

# Bakteriyoloji Alanında Kullanılan Modern Tanı Yöntemleri: Hızlı ve Etkili

## *Modern Diagnostic Methods Used in Bacteriology: Rapid and Effective*

Yamaç Tekintaş<sup>1</sup>, Mine Hoşgör-Limoncu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### Özet

Bakteriler yüzyıllardır insanoğluluyla 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 antibiyotikğin 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 identifikasyonlarının 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 matrisle desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi gibi yöntemler sayesinde identifikasyonu 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. *Klinik Dergisi 2018; 31(3): 176-80.*

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

### 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. *Klinik Dergisi 2018; 31(3): 176-80.*

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

**Cite this article as:** Tekintaş Y, Hoşgör-Limoncu M. [Modern diagnostic methods used in bacteriology: rapid and effective]. *Klinik Derg.* 2018; 31(3): 176-80. Turkish.

### 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)

DOI: 10.5152/kd.2018.44



## Giriş

Mikroorganizmalar yüzyıllardır varlığını bildiğimiz, insanoğluya etkileşim içerisinde yaşayan canlılardır. Bu süreç içerisinde insan mikrobiyotasını oluşturmuş, böylece yararlı hale gelmiş olan türler bulunmaktadır. Bu yararlı özellikleri taşıyan türler bulunmasına karşın, günümüzde, içme suyunun yanı sıra üretim süreçleri sırasında farmasötik formların ve besinlerin mikroorganizmalarca kontamine edilebilmesi riski, önemli problemlerden biridir. Son yıllarda gündeme gelen biyolojik terör tehlikesi de mikroorganizmalara gösterilen ilgiyi artırmaktadır (1,2). Farklı sektörleri ilgilendiren bu gibi durumlar dışında, dünyadaki bütün ölümlerin yaklaşık yüzde 30'u infeksiyon hastalıklarına bağlıdır. Bu durumda, başta bakteriler olmak üzere, infeksiyon etkenlerinin tanımlanmasının, gerek klinik mikrobiyoloji gerekse sağlık politikaları açısından önemi de artmaktadır (3).

Yıllardır kullanılan klasik tanı yöntemleri, mikroorganizmanın kültürde üretilmesine dayanmaktadır. Bakterilere ait koloni tipi, hemoliz ve pigment yapması gibi gözleme dayanan özelliklerin incelenmesi ve çeşitli biyokimyasal testlerin yapılması sırasında, her zaman bir kontaminasyon riski ya da yanlış yorumlama olasılığı vardır. Kültürü yapılamayan, uzun sürede üreyen ve polimikrobik infeksiyonlarda tanı aşamalarında sorun yaşanmakta olduğu için daha hızlı ve daha duyarlı tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır (1,4). Daha hızlı tanımlama yapılabilirdiği takdirde özellikle sepsis gibi hızlı bir biçimde antibiyotik tedavisine başlanması gereken durumlarda tedavinin düzenlenmesi daha kolay olacaktır (5). Bu derleme kapsamında kültür ve biyokimyasal identifikasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, görece farklı yaklaşımlar içeren, daha hızlı şekilde sonuca ulaşan ve daha çok klinik mikrobiyolojide kullanılan bakteriyel tanı yöntemleri gözden geçirilecektir.

## Moleküler Yöntemler

Genetik materyalin keşfi ve görevlerinin saptanması, sadece mikrobiyoloji alanında değil, pek çok bilim dalında da 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.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tabanlı Yöntemler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), pek çok farklı dezoksiribonükleik asid (DNA) içeren bir örnek veya havuz içinden istenen bölgenin, o gene spesifik primerler aracılığıyla enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı *Taq* polimeraz enziminin keşfini takiben kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Elde edilen DNA parçacıkları, agaroz jel elektroforezinde veya kullanılan primerlerin florofor boya ile işaretlenmesiyle görünür hale getirilmekte ve böylece genin varlığı tespit edilebilmektedir. Bakteriyoloji açısından düşünüldüğünde, herhangi bir bakteriye ait spesifik gen bölgeleri hedef alınarak tanımlama yapılmasına olanak sağlamaktadır. Tüm bakteri türlerine ait genetik olarak korunmuş bölgeleri hedef alan evrensel primerler sayesinde bir örnekte bakteri olup olmadığının tespiti başarılı olarak yapılabilmektedir (6). Bir kaynaktan tür ayrımı yapılmaksızın

bakteri varlığının tespiti, tanı ve tedavi açısından öneminin daha az olduğu düşünülse de, bu durum özellikle besinlerin kontrolü açısından önem arz etmektedir (7).

PZR sayesinde, genel olarak korunmuş bölgeler dışında, sadece tür, alttür ve serotiplere ait özelleşmiş gen bölgelerine yönelik olarak daha ayrıntılı bir ayırım ve tanımlama yapılabilmektedir. Bu noktada bakterilerde bulunan ve fonksiyonel olarak korunmuş 16S rRNA, 23S rRNA, *gyrA*, *gyrB*, *hsp65* gibi bölgeler tercih edilmektedir (8,9). Bununla birlikte *Salmonella enterica* serotipleri için invazyondan sorumlu *invA*, *Pseudomonas* türleri için ise *oprL* ve *oprI* gibi dış zar lipoproteini genlerinin tanımlanması gibi türe özgü bölgelerden faydalanılması da söz konusudur (10-12).

Yöntemin kendi içerisinde pek çok avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır. Sık yapılan ve hâkim olunan bir yöntem olması, en önemli üstünlüğü olarak öne çıkmaktadır. Yöntemin standardizasyonu ve ayrıntılarla ilgili pek çok başarılı çalışmaya ulaşılabilir olması, deneylerin daha yüksek oranda tekrarlanabilmesine olanak sağlamaktadır. Basit, uygulanması nispeten kolay bir yöntem olması genel avantajları olarak sayılabilir. Ancak tekniğin, birbirini takip eden birkaç basamağı içermesi, emek-yoğun bir yöntem olmasına 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 uygun primerler tasarlanıp kullanılarak, *Neisseria gonorrhoeae*'nin hem identifikasyonunun hem de klinik örnekteki bakteri miktarının koloni oluşturan birim (CFU) olarak tespit edilebileceği ortaya konulmuştur.

### Dezoksiribonükleik Asid 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 kültürde üretilmiş bakterilerden, hatta direkt olarak klinik örneklerden tanımlama yoluna gidilmiştir (16). Bu teknoloji sayesinde alışılmamış ve daha önceki dönemde kültürünün yapılması 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 anlamda analiz yapılmasına

izin verecek uzunlukta olması, önemli bir avantaj getirmektedir (18,19).

Bu yöntemin ilgi çeken en önemli özelliği 90'lı yıllarda kullanıma girmesiyle birlikte biyokimyasal ve kültürel yöntemlerle tanımlanması ve ayrımı 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. Bunlardan birisi *Bacillus cereus* ve *B. anthracis* gibi tamamen birbirinin aynı 16S rRNA gen dizilerine sahip bakterilerde ayrımın yapılamamasıdır. Bu ve benzer bakteriler için daha farklı hedeflerin seçilmesi söz konusudur. *rpoB*, *gyrA*, *gyrB* gibi hedefler bu anlamda öne çıkan gen bölgeleridir (17).

### **Mikrodizilim**

Mikrodizilim ("microarray"), belli gen bölgelerine hibridize olacak oligonükleotid problemlerin kullanılıp, bilgisayar tarafından sinyal sistemiyle tanınması temeline sahip bir yöntemdir. Bakteriyel tanı için korunmuş ve spesifik olma özelliği taşıyan *gyrA*, *parE*, 16S rRNA 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 başarıyla ve yüksek duyarlılıkla idantifiye edilebilmiştir. Ayrıca çeşitli direnç ve virülans genlerini tespit edecek tasarımların kullanılması sayesinde daha ayrıntılı tanımlamalara gidilebilmektedir. 2015 yılında yapılmış bir başka çalışmada bakteri türleri yanında bazı temel direnç genlerinin tespiti yapılarak yöntemin sadece idantifikasyon amacıyla değil, tedaviyi yönlendirebilecek şekilde düzenlenebileceği de gösterilmiştir (22).

Modern dönemlerin ilgi çeken bir yöntemi olan mikrodizilim 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 olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca bir deney için dizi analizlerine bağımlı olarak çok sayıda oligonükleotid problemlerin tasarlanması zorunda olunması yine yöntemin dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır (23).

### **Floresan İn Situ Hibridizasyon**

Mikroorganizmaların tanısı amacıyla rRNA'yı hedefleyen modifiye edilmiş oligonükleotid problemlerin kullanıldığı ve kısaca FISH olarak gösterilen bir yöntemdir. 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 boya ile işaretlenen bu diziler kendi üzerine katlanma yapmayacak veya farklı gen bölgelerine bağlanmayacak şekilde tasarlandığında, istenen RNA bölgesiyle hibridize olmasını takiben ışığa yapıştırmak ve floresan mikroskopunda boyaya özgü renklerin seçilmesiyle tanılamaya gidilmektedir (25).

Yöntemin özgüllüğü ve uygulanabilirliğiyle ilgili pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. Duyarlı olarak tanı yapılabilmesi, 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 kan ve beyin-omurilik sıvısı gibi klinik örneklerden direkt olarak tanı yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Yöntemin bir diğer avantajı herhangi bir amplifikasyon basamağı içermediği için kontaminasyonun oluşturacağı risklerin daha az oluşudur (26). Özellikle kültürünün yapılması uzun veya zor olan *Mycobacterium* ve *Legionella* türlerinde 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 üç boyutlu yapılarının moleküller arasındaki etkileşimi değiştireceği için tasarım işlemi göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Floresan işaretleme için seçilecek boya konusunda duyarlı davranılması ve bazı bakterilerin doğal floresan görüntüleriyle karışmayacak şekilde belirlenmesi gerekliliği yöntemin uygulamasındaki zorluklar olarak sayılmaktadır (24,29).

### **Spektroskopik Yöntemler**

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

#### **Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometrisi**

Genel tanı yöntemlerinden oldukça farklı bir yaklaşıma sahip ve umut vadeden bu yöntemde, bakteriye ait tüm kimyasal kompozisyonun görüntülenmesi sayesinde tanılamaya yapılmaktadır (30). Görüntüleme sonucu bakteriye ait kızılötesi spektrumları elde edilir. Böylece bir nevi parmak izi oluşturularak bakteriye özgü 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 tanılamaya yapılabilmesi mümkündür (31). Ayrıca uygulanmasının kolay olması ve herhangi bir kimyasala ihtiyaç duyulmaması yöntemin getirdiği üstünlükler olarak göze çarpmaktadır. Yöntemle ilgili başarılı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bosch ve arkadaşları (32)'nin yaptıkları çalışmada az miktarlarda örneklerle kistik fibrozlu hastaların solunum sisteminde sık görülen bakterilerin tanımlanması başarıyla yapılabilmektedir. Özellikle idantifikasyonu görece zor olan *Burkholderia* türlerinin en sık görülen dört türünün, başarılı şekilde ayırt edilerek ortaya konulması dikkat çekicidir. 2018 yılında yapılan bir başka çalışmada ortaya konulan sonuçlar bu yöntemin *Salmonella enterica* serotiplerinin tanısında kullanılabilirliğini göstermektedir. 2600 kadar serotipi bulunan bu türün üyelerinde genel serotip tanısı için aglütinasyona dayalı pahalı ve fazla sayıda antijenik serum gerektiren bir yöntemin yerine, alternatif olabileceği gösterilmiştir (33).

Bütün bu pozitif sonuçlara karşın 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).

### 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 çekici bir yöntem olmasını sağlamıştır (35). Bu sayede yöntemin kültürden bağımsız hale gelmesi sağlanmış, böylece üretme basamağı ortadan kaldırılmıştır. Bu sayede daha hızlı hale gelmesinin yanı sıra kültürde üretilmeyen bakterilerin *in situ* tespitleri yapılabilir hale gelmiştir ve tek bir bakteri hücrelerinden bile tanılama olanağı sağlanmıştır (36).

Tang ve arkadaşları (37) tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada Gram-negatif bakterilerin ve *Mycobacterium* türlerinin bu yöntemle idantifikasyonu 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 da yapılabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır. Yöntemi *Staphylococcus* türlerinin ayrımı açısından değerlendiren bu çalışma, türe özgü ışımaya piklerini tespit ederek farklı türleri birbirinden başarıyla ayırt ederek tanımlayabilmektedir. 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 duyarlı olan bu yöntem sayesinde, planktonik ve biyofilm içerisindeki hücreler arasındaki fark ortaya konulabilmektedir. Dolayısıyla bu prensip doğrultusunda yapılan çalışmalarda, bakterilerin doğada bulunuş şekillerinden bağımsız bir biçimde tanımlanmalarının yapılabileceği tespit edilmiştir (38).

### Matriksle Desteklenmiş Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi

Son yıllarda idantifikasyon amacıyla özellikle klinik mikrobiyoloji alanında kullanılan ve kısaca MALDI-TOF MS olarak gösterilen bir spektrometri yöntemidir. 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 idantifikasyonuna gidilmektedir (39). Yüksek derecede duyarlılık 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 %90'ın 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).

### 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 metodların keşfedilmesi geleceğe yönelik beklentiler arasındadır. Ancak yöntemlerin gerektirdiği cihaz ve maddelere ulaşımın zorluğu kadar, nitelikli insan yetersizliğinin bu metodların kullanımını 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.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### 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. Ledebauer 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 Cemiy 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, Stämmler 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. Bumbrah 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.