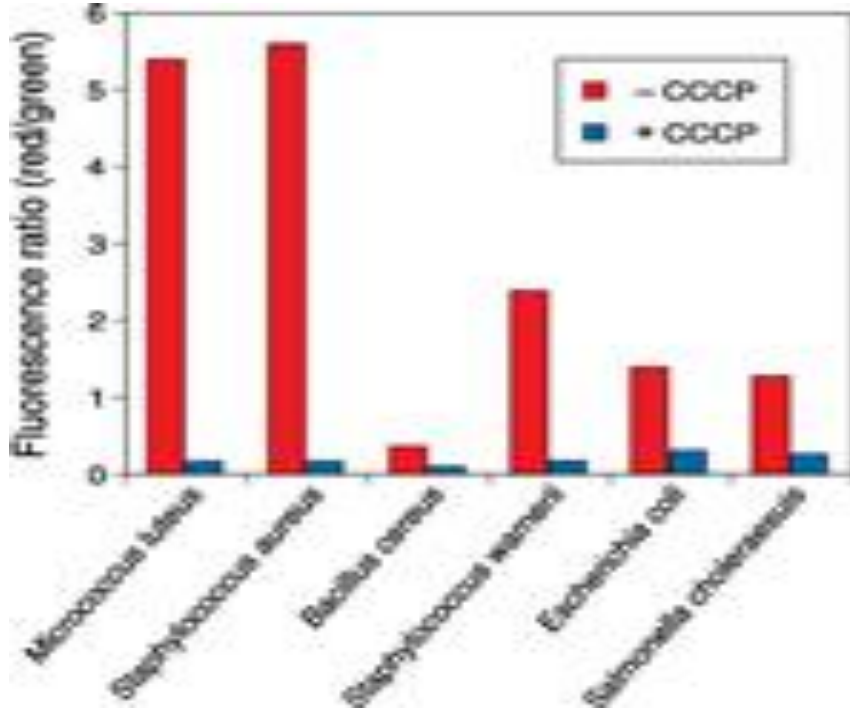
# Bakteri Sayımı



- SYTO<sup>®</sup> BC: yeşil flöresan boya
- 6.5 mikron büyüklüğünde bead (boncuk) standart
- Standart ile karşılaştırarak sayı hesaplama



# Viability analizi

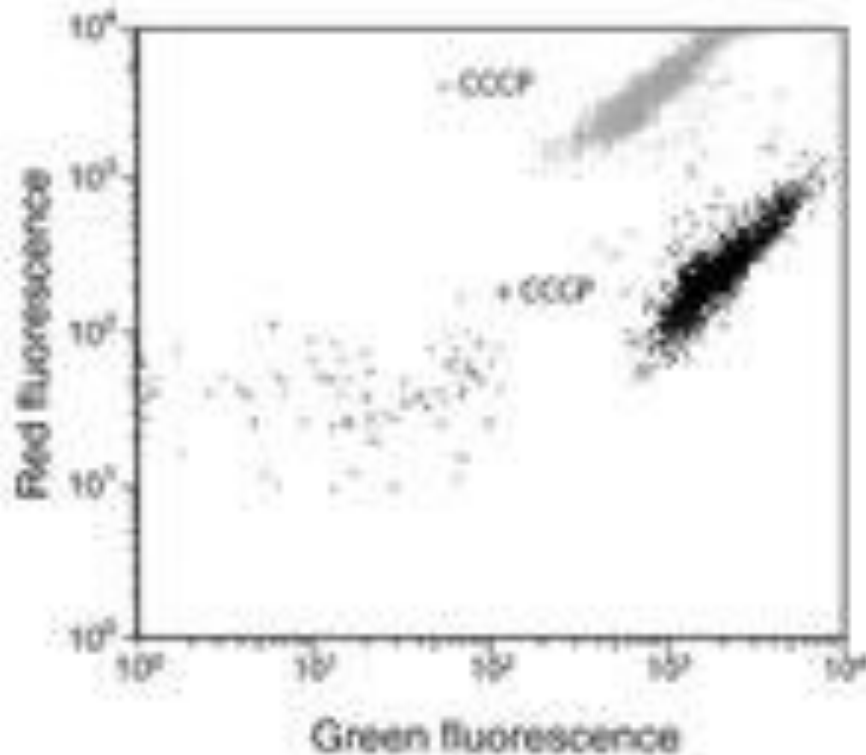


## The **BacLight™** Bacterial Membrane Potential Kit

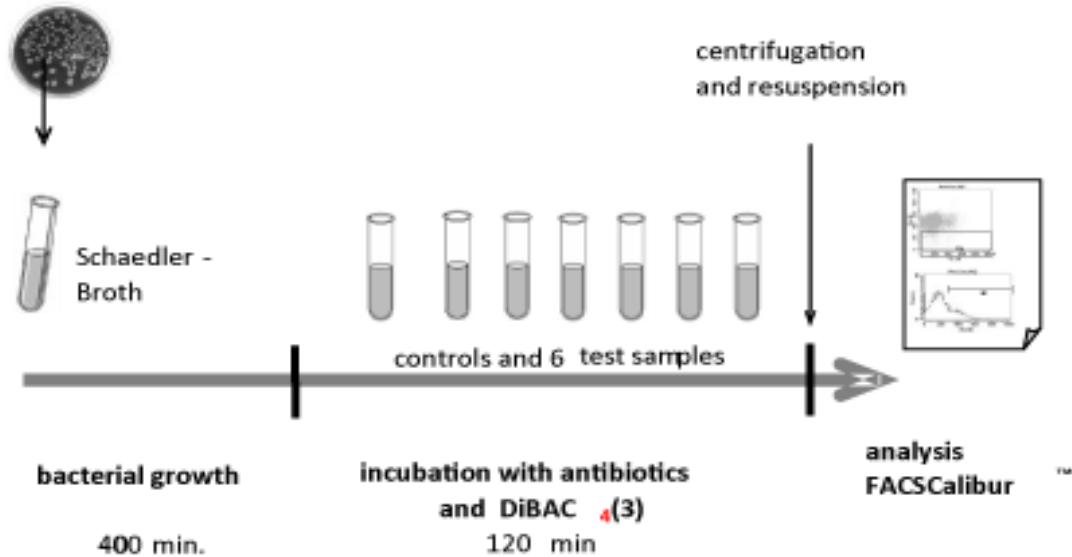
- Flöresan membran potansiyel indikatör boyası DiOC<sub>2</sub>(3)
- DiOC<sub>2</sub>(3) düşük yoğunluklarda önce bakterileri yeşile boyar
- bakterinin membran potansiyeli normal ise (canlı) boya kırmızıya döner ve bakterile kırmızı olur
- Eğer membran potansiyelini bozan bir ajan (CCCP gibi) verilirse bakteri yeşil olarak kalır kırmızıya dönemez

# *Staphylococcus aureus*

## Baclight kiti ile test edilmesi



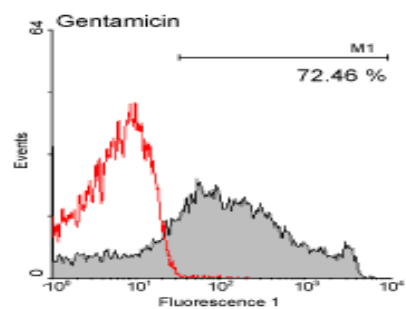
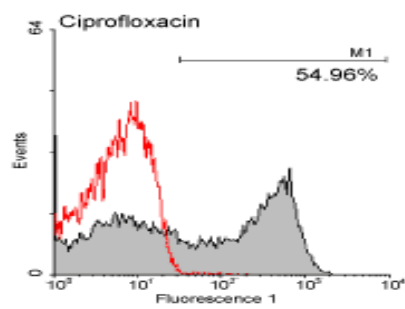
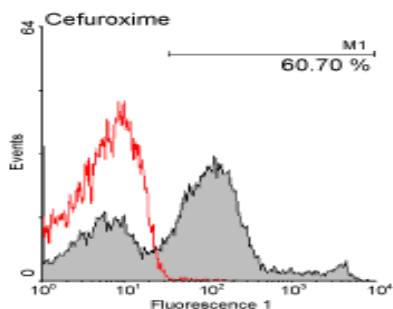
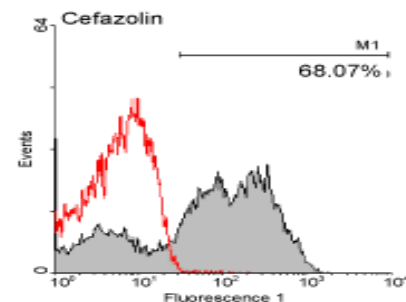
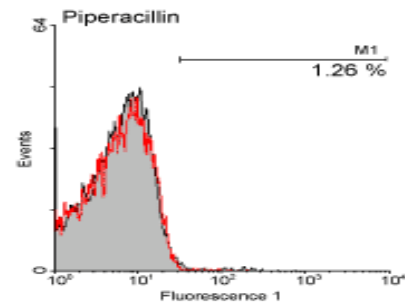
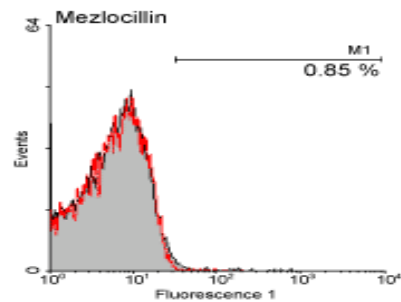
# Antibiyotik Duyarlılık Testi



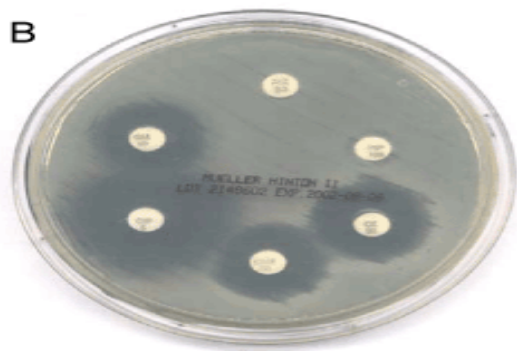
**Figure 1: Scheme of the flow cytometric susceptibility test.** Process of flow cytometric susceptibility test-assay. Inoculation from agar, cultivation in broth, incubation with 6 different antimicrobials and the membrane potential sensitive dye DiBAC<sub>4</sub>(3) and flow cytometric analysis.

Parameter	Measuring principle	Interpretation
FSC	scattered light	size
SSC	scattered light	granularity, internal complexity
Fl1 (green)	membrane potential	susceptibility

**A**



**B**



antibiotics	zone of inhibition	interpretation
mezlocillin	-	R
piperacillin	-	R
cefazolin	20 mm	S
cefuroxime	21 mm	S
ciprofloxacin	28 mm	S
gentamicin	19 mm	S

**C**

00000247      Not Specif      \*\*/\*\* \*\*\*/\*\* \*\*/\*\*/ \*\*/\*\*/ \*\*/\*\*/ FINAL

TESTED	PANEL TYPE	ORGANISM	BIOTYPE	WARD OF ISOLATION	NOTE (S)									
20/06/96	Neg BP Combo 10	E. coli	7711501-0	Not specified										
An	Pi	Mz	Cf	T/S	Cfz	P/T	A/S	Aug	Gm	To	Tsp	C ra	Cax	Caz
>16	>64	>64	<8	<2	<8	<16	<16	<8	<4	<4	<4	<4	<8	<8
R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
Cp	Of1	Te												
<1	<2	>8												
S	S	R												

# Virüsler

- Viral antijenlere karşı geliştirilmiş antikolar ile enfekte hücreleri tespit etmek mümkün (pp65 CMV ve CMV early antijenleri lökositlerde, HBsAg, HBcAg, HCV Ag, HSV-1, HSV-2, HHV-8)
- HIV ile enfekte bireylerde CD4/CD8 oranını belirlemekte rutin uygulama

# Protozoon Tanısı

➤ Plasmodium vivax a karşı geliştirilen bir antikor sayesinde tanı:

▪ *P. Vivax* ile infekte hücrelerin yüzdesi Flow sitometri ile belirlenmiş ve klasik yöntem olan Giemsa boyalı preparatlarla %94 korele olduğu gösterilmiş: *Malaria Journal* 2014, **13:55** doi:10.1186/1475-2875-13-55