

Manuscript Type: Review Article

DOI: 10.5152/kd.2018.44

Bakteriyoloji Alanında Kullanılan Modern Tanı Yöntemleri: Hızlı ve Etkili

Modern Diagnostic Methods Used in Bacteriology: Rapid and Effective

Yamaç Tekintaş¹, Mine Hoşgör-Limoncu²

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Tekintaş Y, Hoşgör-Limoncu M. [Modern diagnostic methods used in bacteriology: rapid and effective]. Klimik Derg. 2018; DOI: 10.5152/kd.2018.44

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Yamaç Tekintaş, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiğli, İzmir, Türkiye

E-posta/E-mail: yamactekintas@yahoo.com

(Geliş / Received: 7 Eylül / September 2018; Kabul / Accepted: 15 Kasım / November 2018)

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Tekintaş Y, Hoşgör-Limoncu M. [Modern diagnostic methods used in bacteriology: rapid and effective]. Klimik Derg. 2018; DOI: 10.5152/kd.2018.44

© Copyright 2018 by Turkish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Available on-line at www.klimikdergisi.org

Özet

Bakteriler yüzyıllardır insanoğluya etkileşim içinde yaşayan canlılardır. Bu etkileşim boyunca bazı bakteri türleri insan mikrobiyotası içinde kendilerine yer bulmuş, bazı yararlı ve önemli görevler üstlenmişlerdir. Bu yararlarına karşın, bakterilerin hastalık etkeni olanları, yüzyıllardır olduğu gibi, içinde yaşadığımız çağda da binlerce insanın ölmesine neden olmaktadır. Antibiyotiklerin keşfi ve kullanıma girmesi, bu mücadelede insanoğlunun başarı oranını artırmıştır. Bununla birlikte, doğru antibiyotiğin kısa süre içerisinde hastaya verilmesinin yaşamsal önemi vardır. Bunu sağlayabilmek için de patojenin hızlı bir şekilde tanısının yapılabilmesi gerekmektedir. Klasik tanı yöntemleri, bakterilerin kültürünün yapılmasına ve özelliklerinin belirlenmesine dayanan, zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren işlemleri içerir. Bu süreçler, ideale yakın olarak yürütülse bile, bu sırada geçirilen zaman, tedaviye başlanmasında gecikmeye, morbidite ve mortalitenin artmasına ve işgücü kaybına yol açabilir. Günümüzün modern bilim dünyası, çeşitli cihazların ve yaklaşımların geliştirilmesi sayesinde, mikroorganizmaların idantifikasyonlarının daha hızlı, duyarlı ve özgül bir biçimde yapılmasını sağlamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizi analizi gibi yöntemlerle mikroorganizmalar genotipik olarak tanımlanmaya başlamıştır. Bu tekniklerle tür tanımlamaları da daha net hale gelmiştir. Bu sayede klinisyenlerin tedaviyi daha kesin bilgilerle planlaması sağlanmıştır. Rutin klinik mikrobiyoloji işlemlerinin bir parçası olmaya başlayan matriksle desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi gibi yöntemler sayesinde idantifikasyonu çok uzun süren bakteriler bile saatler içerisinde tanımlanabilir hale gelmiştir. Bu derlemede, çevresel örneklerin, besinlerin ve farmasötik ürünlerin kontrolleri açısından da önemi büyük olan bu yöntemlerin özellikle klinik mikrobiyolojideki kullanımları üzerinde durulacaktır.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyoloji, MALDI-TOF, polimeraz zincir reaksiyonu, floresan *in situ* hibridizasyon, Raman spektroskopisi.

Abstract

Bacteria are organisms that have interacted with human beings for centuries. In this interaction, some species of bacteria have found their place in human microbiota, and have taken useful and important roles. Despite their usefulness, bacteria that cause disease in humans have been responsible for the loss of thousands of people for centuries and even in the age we live. After the discovery of antibiotics and their coming into use, our success rate has increased in this struggle. Besides, it is crucial that the correct antibiotic is given to the patient immediately. In order to achieve this, rapid identification of the pathogen is required. Classical diagnostic methods include time-consuming and labor-intensive procedures based on the cultivation and characterization of bacteria. Even though these processes are carried out close to the ideal, the time spent, leads to a delay in initiating therapy, increased morbidity, mortality and labor loss. Today's modern scientific world has enabled faster, more precise and specific identification of organisms through the development of different devices and approaches. By means of methods such as polymerase chain reaction and DNA sequence analysis, organisms can be identified genotypically. Moreover, with these techniques, species identification has become clearer. In this way, clinicians have been able to plan treatment with more accurate data. Methods such as matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, which are gradually becoming a part of routine clinical microbiology procedures, made bacteria identifiable within hours, even those which used to take a long time to identify. This review will emphasize the use of these methods in clinical microbiology in particular, although it is certain that many of them will also have a great importance for the control of environmental samples, food and pharmaceutical products.

Key Words: Bacteriology, MALDI-TOF, polymerase chain reaction, fluorescence *in situ* hybridization, Raman spectroscopy.

Giriş

Mikroorganizmalar yüzyıllardır varlığını bildiğimiz, insanoğluluyla etkileşim içerisinde yaşayan canlılardır. Bu süreç içerisinde insan mikrobiyotasını oluşturmuş, böylece yararlı hale gelmiş olan türler bulunmaktadır. Bu yararlı özellikleri taşıyan türler bulunmasına rağmen günümüz dünyasında farmasötik formların, gıdaların üretimi gibi sektörlerde, içme suyu ve üretimde kullanılan suyun güvenliği açısından kontaminasyon riski giderilmesi gereken önemli problemlerden biridir. Maalesef ki son yıllarda biyolojik terör ve biyolojik savaş gibi tehlikeli durumlar içerisinde yer aldıkları da bir gerçektir (1,2).

Farklı sektörlerdeki bütün bu durumlar haricinde, dünyadaki ölümlerin yaklaşık yüzde 30'unun infeksiyon kaynaklı olduğu düşünüldüğünde, infeksiyon etkeni olan bakterilerin tanımlanmasının klinik mikrobiyoloji ve sağlık politikaları açısından ne kadar kritik noktada olduğu ortaya çıkmaktadır (3).

Yıllardır kullanılan klasik tanı yöntemleri mikroorganizmanın kültürde üretilmesi temelli yöntemleri içermektedir. Bakterilere ait koloni tipi, hemoliz ve pigment özellikleri gibi, gözle takip edilebilen kriterlerin incelenmesi ve daha sonra çeşitli biyokimyasal testlerin yapılması esnasında çalışmacıların yanlış yorumlama ihtimalleri ya da kontaminasyon riski artmaktadır. Kültürü yapılamayan, uzun sürede üreyen ve polimikrobiyal infeksiyonlarda tanı aşamalarında sorun yaşanmakta olduğu için farklı, daha hızlı ve hassas tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu gerçektir (1,4). Daha hızlı tanımlama yapılabildiği takdirde özellikle sepsis gibi hızlıca antibiyotik tedavisine başlanması gereken durumlarda klinisyenlerin tedaviyi düzenlemeleri daha kolay hale gelecektir (5). Bu derleme kapsamında kültür ve biyokimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında görece farklı yaklaşımlar içeren, daha hızlı şekilde sonuca ulaşan ve klinik mikrobiyoloji üzerine yoğunlaşan bakteriyel tanı yöntemleri paylaşılacaktır.

1. Moleküler Yöntemler

Genetik materyalin keşfi ve görevlerinin saptanması sadece mikrobiyoloji alanında değil pek çok bilim dalında önemli getiriler sağlamıştır. Bakteriyel hayatın devamlılığını sağlayan türe ve/veya cinslere özgü genetik materyalin hedef alındığı yöntemler sayesinde daha spesifik tanı yöntemleri ve daha keskin tür ayrımları yapılabilmektedir.

a. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı yöntemler:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) pek çok farklı deoksiribonükleik asit (DNA) içeren bir örnek veya havuzdan istenilen bölgenin o gene spesifik primerler aracılığıyla enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan yöntemdir. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı Taq polimeraz enziminin keşfini takiben uzun yıllardan beri kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Elde edilen DNA parçacıkları agaroz jel elektroforezinde veya kullanılacak primerlerin florofor boya ile işaretlenmesi sayesinde görünür hale getirilerek, genin varlığı tespit edilebilmektedir. Bakteriyoloji açısından düşünüldüğünde herhangi bir bakteriye ait spesifik gen bölgeleri hedef alınarak tanı yapılmasına olanak sağlamaktadır. Tüm bakteri türlerine ait genetik olarak korunmuş bölgeleri hedef alan evrensel primerler sayesinde bir örnekte bakteri olup olmadığının tespitinin başarılı olarak yapılabildiği çalışmalar mevcuttur (6). Bir kaynaktan tür ayrımı yapılmaksızın bakteri varlığının tespiti kliniklerde tanı ve tedavi aşamaları açısından önem arz etmektedir (7).

PZR sayesinde genel korunmuş bölgeler dışında sadece türe, alttür ve serotiplere ait özelleşmiş gen bölgeleri bulunuyorsa, daha detaylı bir ayırım ve tanı yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu noktada *16S rRNA*, *23S rRNA*, *gyrA*, *gyrB*, *hsp65* gibi bakterilerde bulunan ve fonksiyonel olarak korunmuş bölgeler tercih edilmektedir (8,9). Bununla birlikte

Salmonella türleri için invazyondan sorumlu genlerin *invA*, *Pseudomonas* türleri için lipoprotein (*oprL*, *oprI*) genlerinin tanımlanması gibi türe özgül bölgelerden faydalanılan çalışmalar mevcuttur (10-12).

Yöntemin kendi içerisinde pek çok avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır. Sık yapılan ve hâkim olunan bir yöntem olması en önemli artısı olarak öne çıkmaktadır. Yöntemin standardizasyonu ve ilgili detaylarla alakalı pek çok başarılı çalışmaya ulaşılabilir olması deneylerin daha yüksek oranda tekrarlanabilmesine olanak sağlamaktadır. Basit uygulanması, nispeten kolay bir yöntem olması genel avantajları olarak sayılabilmektedir. Ancak tekniğin, birbirini takip eden birkaç basamağı içermesi, daha emek-yoğun bir yöntem haline gelmesine sebebiyet vermektedir. Bu aşamaların her biri için ayrı kimyasal, madde ve cihaza gerek duyulmasının yanında, mikroorganizmaya ait temel düzeyde de olsa genetik bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da yöntemin sadece genotipik olarak bilgi sahibi olunan bakteriler için uygulanabilir olmasına sebep olmaktadır (13).

PZR'nin bu anlamdaki başarılı uygulamaları esnasında gerçek zamanlı kantitatif PZR yönteminden faydalanılabileceği düşünülmüştür. Bu PZR yöntemi sadece bir genin varlığını değil, oluşacak transkript miktarını da tanımlamaya olanak sağlamaktadır (14). Bu sayede yöntemde kantitatif sonuç alınarak bakterinin miktar tayininin yapılabilmesinin önü açılmıştır. Chen ve arkadaşları (15) tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada *Neisseria gonorrhoeae* bakterisini uygun primerler tasarlanıp kullanılarak, hem identifikasyonunun hem de klinik örnekteki bakteri miktarının koloni oluşturan birim (CFU) olarak tespit edilebileceği ortaya konulmuştur.

b. DNA dizi analizi:

Genlerin çoğaltılabilir hale gelmesiyle mikrobiyoloji alanında DNA dizi analizi işlemlerinin de tanımlayıcı bir yöntem olarak kullanılması gündeme gelmiştir. Bilimsel

cihazların ve yöntemin son yıllarda oldukça gelişmesini takiben kültüre edilmiş bakterilerden, hatta direkt olarak klinik örneklerden tanımlama yoluna gidilmiştir (16). Bu teknoloji sayesinde alışılmamış ve daha önceki dönemde kültüre edilmeleri oldukça zor olan bakterilerin de tanımlanması sağlanmıştır (17).

Yöntemin kullanılması açısından en önemli faktör hedef olarak seçilecek gen bölgesidir. Bakteriler için genellikle 16s rRNA bu anlamda kullanılan hedef bölgedir. Yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki bu bölgenin kodladığı ürün 30S ribozomun yapısına katılır. Bakteriler ve arkealarda bulunan bu gen bölgesi gösterdiği korunmuşluk sayesinde hem primer tasarımı açısından uygun bir bölgedir, hem de filogenetik yakınlığı tanımlayabilecek değişken bölgeler içermesi hedef olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca gene ait baz uzunluğunun filogenetik anlamada analiz yapılmasına izin verecek uzunlukta olması önemli bir avantaj getirmektedir (18,19).

Bu yöntemin ilgi çeken en önemli özelliği 90 yıllarda kullanıma girmesiyle birlikte biyokimyasal ve kültürel yöntemlerle tanımlanması ve ayırımı yapılamayan bakterilere ait bilgi elde edilmesini sağlamasıdır. Elde edilen gen bilgileri sadece dizi analizi için değil pek çok farklı moleküler yöntemin dayanağını oluşturacak gen bankalarının oluşumunu sağlamıştır (19). Bununla beraber her yöntemde olduğu gibi bu yöntemin de sınırlayıcı özellikleri bulunmaktadır. *Bacillus cereus* ve *B. anthracis* gibi tamamen bir birinin aynı 16srna gen dizilerine sahip bakterilerde ayırımın yapılamaması bu noktalardan biridir. Bu ve benzer bakteriler için daha farklı hedefler seçilerek yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. *rpoB gyrA gyrB* gibi hedefler bu anlamda öne çıkan gen bölgeleridir (17).

c. Mikroarray:

Belli gen bölgelerine hibridize olacak oligonükleotid problemlerin kullanılıp, bilgisayar tarafından sinyal sistemiyle tanınması temeline sahip bir yöntemdir. Bakteriye tanı için

korunmuş ve spesifik olma özelliği taşıyan *gyrA*, *parE*, *16srRNA* gibi gen bölgelerini hedef alan problemler kullanılmaktadır. Hibridizasyonun gerçekleşmesi veya gerçekleşmemesi sonucunda verilen sinyaller bilgisayar tarafından okunup işlenerek, gen bölgelerinin pozitifliği tespit edilmektedir (20).

Yöntemin bir seferde çok farklı gen bölgesinin taranmasına izin vermesi avantaj olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sayede bir uygulamada pek çok farklı tür tanımlanabilir. Buchan ve arkadaşları (21)'nin yaptığı çalışmada pek çok farklı tür başarılı ve yüksek hassasiyetli olarak tanımlanmıştır. Ayrıca çeşitli direnç ve virulans genlerini tespit edecek tasarımların kullanılması sayesinde daha detaylı tanımlamalara gidilebilmektedir. 2015 yılında yapılmış bir başka çalışmada bakteri türleri yanında bazı temel direnç genlerinin tespiti yapılarak yöntemin sadece tanımlama amacıyla değil, tedaviyi yönlendirebilecek şekilde düzenlenebileceği de gösterilmiştir (22).

Modern dönemlerin ilgi çeken bir yöntemi olan mikroarray teknolojisi, birbirini izleyen farklı basamakları içermesi nedeniyle hata oranının artması ve gerekli materyal sayısının fazla olması nedeniyle yüksek maliyetli bir görünüm çizmektedir. Bu durum sık ve rutin uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca bir deney için dizi analizlerine bağımlı olarak çok sayıda oligonükleotid probun tasarlanması zorunda olunması yine yöntemin dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır (23).

d. Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH):

Mikroorganizmaların tanısı amacıyla rRNA hedefleyen modifiye edilmiş oligonükleotid problemlerin kullanılması yöntemidir. Türe özgü RNA dizilerine bağlanarak hibrid yapı oluşturacak kısa ve spesifik problemlerin tasarlanması yöntemin ilk koşuludur. Tasarlanan bu problemlerin normal DNA/RNA oligomerlerinden farklı modifikasyonlar içermesi sayesinde daha kuvvetli bir bağlanma elde edilmektedir (24). Floresan boyalarla işaretlenen bu diziler kendi

üzerine katlanma yapmayacak veya farklı gen bölgelerine bağlanmayacak şekilde tasarlandığında, istenilen RNA bölgesine hibridize olmasını takiben ışığa yapışmak suretiyle floresan mikroskopunda boyaya özgül renklerin seçilmesiyle tanılama yoluna gidilmektedir (25).

Yöntemin özgüllüğü ve uygulanabilirliğiyle ilgili pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. Hassas olarak tanı yapabilmesi, birden fazla prob kullanarak aynı anda farklı bakteriler için tanı yapılabilmesi gibi getirileri olan bu yöntemde, en önemli avantajlardan biri yöntemin kısa sürede sonuç vermesi ve herhangi bir izolasyon işlemine gerek duyulmaksızın klinik kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) vb. gibi örneklerden direkt olarak tanı yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Yöntemin bir diğer artısı herhangi bir amplifikasyon basamağı içermediği için kontaminasyonun oluşturacağı risklerin daha az oluşudur (26). Özellikle kültüre edilmesi uzun veya zorlu olan *Mycobacterium* ve *Legionella* gibi türlerde bile başarılı sonuçlar vermesi ve farklı bakteriler için standardize edilerek ticari kitlere dönüşmüş olması klinik mikrobiyoloji açısından önemli avantajlar getirmektedir (25,27,28).

Tekniğin başarılı şekilde uygulanabilmesi için hedef alınacak bakteriye ait gen bilgisinin net bir şekilde bilinmesi gerekmektedir. Ayrıca dizilerin 3 boyutlu yapılarının moleküller arasındaki etkileşimi değiştireceği için tasarım işleminde göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Floresan işaretleme için seçilecek boya konusunda hassas davranılmalı ve bazı bakterilerin doğal floresan görüntüleriyle karışmayacak şekilde belirlenmesi gerekliliği yöntemin uygulamasındaki zorluklar olarak sayılmaktadır (24,29).

2. Spektroskopik Yöntemler

Bir örnek veya materyaldeki atom, iyon veya moleküllerin, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan ışıkların ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Bu değişimleri farklı yaklaşımlarla tespit edebilen cihazlar sayesinde yeni tanı yöntemleri ortaya çıkmıştır.

a. “Fourier transform infrared (IR) spectroscopy” (FTIR):

Genel tanı yöntemlerinden oldukça farklı bir yaklaşıma sahip ve umut vadeden bu yöntemde, bakteriye ait tüm kimyasal kompozisyonun görüntülenmesi sayesinde tanılama yapılmaktadır (30). Görüntüleme sonucu bakteriye ait infrared spektrumları elde edilir. Böylece bir nevi parmak izi oluşturularak bakteriye özgül paternler oluşturulmaktadır. Bakterilerin tanımlanması ve ayırt edilebilmesi için uyarlanmış bu yöntem örnekler hücre duvarının veya bakterinin bütünlüğünü bozacak herhangi bir işlem yapılmadığı için ufak miktarlarda örneklerden bile tanılama yapılabilmesi mümkündür (31). Ayrıca uygulanmasının kolay olması ve herhangi bir kimyasala ihtiyaç duyulmaması yöntemin getirdiği artılar olarak göze çarpmaktadır. Yöntemle ilgili başarılı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bosch ve arkadaşları (32)’nin yaptıkları çalışmada az miktarlarda örnekle kistik fibrozlu hastaların solunum sisteminde sık görülen bakterilerin tanımlanması başarıyla yapılabilmektedir. Özellikle identifikasyonu görece zor olan *Burkholderia* türlerinin en sık görülen 4 türünün, başarılı şekilde ayırt edilerek ortaya konulması dikkat çekicidir. 2018 yılında yapılan bir başka çalışmada ortaya konulan sonuçlar bu yöntemin *Salmonella* tanısında kullanılabileceğini göstermektedir. İki bin altı yüz civarı serotipi bulunan bu türün üyelerinde genel serotip tanısı için aglütinasyona dayalı pahalı ve fazla sayıda antijenik serum gerektiren bir yöntemin yerine, alternatif olabileceği gözler önüne koyulmuştur (33).

Bütün bu pozitif sonuçlara rağmen yöntemin belli kısıtlılıkları bulunmaktadır. Elde edilen sonuçların yorumlanabilmesi için ilgili bilgilerin girilmesi gereken bir kütüphaneye ihtiyaç duyulması, ayrıca elde edilen değerlerin çeşitli algoritmalar aracılığıyla analiz edilmesi yöntemin uygulama aşamalarını olmasa da, değerlendirme aşamalarını daha kompleks hale getirmektedir (31).

b. Raman spektroskopisi:

Raman etkisi moleküller tarafından saçılan az miktardaki ışının dalga boyunun gelen demetin dalga boyundan farklı olması olarak tanımlanmaktadır. Bu dalga boyu kaymalarının moleküldeki titreşimler sayesinde değişiklik gösterdiği yani molekülün kimyasal yapısıyla bağlantılı olduğu 1928 yılında keşfedilmiş ve özellikle adli vakaların çözümü için uygun bir yöntem olduğu düşünülmüştür (34). Bununla birlikte yöntemin mikroskopiyle birleştirilmesi mikrobiyoloji açısından hızla dikkat çeker bir yöntem olmasını sağlamıştır (35). Bu sayede yöntemin kültürasyondan bağımsız hale gelmesi sağlanmış, böylece üretme basamağı ortadan kaldırılmıştır. Bu sayede daha hızlı hale gelmesinin yanında, kültüre edilemeyen bakterilerin *in situ* tespitleri yapılabilir ve tek bir bakteri hücresinden dahi tanılama yapabilecek boyuta ulaşmıştır (36).

Tang ve arkadaşları (37) tarafından yılında yapılan çalışmada Gram-negatif bakterilerin ve *Mycobacterium* türlerinin bu yöntemle identifikasyonu incelenmiş ve yöntemin başarılı sonuçlar verdiği ortaya konmuştur. Teknikle ilgili bir başka çalışmada Raman prensiplerinin mikrobiyoloji açısından kullanımı esnasında, sadece bakterinin varlığının tespiti değil, türlerin ayrımının yapılabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır. *Staphylococcus* üyelerini tür ayrımı açısından yöntemi değerlendiren bu çalışma, türe özgül ışımaya piklerini tespit ederek farklı türleri birbirinden başarıyla ayırt ederek tanımlayabilmiştir. Bununla beraber modern yöntemlerin bir kısmında gözüktüğü üzere farklı değerlendirme algoritmalarının önemini de ortaya koymuş ve doğru algoritmayla tanımlama yapılırsa %99'a varan oranlarda başarı elde edilebileceği gösterilmiştir. Moleküllerin ayrımı konusunda oldukça hassas olan bu yöntem sayesinde, planktonik ve biyofilm içerisindeki hücreler arasındaki fark ortaya konulabilmektedir. Dolayısıyla bu prensip doğrultusunda yapılan çalışmaların bakterilerin doğada bulunuş şekillerinden bağımsız olarak tanılama yapabileceği tespit edilmiştir (38).

c. Matriksle desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS):

Son yıllarda identifikasyon amacıyla özellikle klinik mikrobiyoloji alanında kullanılan spektrometrik bir yöntemdir. Temel olarak analiz edilecek bakteri kolonilerinin kısa dalga boylu lazer aracılığıyla iyonize edilip hızlandırılarak elektrik alanından geçirilmesi olarak açıklanabilir. Ortaya çıkan spektral profilin bilgisayar yardımıyla analizi sayesinde bakteri identifikasyonuna gidilmektedir (39). Yüksek derece hassaslık ve verimle çalışan bu yöntemin başarısı pek çok çalışmayla ortaya konulmuştur. Foster (40)'ın yaptığı çalışmada pek çok farklı aileye mensup Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin tespiti başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sık izole edilen türler başta olmak üzere 250 civarında bakterinin kullanıldığı çalışmada doğru saptama oranlarının yüzde 90 üzerine çıktığı görülmektedir. Ülkemizde buna benzer çalışmalar yapılmış ve yöntemin başarısı ortaya konulmuştur (41).

Yöntem sırasında elde edilecek spektral piklerde biyolojik faktörlere bağlı olarak değişiklikler gözlemlenebileceği bilinmektedir. Kullanılan kültürün yaşı, kimyasal çevreyle olan ilişkisi ve adaptasyonunun, elde edilecek profillerde değişikliklere neden olabileceği bilinmektedir (1). Bununla birlikte yöntem ribozomal proteinler üzerinden yürüdüğü için yüksek derecede korunmuş bölgeler içeren *Escherichia coli* ve *Shigella* türlerinin ayrımı konusunda sorunlar yaşanabilmektedir (42). Ayrıca hücre duvarının daha kalın olması nedeniyle Gram pozitif bakteriler için daha karmaşık izolasyon yöntemine ihtiyaç duyulması yöntemin kısıtlılıkları olarak ortaya çıkmaktadır (40).

3. Geleceğe Yönelik Beklentiler ve Olası Sorunlar

Günümüz modern teknolojisi pek çok farklı yaklaşımı ve yöntemi sağlık bilimlerinin hizmetine sunmaktadır. Dünyanın her yerinden farklı araştırmacıların değişik bakış açılarıyla

daha yeni ve hızlı tanı yöntemlerinin keşfi için çaba göstermesi sayesinde daha kısa sürede ve daha yüksek doğrulukla çalışan yeni metotların keşfedilmesi geleceğe yönelik beklentiler arasındadır. Ancak yöntemlerin gerektirdiği cihaz ve maddelere ulaşımın zorluğu kadar, nitelikli insan yetersizliğinin bu metotların kullanımı kısıtlayacak faktörlerden biri olarak öne çıkabileceği düşünülmektedir. Bu süreçte cihazların ve yöntemlerin kullanımının mümkünse daha basit hale getirilmesi, dünyanın çeşitli bölgelerinde sağlık çalışanlarının sayısal olarak yetmediği alanlarda da kullanılabilmesini sağlayacaktır. Bu baş döndüren teknolojiyi geliştiren ülkeler arasında yer alabilmemiz, bizler açısından kliniklerde kullanımı kolaylaştırarak ve doğru tedavinin daha hızlı planlanabilmesi açısından önemli bir kazanım olacaktır. Ülkemizin tıbbi cihaz, kit ve enzim gibi pek çok farklı gereksinim için dışa bağımlılığını azaltabilmesi hem bu anlamda temel bir basamak olacağını hem de yeni yöntemlerin ortaya çıkışları için ilham kaynağı olabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Pennanec X, Dufour A, Haras D, Réhel K. A quick and easy method to identify bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(3): 384-92.
2. Bartie C, Venter SN, Nel LH. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Res.* 2003; 37(6): 1362-70.
3. Burckhardt I, Zimmermann S. Susceptibility testing of bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1-11.
4. Boardman AK, Wong WS, Premasiri WR, *et al.* Rapid detection of bacteria from blood with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chem.* 2017; 88(16): 8026-35.

5. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 2017; 138: 20-9.
6. Barghouthi SA. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian J Microbiol*. 2011; 51(4): 430-44.
7. Adzitey F, Huda N, Ali GRR. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*. 2013; 3(2): 97-107.
8. Rahimi E, Alian F, Alian F. Prevalence and characteristic of *Campylobacter* species isolated from raw duck and goose meat in Iran. *IPCBE*. 2011; 9: 171-5.
9. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(9): 4312-7.
10. Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. Inv a gene specific pcr for detection of salmonella from broilers. *Vet World*. 2011; 4(12): 562-4.
11. Kasturi KN, Drgon T. Real-Time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2017; 83(14): 1-12.
12. Jami Al-ahmadi G, Zahmatkesh Roodsari R. Fast and specific detection of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species by PCR. *Ann Burns Fire Disasters*. 2016; 29(4): 264-7.
13. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013; 133(3): 1-9.
14. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, De Souza PRE, De Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in

- medical diagnostic fields: a review. *Brazilian J Microbiol.* 2009; 40(1): 1-11.
15. Chen L, Shin DJ, Zheng S, Melendez JH, Gaydos C, Wang TH. Direct-qPCR Assay for coupled identification and antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *ACS Infect Dis.* 2018; 4(9): 1377-84.
 16. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): 840-62.
 17. Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(8): 1108-14.
 18. Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Böttger EC, Altwegg M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J Clin Microbiol.* 2003; 41(9): 4134-40.
 19. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9): 2761-4.
 20. Järvinen A-K, Laakso S, Piiparinen P, *et al.* Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. *BMC Microbiol.* 2009; 9(1): 161.
 21. Buchan BW, Ginocchio CC, Manii R, *et al.* Multiplex identification of gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood culture broths: evaluation of an automated microarray-based nucleic acid test. *PloS Med.* 2013; 10(7): e1001478.
 22. Ledebøer NA, Lopansri BK, Dhiman N, *et al.* Identification of Gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the verigene Gram-negative blood culture multiplex microarray-based molecular assay. *J*

Clin Microbiol. 2015; 53(8): 2460-72.

23. Jaksik R, Iwanaszko M, Rzeszowska-Wolny J, Kimmel M. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct.* 2015; 10: 46.
24. Tekintaş Y, Demir-Dora D, Hoşgör-Limoncu M. Antisens oligonükleotitler ve antibakteriyel kullanımları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2016; 46(2): 51-7.
25. Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, Jardim T, Keevil CW, Vieira MJ. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int J Mol Sci.* 2008; 9(10): 1944-60.
26. Poppert S, Essig A, Stoehr B, *et al.* Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7): 3390-7.
27. Lefmann M, Schweickert B, Buchholz P, *et al.* Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(10): 3760-7.
28. Wilks SA, Keevil CW. Targeting species-specific low-affinity 16S rRNA binding sites by using peptide nucleic acids for detection of legionellae in biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(8): 5453-62.
29. Poppert S, Haas M, Yildiz T, *et al.* Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(6): 2133-6.
30. Lasch P, Stämmeler M, Zhang M, Baranska M, Bosch A, Majzner K. FT-IR hyperspectral imaging and artificial neural network analysis for identification of pathogenic bacteria. *Anal Chem.* 2018; 90(15): 8896-904.
31. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(16):

7111-20.

32. Bosch A, Miñán A, Vescina C, *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8): 2535-46.
33. Campos J, Sousa C, Mourão J, Lopes J, Antunes P, Peixe L. Discrimination of non-typhoid Salmonella serogroups and serotypes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: a comprehensive analysis. *Int J Food Microbiol.* 2018; 285: 34-41.
34. Bumrah GS, Sharma RM. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egypt J Forensic Sci.* 2016; 6(3): 209-15.
35. Ashton L, Lau K, Winder CL, Goodacre R. Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification. *Future Microbiol.* 2011; 6(9): 991-7.
36. Lorenz B, Wichmann C, Stöckel S, Rösch P, Popp J. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria. *Trends Microbiol.* 2017; 25(5): 413-24.
37. Tang M, McEwen GD, Wu Y, Miller CD, Zhou A. Characterization and analysis of mycobacteria and Gram-negative bacteria and co-culture mixtures by Raman microspectroscopy, FTIR, and atomic force microscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(5): 1577-91.
38. Kusić D, Kampe B, Ramoji A, Neugebauer U, Rösch P, Popp J. Raman spectroscopic differentiation of planktonic bacteria and biofilms. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(22): 6803-13.
39. Buszewski B, Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J AOAC Int.* 2017; 100(6): 1607-

- 23.
40. Foster AG. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek ms matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(11): 3717-9.
41. Altun O, Botero-Kleiven S, Carlsson S, Ullberg M, Özenci V. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J Med Microbiol.* 2015; 64(11): 1346–52.
42. Martiny D, Busson L, Wybo I, Ait El Haj R, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4): 1313-25.