



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN NADİR OLARAK İZOLE EDİLEN VE
TANIMLANMASI ZOR MİKROORGANİZMALARIN
İDENTİFİKASYONUNDA KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE DİZİ
ANALİZİ YÖNTEMİNİN UYUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

GÖKÇEN ORMANOĞLU

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÖZLEM AYDEMİR

2025-SAKARYA

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN NADİR OLARAK İZOLE EDİLEN VE
TANIMLANMASI ZOR MİKROORGANİZMALARIN
İDENTİFİKASYONUNDA KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE DİZİ
ANALİZİ YÖNTEMİNİN UYUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

GÖKÇEN ORMANOĞLU

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÖZLEM AYDEMİR

2025-SAKARYA

ONAY

Kurum : Sakarya Üniversitesi/Tıp Fakültesi

Program türü : Uzmanlık Tezi

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Gökçen Ormanoğlu

Sınav Tarihi : **Saat:**

Tez Başlığı : Klinik örneklerden nadir olarak izole edilen ve tanımlanması zor mikroorganizmaların identifikasyonunda kütle spektrometrisi ile dizi analizi yönteminin uyumunun araştırılması

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Uzmanlık Tezi olarak Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza	Kabul/Red*
Danışman (Üye)			
Üye			
Üye			

* Red kararının gerekçesi onay sayfasının arkasında belirtilmelidir.

ONAY

“Bu tez ../../202.. tarihinde yukarıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

../../202..
Tıp Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

*Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi İlaç Dışı Girişimsel Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 21/10/2022 tarihinde onay alınarak hazırlanmıştır.

*Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından 176638-112 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tarih:

.../.../...

Gökçen Ormanoğlu

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle binbir emekle beni büyütüp bugünlere getiren, halen üzerimden ellerini çekmeyen, ilk öğretmenlerim; annem Fatma AYDOĞDU ile babam Mustafa AYDOĞDU'ya ve biricik kardeşim Mehmet AYDOĞDU'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ, Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Tayfur DEMİRAY'a; bizlere yol gösteren uzman hekimlerimize; birlikte keyifle çalıştığım sevgili asistan arkadaşlarıma; kocaman bir aile olduğumuz tüm laboratuvar personelimize,

Asistanlığım boyunca bilgi ve birikimine hep hayranlık duyduğum, tez sürecimde ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen, hekimliğini her yönüyle kendime örnek aldığım ve yaşamıma birçok yönden dokunmuş olan sevgili hocam Doç. Dr. Hande TOPTAN'a, Sahip olduğu tecrübeler ile yolumu aydınlatıp, kitaplardan çok daha fazlasını bana öğretmiş olan, bilgiye ulaşılan yolda azimli olmayı ve vazgeçmemeyi hep ondan öğrendiğim, donanımlı bir hekim olarak yetişmemi sağlayan, devletçilik ilkesine olan bağlılığı ve toplumun değerlerini benimseyerek yürüttüğü yöneticilik anlayışı ile bana rol model olan ve iyi bir yöneticinin sahip olması gereken temel değerleri ondan öğrendiğim, bir ömür minnettar olacağım çok kıymetli saygıdeğer hocam anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU'na,

Asistanlığım süresince büyük bir emek ve özveri ile beni yetiştiren, bildiği her şeyi bana öğretip, hekimlikteki donanımı ile yoluma ışık tutan ve bu süreçte edindiğim tüm akademik kazanımların da ötesinde; güçlü duruşu, üretkenliği, hayatı dengeli yaşama biçimiyle bana hep ilham kaynağı olan, tez sürecimdeki bilimsel desteğin yanı sıra zaman zaman ihtiyacım olan manevi motivasyonu sağlayan ve beni hep daha iyisini yapmaya cesaretlendirip teşvik eden, asistanı olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Özlem AYDEMİR'e,

Son olarak, aile yolculuğumda bana hep iyi ki dedirten, sadece bu zorlu süreçte değil hayatımın her aşamasında kolaylaştırıp güzelleştirmek için üstün çaba sarfeden ve beni hep yüreklendiren sevgili eşim Zülfü ORMANOĞLU'na; yaşama sevincim, gözümün nuru oğullarım Mete Çınar'ım ve Yağız'ıma, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. GÖKÇEN ORMANOĞLU

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bakteri Tanımlama Yöntemleri	3
2.1.1. Konvansiyonel yöntemler ile tanımlama	3
2.1.2. Otomatize tanımlama ve antibiyotik duyarlılık test sistemleri	5
2.1.3. Moleküler tanımlama yöntemleri	8
2.1.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu	8
2.1.3.2. DNA dizileme yöntemleri	9
2.1.4. Kütle spektrometrisi	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Etik Kurul Onayı	30
3.2. Çalışma Grubu	30
3.3. Kütle Spektrometrisi ile İdentifikasyon	31
3.4. Nükleik Asit (DNA) İzolasyonu	32
3.5. 16S rRNA Bölgesinin Amplifikasyonu	33
3.6. 16S rRNA Sekans	34
4. BULGULAR	36
4.1. Kütle Spektrometrisi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	36
4.1.1. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında tür/cins düzeyinde uyumlu bulunan suşlar	36

4.1.2. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında uyumsuz bulunan suşlar	36
4.1.3. Kütle spektrometrisi ile tür/cins ayrımı yapılamayan suşlar.....	41
4.1.4. Kütle spektrometrisi ile tanımlanamayan suşlar.....	42
4.2. Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	43
4.2.1. Blast yapılan dizi uzunluğu ortalamaları.....	45
4.2.2. Dizi analizinde tür/cins ayrımı yapılamayan suşlar.....	45
4.3. Kütle Spektrometrisi ve Dizi Analizi Sonuçlarının Kriterlere Göre Karşılaştırılması	47
4.4. Dizi Analizi Sonuçları ile Türü/Alt Türü Belirlenen Suşların KS Sonuçları ile Karşılaştırılması.....	49
4.5. Metodlara Göre Tanımlama Süreleri.....	50
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6.KAYNAKLAR	63
7.EKLER	76
7.1. EK-1: Etik kurul kararı	76
ÖZGEÇMİŞ	77

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

A	: Adenin
ADT	: Antibiyotik duyarlılık testi
BCYE	: Buffered charcoal yeast extract
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
C	: Sitozin
CHCA	: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
emPCR	: Emülsiyon PCR
G	: Guanin
IC	: Identification criteria
IVD	: İn vitro tanı
KS	: Kütle spektrometrisi
MALDI	: Matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MS	: MALDI-TOF-MS
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
P	: Fosfat
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PYR	: L-Pirolidonil- β -naftilamid
RUO	: Research Use Only (Araştırma amaçlı)
T	: Timin
TK	: Tanımlama kriteri
TOF	: Uçuş süresi
ZMW	: Sıfır modlu dalga kılavuzu
α HL	: Alfa-hemolizin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.3.2.1. Birinci nesil dizileme yöntemlerinden Maxam-Gilbert dizileme yönteminin temel prensibi.....	11
Şekil 2.1.3.2.2. Birinci nesil dizileme yöntemlerinden Sanger yönteminin temel prensibi.....	14
Şekil 2.1.3.2.3. Dizi analiz sonucunda elde edilen elektroferogram verileri.....	14
Şekil 2.1.3.2.4. Dizileme verilerinin FASTA formatına dönüştürüldükten sonra NCBI veritabanına (Nucleotide BLAST) yüklenmesi.....	15
Şekil 2.1.3.2.5. Dizilerin birbirlerine olan benzerliklerinin yüzde olarak ifade edilmesi ve benzerlik yüzdelere göre en yüksekten düşüğe doğru sıralanması.....	15
Şekil 2.1.3.2.6. İkinci nesil dizileme yöntemlerinden Illumina yönteminin temel prensibi.....	19
Şekil 2.1.3.2.7. İkinci nesil dizileme yöntemlerinden Ion Torrent yönteminin temel prensibi ve iyon raporlayıcısı.....	20
Şekil 2.1.3.2.8. Üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden Pacific Bioscience Yönteminin temel prensibi.....	22
Şekil 2.1.3.2.9. Üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden Oxford Nanopore teknolojisi yöntemi.....	23
Şekil 2.1.4.1. Kütle spektrometrisi çalışma prensibi.....	28
Şekil 2.1.4.2. Kütle spektrometrisi çalışma prensibi.....	28
Şekil 3.3.1. Kütle spektrometrisinin numune hazırlığı.....	32

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.3.2.1. Dizileme yöntemleri ve özellikleri.....	24
Tablo 4.1.1.1. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında tür düzeyinde uyumlu bulunan suşlar.....	37
Tablo 4.1.1.2. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında yalnızca cins düzeyinde uyumlu bulunan suşlar.....	39
Tablo 4.1.2.1. Kütle spektrometrisi ve 16S rRNA dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında uyumsuz bulunan suşlar.....	40
Tablo 4.1.3.1. Kütle spektrometrisinin tür/cins ayrımı yapamadığı suşlar.....	42
Tablo 4.1.4.1. Kütle spektrometrisi ile tanımlanamayan suşların dizi analizi sonuçları.....	43
Tablo 4.2.1. Dizi analizinde belirlenen kriterlere göre tür/cins düzeyinde tanımlanan suş sayıları.....	45
Tablo 4.3.1. İki yöntem arasında cins ve tür düzeyindeki uyumun, üç farklı tanımlama kriteri ile değerlendirilmesi.....	49
Tablo 4.4.1. 16S rRNA dizi analizi sonuçları ile türü/alt türü belirlenen suşlar.....	49

RESİM LİSTESİ

Resim 3.4.1. Numunelerin genomik DNA konsantrasyonlarının ölçüldüğü MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (NanoDrop) cihazı.....	33
Resim 3.6.1. Dizi analizinin yapıldığı Applied Biosystems Hitachi 3500 Genetic Analyzer otomatize dizi analiz cihazı.....	35



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada klinik örneklerden nadir olarak izole edilen, tanımlanması zor mikroorganizmaların identifikasyonunda kütle spektrometrisinin (KS) analitik ve pratik performansının değerlendirilmesi ve 16S rRNA dizi analizi yöntemiyle uyumunun araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Çalışmaya, klinik numunelerden izole edilen, nadir karşılaşılan ve alışılmadık morfolojik/biyokimyasal özelliklere sahip 116 suş ile KS tarafından tanımlanamayan 10 suş olmak üzere toplam 126 bakteriyel suş dahil edilmiştir. Dondurularak (-80°C) saklanan bu suşlara nükleik asit izolasyonu, 16S rRNA PCR ve Sanger dizileme işlemleri uygulanmıştır. Dizileme ve BLAST analizleri sonucunda elde edilen benzerlik yüzdelere göre üç farklı tanımlama kriteri (TK) oluşturulmuş ve KS sonuçları bu kriterlerle karşılaştırılmıştır.

BULGULAR: Tanımlama kriterlerine göre cins ve tür düzeyinde uyum oranları değişkenlik göstermiştir. TK1: Tür düzeyinde $\geq 99\%$, cins düzeyinde $\geq 97\%$ benzerlik oranı sınır değer olarak kabul edildiğinde, cins düzeyinde $73,8\%$, tür düzeyinde $32,5\%$ oranında uyum saptanmıştır. TK2: Tür düzeyinde $\geq 97\%$, cins düzeyinde $\geq 95\%$ sınır değer alındığında, cins düzeyinde $77,7\%$, tür düzeyinde $59,5\%$ uyum elde edilmiştir. TK3: Herhangi bir sınır değer belirlenmediğinde, cins düzeyinde $80,1\%$, tür düzeyinde $65,1\%$ uyum saptanmıştır. Her üç kriterde de cins düzeyinde yanlış tanımlama oranı $10,3\%$ olarak bulunmuştur.

SONUÇ: Bu çalışmada, 16S rRNA dizileme yöntemi ile KS sonuçları üç farklı tanımlama kriteri kapsamında değerlendirilmiş; bu yönüyle literatürde öncü nitelikte bir çalışma olmuştur. KS ile dizileme sonuçları arasındaki uyum oranlarının, TK1'de düşük, TK2'de orta, TK3'te ise en yüksek düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. KS yöntemi ile bakterilerin birkaç dakika içinde tanımlanabilmesi, özellikle zamanın kritik olduğu durumlarda büyük avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık dizileme yöntemleri pahalı, zaman alıcı ve yoğun iş yükü gerektirdiğinden, günlük rutin kullanımı sınırlıdır. Sıklıkla izole edilen bakterilerin yanı sıra, nadir saptanan ve tanımlanması zor suşlarda da KS'nin etkin biçimde kullanılabileceği gösterilmiştir. KS ile dizi analiz yöntemlerinin güvenilir biçimde karşılaştırılabilmesi için, standart tanımlama kriterlerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda daha kapsamlı ve çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, bakteriyel identifikasyon, kütle spektrometrisi, MALDI-TOF MS, nadir bakteriler

ABSTRACT

Investigation of compatibility of mass spectrometry and sequence analysis methods in identification of rarely isolated and difficult to identify microorganisms from clinical samples

AIM: The aim of this study was to evaluate the analytical and practical performance of mass spectrometry (MS) in the identification of rarely isolated and difficult-to-identify microorganisms from clinical samples, and to assess its concordance with 16S rRNA sequencing analysis.

MATERIALS AND METHODS: A total of 126 bacterial strains isolated from clinical samples were included in the study, comprising 116 strains identified by MS and 10 unidentified strains with rare and unusual morphological/biochemical characteristics. Strains stored at -80°C underwent nucleic acid extraction followed by 16S rRNA PCR and Sanger sequencing. Based on similarity percentages from BLAST analysis, three different identification criteria (IC1, IC2, IC3) were established, and the MS results were evaluated accordingly.

RESULTS: Concordance rates at the genus and species levels varied depending on the criteria used. For IC1 ($\geq 99\%$ similarity for species-level and $\geq 97\%$ for genus-level identification), concordance was 73.8% at the genus level and 32.5% at the species level. For IC2 ($\geq 97\%$ for species and $\geq 95\%$ for genus), concordance increased to 77.7% (genus) and 59.5% (species). For IC3, in which no similarity thresholds were applied, concordance was 80.1% at the genus level and 65.1% at the species level. Across all criteria, the misidentification rate at the genus level was 10.3%.

CONCLUSION: In this study, results were evaluated using three different identification criteria, making it the first study of its kind in the literature. Concordance between MS and sequencing was lowest under IC1, higher under IC2, and highest under IC3. To enable accurate comparison between MS and sequencing methods, standardized identification criteria are needed. The rapid identification capability of MS offers significant advantages. Considering the limitations of sequencing—such as high cost, time consumption, heavy workload, and limited feasibility for routine use—MS is advantageous not only for commonly isolated bacteria but also for rarely encountered and difficult-to-identify strains. Further comprehensive research is warranted.

Keywords: 16S rRNA, bacterial identification, MALDI-TOF MS, mass spectrometry, rare bacteria, sequence analysis



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarları; enfeksiyon şüphesi ile gönderilen tüm biyolojik örnekleri inceleyerek, insanda enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların tanısını koyup, gerek duyulduğunda duyarlılık testleri yapan; ayırıcı tanı-tanı aşamasından, tedaviye, enfeksiyonun yayılmasını önleyen kontrol önlemlerine kadar her noktada kritik rolü ile klinisyene ışık tutmaktadır (Peterson ve ark., 2001). Buna ilaveten yeni tanımlanan ve/veya yeniden önem kazanan hastalık etkenleri, zaman zaman epidemilere sebep olan bakteri veya virüsler, değişen hasta profilleri ve tanısı konulan alışılmamış (fırsatçı) enfeksiyonlar, antimikrobiyal ilaçlara karşı hızlı direnç gelişimi ile aynı zamanda dinamik bir yapıya sahiptir.

Laboratuvarlarda bakterileri tanımlarken taksonomik dizisi, morfolojik özelliği, virülans faktörleri, fizyolojik-metabolik özellikleri bilinen rutinde sık karşılaşılan suşlarda tanımlama daha rahat yapılabilirken; besiyerlerinde yavaş üreyen, alışılmadık fenotiplere sahip, atipik biyokimyasal profil sergileyebilen bazı suşların tanımlanmasında zorluklar yaşanabilmektedir (Lau ve ark., 2014). Rutinde bakterileri tanımlarken kültüre dayalı konvansiyonel yöntemler sık bir şekilde kullanılırken, nadir izole edilen etkenleri tanımlamada bu yöntemler çoğu zaman yeterli olmamaktadır. Ayrıca bu testler zaman alıcı olduğundan sonuçların klinisyene ulaştırılmasında gecikmeler yaşanabilmektedir. Son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında duyarlı ve hızlı tanımlama yapabilen otomatize sistemlerin kullanımı yaygınlaşmış ve bu sistemler (VITEK 2®, BD Phoenix™, MicroScan WalkAway®) çoğu laboratuvarın günlük rutinine zaman içerisinde dahil olmayı başarmıştır (Gajic ve ark., 2022). Moleküler yöntemler (16S rRNA gen dizilimi, tüm genom analizi) duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksek olması nedeni ile bakterilerin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (Costa ve ark., 2022). Ancak maliyetlerinin yüksek oluşu, rutinde kullanılan sistemlere entegrasyonlarının zor oluşu vb. nedenlerle kullanımları sınırlı kalmıştır (Woo ve ark., 2008). Son yıllarda geliştirilen kütle spektrometrisi (KS) yöntemi kullanım kolaylığı, hızlı oluşu ve tanımlamadaki yüksek

doğruluk oranlarıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarının rutin iş akışında önemli bir noktaya gelmeyi başardı (Seng ve ark., 2013). Farklı kullanım amaçları ile geliştirilen KS cihazlarının bakterileri tür/cins düzeyinde doğru tanımlayıp tanımlamadığını farklı yöntemlerle karşılaştıran (konvansiyonel fenotipik yöntemler, VITEK 2® gibi farklı otomatize sistemler, 16S rRNA gen dizileme) çalışmalar mevcuttur (Costa ve ark., 2022; Seng ve ark., 2009). Kütle spektrometrisinin performansını 16S rRNA gen dizileme ile karşılaştıran çalışmalarda KS'nin 16S rRNA gen dizilimi gibi moleküler tanımlama tekniklerine olan ihtiyacı azaltma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Mellmann ve ark., 2008). Ancak bu çalışmalar genellikle rutinde karşılaşılan suşlarda yapılmış olup; nadir ve tanımlanması zor bakterilerde güvenilirliğini araştıran çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Bizzini ve ark., 2011; Ye ve ark., 2018). Bu çalışmada klinik örneklerden nadir olarak izole edilen ve tanımlanması zor mikroorganizmaların identifikasyonunda KS'nin analitik ve pratik performansının değerlendirilmesi ve 16S rRNA gen dizi analizi yöntemi ile uyumunun araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Enfeksiyona neden olan mikroorganizmaları tanımlamak tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının en önemli görevlerinden biridir. Enfeksiyonların doğru ve hızlı antimikrobiyal tedaviye başlanabilmesi için enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların doğru ve hızlı tanımlanması büyük önem arz etmektedir (Nomura, 2015). Mikrobiyoloji laboratuvarında bakterileri tanımlamada farklı yöntemler kullanılabilmektedir. Bu yöntemlerin avantajları, dezavantajları bulunmaktadır.

2.1. Bakteri Tanımlama Yöntemleri

2.1.1. Konvansiyonel yöntemler ile tanımlama

Kültür bazlı konvansiyonel yöntemler canlı bir bakterinin varlığına bağlı olup, onun besleyici ortamlarda üretilip büyütülerek işlemlere tabi tutulmasına dayanır (Behera ve ark., 2021). Laboratuvarlarda bakterileri tanımlamak için kültüre dayalı konvansiyonel yöntemler çok yaygın olarak kullanılmakta; morfolojilerine, boyama özelliklerine ve biyokimyasal özelliklerine bakılarak geleneksel tanımlama yapılabilmektedir (Talamantes ve ark., 2019).

Rutin laboratuvar işleyişinde laboratuvara gelen örneklerden gram boyama yapılmakta ve eş zamanlı olarak rutinde kullanılan standart besiyerlerine; Koyun Kanlı Agar, Eosin Methylene-Blue ve/veya Çikolatamsı Agar (RTA, Türkiye) ekimleri yapılmaktadır (Özbek ve Atmaca, 2024). Ardından örnekler 37°C’de 16-48 saatlik inkübasyona bırakılırken; anaerop bakterinin etken olduğu düşünülen numunelerden yapılan ekimler özel anaerop ortam sağlayıcıların kullanıldığı poşetlerde veya kavanozlarda (örneğin; GasPak™ EZ BD Diagnostics Systems, Sparks, MD, ABD) 5 günlük inkübasyona bırakılmakta ve inkübasyon sırasında üreme kontrolleri yapılmaktadır (Özbek ve Atmaca, 2024). Ancak kültürde rutin uygulanan inkübasyon süresi tüm bakterilerin üreyebilmesi için yeterli olamayabilir. Örneğin *Brucella* sp., *Mycobacterium tuberculosis* gibi zor üreyen bakterilerin daha uzun inkübasyon süresine ihtiyacı vardır (Bilgehan, 1999). Bu nedenle klinisyen tarafından özellikle

belirtilmediği takdirde daha uzun inkübasyon gerektiren bakterilerde tanımlama gözden kaçabilmektedir. 37°C inkübasyonda üreyemeyen veya üremesi için farklı sıcaklık ortamı gerektiren bakteriler de mevcuttur. Örneğin *Listeria monocytogenes*'in +4°C sıcaklıkta 1-2 gün bekletilmesi besiyerinden izolasyon şansını artırmaktadır (Lorber, 2014). Termofilik bakterilerden *Campylobacter jejuni*'nin optimal üreme sıcaklığı 42-43°C iken; *Geobacillus stearothermophilus* optimum olarak 55°C'de üremektedir (Quinn ve ark., 2004). Aynı zamanda bazı bakterilerin farklı düzeylerde oksijen ihtiyaçları bulunabilmektedir. Örneğin *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* sp. gibi bakteriler üreyebilmesi için %5-7 oksijen ve %5-10 CO₂ içeren mikroaerofilik ortama ihtiyaç duymaktadır (Bilgehan, 1999). Rutinde kullanılan besiyerlerinde üreyemeyip özel besiyeri ihtiyacı olan bakteriler mevcuttur. Örneğin *Legionella* cinsi bakterileri üretmek için Buffered charcoal yeast extract (BCYE) gerekirken, *Bordetella pertussis* için Bordet-Gengou Agar; *Mycobacterium tuberculosis* için Löwenstein-Jensen besiyeri gerekmektedir (Ustaçelebi, 1999). *Rickettsia* sp., *Chlamydia* sp., *Coxiella* sp. gibi bazı bakteriler ise hücre içi zorunlu bakteriler olması nedeniyle rutin besiyerlerinde üretilmemektedir (Bilgehan, 1999).

İnkübasyonun sonunda üreyen bakteri kolonilerinden tekrar gram boyama ve tanımlama için biyokimyasal testlere (katalaz, oksidaz, sitrat, indol, üreaz vb.) başvurulmaktadır (Ullah ve ark., 2021). Bakteri kolonilerinin morfolojik değerlendirilmesinde suşlar arasındaki benzerlikler yanlış tanımlamaya yol açabileceği gibi, kronik enfeksiyonlu hastalardan izole edilen suşlar karakteristik fenotiplerini zamanla kaybedebilir ve tanımlama bu aşamada güçleşebilir (Fegan ve ark., 1990). Kültürde üreyen bakterilerden yapılan rutin gram boyama, bakterilerin identifikasyonunda yol gösterici olmaktadır. Ancak hücre duvar yapısı bulunmayan *Mycoplasma* sp. ile *Mycobacterium tuberculosis* ve *Nocardia* sp. gibi bazı bakteriler hücre duvar yapıları nedeniyle gram boyama ile boyanamamaktadır (Ustaçelebi, 1999). Bu bakterilerin mikroskopik olarak değerlendirilebilmesi için farklı boyama yöntemleri (Ehrlich-Ziehl-Neelsen, Auramin-rodamin, Giemsa vb.) uygulanmalıdır (Ustaçelebi, 1999). Bu durum bu bakterilerin boyama yöntemiyle tanımlanmalarında hatalara neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra bazı bakteriler ışık mikroskobu ile değerlendirilememektedir. Örneğin *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira* gibi spiroket

grubu bakterilerin mikroskopik değeriendirilmesi için karanlık alan veya faz kontrast mikroskopuna ihtiyaç duyulmaktadır (Bilgehan, 1999).

Kültürde üreyen bakterilerden, bakteri tanımlanmasında biyokimyasal testler yapılırken düşünölen bakteri türüne göre farklı biyokimyasal testler tercih edilir. Gram pozitif bir bakteri düşünölüyorsa katalaz, koagölaz, PYR testi (L-Pirolidonil- β -naftilamid), basitrasın duyarlılık testi gibi testlere yönelirken; gram negatif olduğu düşünölen bakterilerde oksidaz, sitrat, üreaz, indol vb. biyokimyasal testler tanımlamada kullanılmaktadır (Ustaçelebi, 1999). Benzer biyokimyasal profile sahip farklı tür bakteriler mevcut olabilir ve bu durumda sonuçlar belirsiz olabilmektedir (Jesumirhewe ve ark., 2016). Biyokimyasal testlerin her birinin ayrı çalışılması, her bakteri için birden fazla biyokimyasal test gerekmesi yoğun bir iş yükü oluşturmaktadır. Bu amaçla tüm biyokimyasal testlerin bir arada çalışılmasını sağlayan API sistemi (Sysmex Biomerieux, Lyon, Fransa) gibi ticari manuel fenotipik testler de geliştirilmiştir. Ancak bu testlerin değeriendirme ve yorumlanmasında sorunlar yaşanlabilmektedir (Meena ve ark., 2021). Klinikte nadir karşılaşılan bakterilerin biyokimyasal profilleri için güvenilir referanslar eksik olduğundan tanımlarken zorluk yaşanılmakta alternatif yöntemler gerekmektedir (Kostrzewa ve ark., 2019).

Bakterileri kültürde üreterek tanımlamak nispeten diğeri yöntemlere göre ucuzdur ve çoğu laboratuvar kullanılan malzemelere kolay erişim sağlayabilmektedir. Bu yöntemlerle bakterilerin tanımlanması ortalama 48-72 saati bulurken, özel inkübasyon koşulları (sıcaklık, süre, oksijen ortamı, özel besiyeri, özel biyokimyasal test) gerektiren bakterilerin tanımlanmasında bu süre daha uzun olabilmekte veya hiç tanımlama yapılamamaktadır (Bilgehan, 1999). Bu durum kültür sonuçlarının yanlış negatif olarak verilebilmesine neden olabilmektedir. Konvansiyonel yöntemler ile tüm bakterilerin tanımlanmasında yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı bir takım zorluklar bulunmakta olup, bu yöntemler her zaman yeterli olamamaktadır.

2.1.2. Otomatize tanımlama ve antibiyotik duyarlılık test sistemleri

Yukarıda açıklandığı üzere konvansiyonel yöntemlerin dezavantajlarından dolayı daha hızlı ve daha doğru tanımlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla ticari otomatize sistemler geliştirilmiş ve rutin laboratuvar işleyişine büyük katkı

sağlamıştır. Günümüzde dünya genelinde rutin laboratuvarlarda hem kullanım kolaylığı hem de tanımlamada daha yüksek duyarlılık oranları nedeni ile VITEK 2[®] (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), BD Phoenix[™] (BD Diagnostics Systems, Sparks, MD, ABD) ve MicroScan WalkAway[®] (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, ABD) tam otomatize sistemleri geliştirilmiştir. (Sogawa ve ark., 2011).

VITEK 2[®] sistemi laboratuvarların iş akışına entegre edilmeyi başararak yaygın kullanıma girmiş, klinik numunelerden mikrobiyal tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testlerini (ADT) eş zamanlı yapabilen tam otomatize bir sistemdir (Ligozzi ve ark., 2002). Mikroorganizmaların her birine özgü tek kullanımlık kolorimetrik tanımlama kartları ile antibiyogram kartları kullanılır. Gram pozitif bakterileri tanımlamak için: ID-GPC (gram positive microbial identification test card); gram negatif bakterileri tanımlamak için: ID-GNB (gram negative microbial identification test card); mayalar için YST-ID (yeast identification card) (bioMérieux, Fransa) kartları kullanılır (Garcia ve ark., 2000). Kartlar 64 adet mikro kuyucuk içermektedir ve saf mikrobiyal izolatların 0,5 McFarland süspansiyon halleri hazırlanarak kartlar ile birleştirilir (Garcia ve ark., 2000). Bir kaset üzerine birden fazla kart yerleştirilip sisteme yüklenebilir ve bu sayede aynı anda birden fazla bakteri tanımlanabilmektedir (O'Hara ve Miller, 2003). Kartlar sistemin okuyucu-inkübatör modülüne (inkübasyon sıcaklığı, 35,5°C) manuel olarak yerleştirilir ve 15 dk da bir optik bir okuyucu tarafından üreme olup olmadığı kontrol edilir (Funke ve ark., 1998). Kuyucuklardaki bakteriyel üremeyi ve metabolik değişiklikleri tespit etmek için optik algılama yöntemi kullanılır (Ligozzi ve ark., 2002). VITEK 2[®] otomatize sisteminde antibiyogram kartlarında bakteriler için 18-24 saat ve maya için 36 saat boyunca her bir kuyucukta üreme periyodik olarak izlenir. Optik sistem, floresan, bulanıklık ve kolorimetrik sinyalleri kaydetmek için çok kanallı florimetre ve fotometre okumalarını yapar ve birleştirir (Ligozzi ve ark., 2002). Antibiyogram için broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu şekilde minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlendikten sonra, bilinen bakteri türüne göre farklı antibiyotikler için sistem tarafından MİK tablosu yorumlanır ve raporlanır.

BD Phoenix[™] otomatik tanımlama ve duyarlılık test sistemi tanımlama için kromojenik ve florojenik substratların kullanıldığı mikrodilüsyona dayalı bir sistemdir

Gajic ve ark., 2022). Bu sistemde mikrokuyucuklu paneller kullanılır ve her panelde hem identifikasyon hem de 84 mikrokuyucuktan oluşan ADT bölümü bulunur. Cihaz tarafından paneller 18 saate kadar her 20 dk da bir okunur (Carroll ve ark., 2006). Mikroorganizma üremesinin tespiti için redoks indikatörü kullanılır (Snyder ve ark., 2008). Rezazurin boyası veya Alamar mavisi gibi bir oksidasyon-redüksiyon indikatörü ile çeşitli konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajanlar kullanılarak duyarlılıklar belirlenmektedir (Gajic ve ark., 2022). Bu sistemde mikroorganizmaların tanımlanması 2-12 saat sürerken; 4-16 saat sonunda ADT sonuçları MİK değerlerinin yorumlanmasıyla (duyarlı, orta veya dirençli) elde edilmiş olur (Snyder ve ark., 2008).

MicroScan WalkAway® otomatize sistemi broth mikrodilüsyon yöntemini kullanarak hem bakteriyel identifikasyon hem de ADT yapmaktadır (Stager ve Davis, 1992). BD Phoenix™ sistemindeki gibi bakteriyel enzimlerin varlığını tespit etmek için florojenik substratlar kullanılmıştır (Stager ve Davis, 1992). Bu enzimler bakteride zaten var olan ve üreme sırasında inkübasyon sürecinde gerekli olmayan enzimlerdir ve sistem bu bakteriyel enzimatik aktiviteyi algılar (Visser ve ark., 1992). Florojenik substratlar hidroliz edilir ve 2 saatlik inkübasyon sürecinde ortaya çıkan pH değişiklikleriyle birlikte oluşan metabolik yan ürünler/ürünlerin oranları tanımlamanın temelini oluşturmaktadır (Stager ve Davis, 1992). ADT sonuçları da fotosensörler kullanılarak kuyulardaki bakteri üremelerinin kolorimetrik okumaları yapılarak elde edilir. Organizmaların hızlı veya yavaş üreme özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte ADT sonuçları 4,5-18 saat arasında elde edilmiş olur (Gajic ve ark., 2022).

Otomatize sistemlerin laboratuvarlarda iş akışını hızlandırma gibi ortak faydalarının yanı sıra ayrı ayrı avantajları bulunmakla birlikte her birinin sınırlamaları da mevcuttur. Sistemlerin kullandıkları kartlar, yazılım sistemleri, kullanılan antimikrobiyal ilaçlar, mikroorganizmaların inokülüm miktarları gibi faktörler sistemlerin sonuçlarını önemli derecede etkileyebilir ve duyarlılık kategorisinde hatalara sebebiyet verebilir. Öte yandan bu sistemlerde saf bakteriyel izolatlara ihtiyaç duyduklarından antibiyotik duyarlılık profilleri elde etmek için manuel yöntemlerle eş zamanlı kullanılırlar (Garcia ve ark., 2000). Kullanılan yazılım sistemleri sık sık güncellenmeli, üreticiler tarafından güncel standartlar ışığında sınır değerleri gerekirse revize edilmeli, tespit sınırları genişletilerek iyileştirmeler yapılmalıdır. İyileştirme

sonrası sonuçların uyum derecesini tespit etmeye yönelik ek çalışmalar gerekmektedir (Gajic ve ark., 2022). Günümüzde saf bakteriyel izolatlara olan bağımlılığı azalatacak yeni teknolojiler geliştirilmeye devam etmektedir.

2.1.3. Moleküler tanımlama yöntemleri

Moleküler mikrobiyolojide yaşanan gelişmeler sayesinde in vitro şartlarda nükleik asitlerin çoğaltılması ve tespitini sağlayan yöntemler geliştirilmiştir. Mikroorganizmaların cinse/türe özgü genetik materyallerin hedef alındığı yöntemlerin geliştirilmesi bakteri tanımlanmasında daha duyarlı ve daha özgün sonuçlar elde edilmesine olanak sağlamıştır (Tekintaş ve Hoşgör, 2018). Bu gelişmeler sayesinde bakterilerin tür, alttür ve serotiplere ait özelleşmiş gen bölgeleri kullanılarak daha net ayrımlar yapılabilmektedir (Tekintaş ve Hoşgör, 2018). Moleküler yöntemler sayesinde mikroorganizmaların tanımlanması için kültürde üretilmesi gerekmeden, doğrudan klinik numunelerden kısa sürede ve yüksek doğrulukta tespit edilebilmektedir (Austin, 2017). Moleküler tanımlamada günümüzde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri, tüm genom analizi, 16S veya 18S rRNA gen dizilimi, çok odaklı dizileme tiplamesi-MLST vb. gibi yöntemler bakterileri tanımlamada en sık kullanılanlar arasındadır (Viau ve ark., 2017).

2.1.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını amaçlayan bir invitro DNA sentezi yöntemidir (Mullis ve Faloona, 1987). 1980'lerin başından itibaren mikrobik etkenlerin saptanmasında önemli bir yöntem haline gelmiş ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yerini almıştır. Termostabil DNA polimeraz enziminin keşfi ve yeni cihazlar sayesinde tek bir hedef nükleik asitten çok kısa bir süre içerisinde milyonlarca kopya nükleik asit elde edilebilmektedir (Church ve ark., 2020). Bu çalışmalarda genellikle hedef gen olarak 16S rRNA geni (son derece korunmuş bölgeleri içerdiğinden ve bakteri içerisinde binlerce kopya halinde bulunabildiğinden) tercih edilmektedir. (Church ve ark., 2020; Gürsoy ve Otlu, 2017).

PZR yönteminde DNA'daki özgül bölgeler uygun primerler yardımıyla, DNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde bir tüp içerisinde çoğaltılmaktadır. DNA

replikasyonunun hücre içerisinde gerçekleşmesi için gerekli tüm temel bileşenler; kalıp DNA, bir çift primer, dört tip deoksiribonükleotid (dNTP), ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi ve bu enzimin çalışması için gerekli pH ve iyonik koşulu sağlayacak reaksiyon tamponu ve magnezyum tüp içerisine eklenir (Mackay ve ark., 2002). Bir PZR reaksiyonu denatürasyon, primer bağlanma ve zincir uzama basamaklarından oluşmaktadır (Mullis ve Faloona, 1987). Çoğaltılmak istenen kalıp DNA çift zincirli haldedir ve 94-97°C gibi yüksek bir sıcaklıkta önce denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Sıcaklık tekrar 37-65°C'ye düşürülerek primerlerin kalıp DNA üzerinde kendi baz dizilerine komplementer oldukları dizileri tanıyıp bağlanmaları sağlanır (Mullis ve Faloona, 1987). Primerlerin bu bağlanma noktaları zincir sentezi için başlangıç görevi görür çünkü Taq DNA polimeraz enzimi primerleri tanıyarak kalıp DNA üzerine bağlanır ve karışımdaki dNTP' leri kullanarak şablonu kopyalamaya başlar. Bu zincir uzama aşamasında sıcaklık 72°C ye çıkarılır çünkü Taq polimeraz enzimi bu sıcaklıkta en yüksek aktivitesini göstermektedir (Mackay ve ark., 2002). Bu sıcaklık döngüleri örnekleri istenilen sıcaklıkta, istenilen süre kadar tutabilen ısı döngü cihazları (thermal cyclers) kullanılarak sağlanır. Her bir döngüde istenen DNA fragmenti iki kat artar ve bu döngüler yaklaşık olarak 25-40 kez tekrarlanır. Multipleks PZR, Nested PZR, revers transkriptaz PZR, gerçek zamanlı PZR, dijital PZR en sık kullanılan PZR çeşitleridir (Hue ve Vege, 2008).

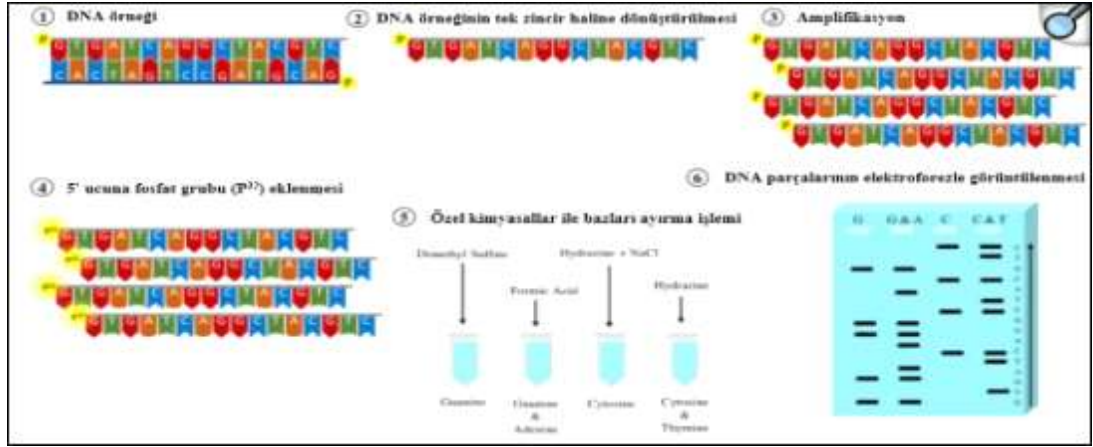
2.1.3.2. DNA dizileme yöntemleri

Son yıllarda, büyük çaplı dizileme teknolojisinin geliştirilmesi, farklı organizmaların büyük bölümlerinin veya hatta tüm genomlarının hızlı ve nispeten ucuz bir şekilde dizilenmesine olanak tanımıştır (Cahais ve ark., 2012). Bu teknolojiler, sayesinde sınırlı genetik bilginin mevcut olduğu model olmayan organizmaların dizilenmesine olanak tanımaktadır. Dizileme yöntemleri günümüzde tür düzeyinde identifikasyon için altın standart olarak kabul edilmektedir (Milosavljevic ve ark., 2021; Simar ve ark., 2021). Özellikle gen dizileme yöntemlerindeki gelişmeler bakterileri fenotipik olarak tanımlarken birçok hata yapıldığını da ortaya çıkarmıştır (Clark ve ark., 2013).

Son yirmi yıl içinde DNA dizileme teknolojileri hızla gelişmiş ve yeni nesil dizileme yöntemleri piyasaya sürülmüştür. Günümüzde geliştirilen DNA dizileme yöntemleri temel ayırt edici özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır:

Birinci nesil dizileme metotları: İlk geliştirilen ve birinci nesil dizileme yöntemi olarak adlandırılan Maxam-Gilbert (kimyasal bozunma), DNA'nın kimyasal parçalanmasına ve elektroforezle görüntülenmesine dayanır. Ardından daha yüksek basitliğe, güvenilirliğe ve daha düşük tehlike seviyesine sahip Sanger dizileme yöntemi (zincir sonlandırma) geliştirilmiştir (Mardis, 2008). 2003 yılında ilk İnsan Genomu Projesinde, floresan boya etiketli otomatik Sanger DNA dizilimi yöntemi yaygın olarak kullanıldı (Shendure ve ark., 2017). Günümüzde yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmesine rağmen daha az kimyasal kullanılan ve daha az zararlı olan Sanger tekniği, hala altın standart olarak kabul edilmektedir (Nolan ve ark., 2024).

Maxam-Gilbert Yöntemi: Maxam-Gilbert yöntemi, Maxam ve Gilbert tarafından 1970'lerin sonlarında tanıtılan kimyasal bozunmaya dayalı bir yöntemdir (Maxam ve Gilbert, 1977). İlk adım DNA örneğini tek bir zincire dönüştürmektir. DNA dizisindeki fosfat grubu alkalik fosfataz yardımıyla çıkarılır. Ardından Polinükleotid kinaz enzimi ile tek sarmallı zincirin 5' ucuna radyoaktif bir fosfat (P^{32}) grubu bağlanır (Maxam ve Gilbert, 1977). PCR ile şablon DNA'nın milyonlarca kopyası üretilir. Çoğaltılan şablon DNA, baz-spesifik kimyasallarla baz üzerinde kesilerek parçalara ayrılır. Her baz için (A, G, T ve C) dört farklı kimyasal kullanılır (Hardin, 2001). Tüm tüpler baz-spesifik kimyasal ve radyoaktif olarak etiketlenmiş şablon DNA'dan oluşur (Hardin, 2001). DNA dizilerinin okunması, reaksiyonların elektroforez yardımıyla jelin farklı şeritlerine yerleştirilmesiyle gözlemlenebilir. Negatif yüklü DNA örnekleri elektrik akımıyla jel üzerinde çalıştırılır. Bantları görmek için jel bir x-ışını filminin üzerine yerleştirilir. Radyo etiketli dizilerin olduğu kısım x-ışını filminde koyulaşır (Rubin ve Schmid, 1980). Görünür hale gelen bantların konumu, DNA örneklerinin kimyasal kesimi nedeniyle farklı olacaktır. Kısa taban uzunluğuna sahip dizi hızlı çalışacağından, dizi aşağıdan yukarıya doğru okunur (Rubin ve Schmid, 1980; Şekil 2.1.3.2.1.).



Şekil 2.1.3.2.1. Birinci nesil dizileme yöntemlerinden Maxam-Gilbert dizileme yönteminin temel prensibi (G: guanin, A: adenin, C: sitozin, T: timin, P: fosfat, P32: fosforun radyoaktif izotopu) (Eren ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

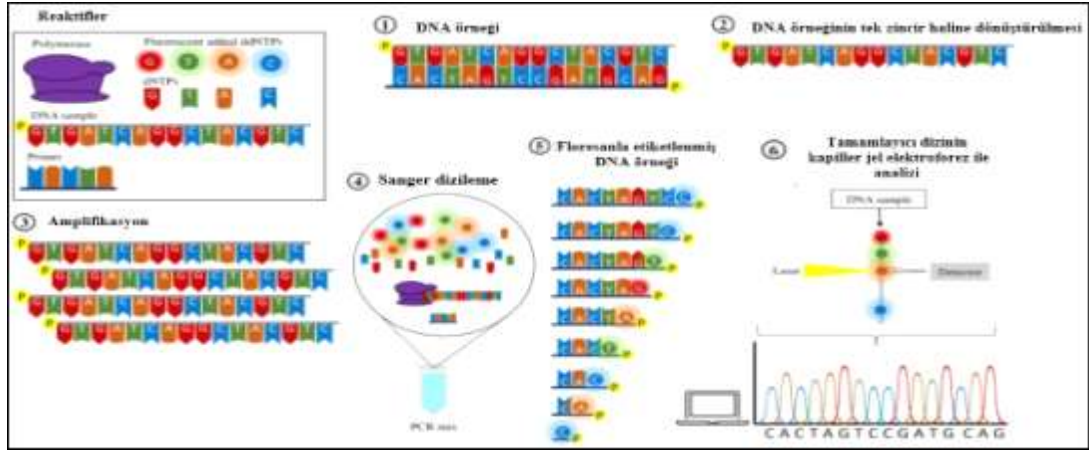
Sanger Yöntemi: Sanger (dideoksi) metodu; genom sekansının belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir (Sanger ve ark., 1977). Shotgun tekniği kullanılan bu metot zincir sonlandırma metodu olarak da adlandırılır. Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi, ilk olarak 1977'de Frederick Sanger ve ark. tarafından geliştirilip ilk olarak da 1986 yılında Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA) tarafından ticarileştirilen birinci nesil bir dizileme yöntemidir (Sanger ve ark., 1977). Sanger yöntemi ile dizilemenin optimizasyonu ve otomasyonu, belirli bir DNA parçasının birden fazla kopyasını elde etmek için PCR tekniğiyle birleştirilmesi ve ayrıca başlangıçta radyoaktif olarak işaretlenmiş olanlar yerine floresanla işaretlenmiş dideoksinükleotidlerin tanıtılması sayesinde mümkün olmuştur (Escalante ve ark., 2014). Bu sayede birçok filogenetik analizde, dizi doğrulamada yaygın kullanılan yöntem olmayı başarmış, aynı zamanda yeni otomatik yaklaşımların temelini de oluşturmuştur.

Sanger sekanslama da belirli gen bölgelerinin dizilenmesi amaçlanmıştır ve en çok tercih edilen bölge 16S rRNA gen bölgesidir (Church ve ark., 2020). Bakterilerde 16S rRNA geni, bakteriyel rRNA'yı kodlayan yaklaşık olarak ~1.500 nükleotid uzunluğunda bir DNA dizisidir. Prokaryotik ribozomlar 30S ve 50S'lik alt birimlerden oluşmaktadır ve 16S rRNA 30S'lik ribozom alt biriminde yer almaktadır (Church ve ark., 2020). Bu gen bölgesi tüm bakterilerde bulunmaktadır, hatta bazı bakteriler binlerce kopya halinde (kopyalar farklılık gösterebilir) bulundurulabilir (Gürsoy ve Otlı,

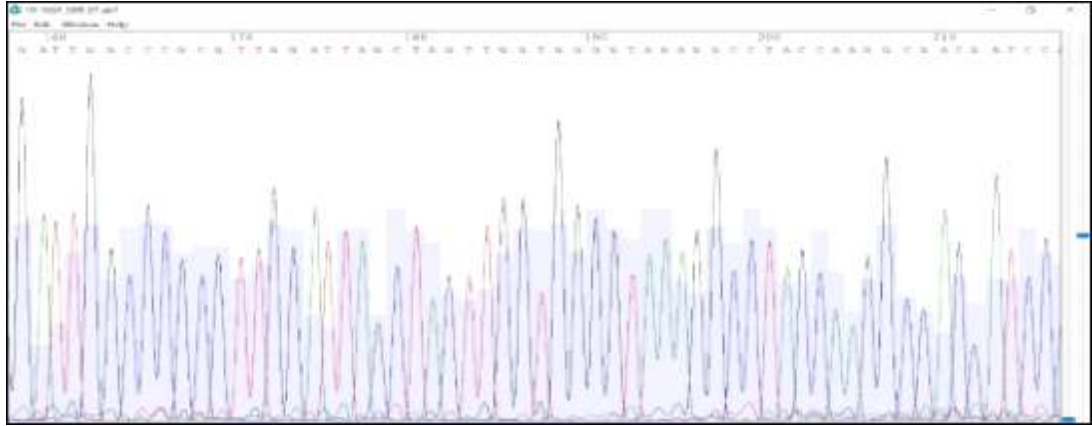
2017). Bakteriler bu genin en az bir kopyasını bulundurmakla birlikte bazı bakteriler daha kısa veya daha uzun 16S dizisine sahip olabilirler (Church ve ark., 2020). Bulundurdıkları kopya sayılarında cinsler arasında dikkate değer farklılıklar vardır ve bu cinslerin kendi içinde istikrarlı oluşunun bir göstergesidir (Bartoš ve ark., 2024). Korunmuş bir gen olan 16S rRNA geni bakteriyel türler arasında hem yüksek oranda korunmuş hem de değişken/aşırı değişken bölgelere sahiptir. Bu yüksek oranda korunmuş bölgeler ile dokuz hiperdeğişken bölge (V1–V9) bakterilerin cins ve tür düzeyinde sınıflandırılması için sıklıkla kullanılmaktadır (Jeong ve ark., 2021). Primer tasarımı bu bölgelerin önemi büyüktür; korunan bölgeleri hedeflemek üzere tasarlanan evrensel primerler olabildiği gibi, türler arasındaki farklara odaklanmış hiperdeğişken bölgeleri hedefleyen primerler tasarlanabilmektedir. 16S rRNA'nın zamanla evrimi yakın ilişkili türler arasında %5'ten %20'ye kadar sapma gösterebilirken bu oran diğer genlere ve genomun kalan kısmına oranla son derece düşüktür ve değişime olan direnme yeteneği ile geç evrimleşmesi taksonomistlerin hep dikkatini çekmeyi başarmıştır (Bartoš ve ark., 2024). Bu 16S ribozomal DNA (rDNA) tabanlı moleküler tanımlama yöntemleri aynı zamanda türe özgü korunmuş ve değişken bölgelerin varlığı sayesinde türler arasındaki evrimsel bağlantıları, benzerlikleri ve farklılıkları ortaya çıkararak filogenetik ilişkileri aydınlatmış aynı zamanda bakteri tanımlanmasında kamuya açık büyük veritabanlarının kurulmasına öncülük etmiştir (Drancourt ve ark., 2000). Moleküler yöntemlerle genomun tamamını dizilemek maaliyetli ve zordur. Bu yüzden 16S rRNA dizileri genomun tamamını dizilemeye gerek kalmadan genomu temsil edebilecek özelliklere sahip oluşu (tüm bakteri türlerinde var olma, tür içinde yüksek oranda korunup türler arasında değişkenlik gösterme, geç evrimleşme) ile genomik dizilemede tercih edilen güzel bir belirteç olmuştur. (Gürsoy ve Otlu, 2017). Bu şekilde 16S rRNA'nın potansiyelinin keşfi ile gen dizileme çalışmalarındaki ilerlemeler sayesinde tanımlanabilen ve taksonomik şemada yerini alabilen yeni tür sayılarında hızlı bir artış olmuştur (Janda ve Abbott, 2007).

Dizi analizi teknik olarak 3 basamaktan oluşmaktadır: PCR, dizileme reaksiyonu, jel elektroforezi ve değerlendirmedir (Crossley ve ark., 2020). PCR işlemi ile kısa oligonükleotid 16S primerleri kullanılarak hedef DNA çoğaltıldıktan sonra dizi analizi öncesinde dNTP'ler, polimeraz enzimi, bağlanmamış primerler ve tuzlar ortamdan

uzaklaştırılarak saflaştırma işlemi yapılır. Yöntemin temeli ampikonun döngü dizilemesinde DNA polimerazın 4 adet deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP'ler: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) yanısıra zincir sonlandırıcı nükleotidler olan dideoksinükleotid trifosfatların (ddNTP'ler: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) substrat olarak kullanabilmesine dayanır (Crossley ve ark., 2020). DNA polimerazının bu spesifik zincir sonlandırıcı nükleotidleri, iki nükleotid arasında bir fosfodiester bağının oluşumu için gerekli olan bir 3'-OH grubundan yoksundur ve bu da DNA polimerazın, ddNTP dahil edildiğinde DNA'nın uzamasını durdurmasına neden olur (Stranneheim ve Lundeberg, 2012). Ortama konulan ddNTP'lerin konsantrasyonu diğer maddelerden daha düşüktür ve dNTP'ler ile aralarında bir yarışma olur; substrat olarak dNTP'ler kullanıldığı sürece uzama devam ederken, sentezin herhangi bir noktasında yapıya dideoksi girdiğinde reaksiyon durur (Stranneheim ve Lundeberg, 2012). ddNTP'lerin her biri radyoaktif veya floresan moleküller ile işaretlenmiştir ve farklı uzunluklarda ayırt edilebilir DNA parçaları elde edilmiş olur. Zincir sonlarında floresan ile işaretli ddNTP'lerin olduğu bu DNA parçaları kapiler elektroforezde göç eder. Floresans kapilerin sonunda tespit edilir ve her biri bir DNA bazını temsil eden dört farklı renk kanalından gelen sinyal yoğunlukları florometrik bir dedektör tarafından sırayla okunarak y eksenini oluşturulurken, x eksenini zamanı temsil eder. Bu sayede kalıp DNA boyunca bir nükleotidin floresan pikini gösteren bir kromotogram verisi elde edilmiş olur (Mardis, 2008; Şekil 2.1.3.2.2.). Elde edilen dizileme verileri (Şekil 2.1.3.2.3.) FASTA formatına dönüştürülür ve BLASTn algoritması kullanılarak GenBank® (NCBI-National Center for Biotechnology Information) veritabanına yüklenir (Şekil 2.1.3.2.4.). Sorgu yapılacak olan diziler veritabanında bilinen diziler ile hizalanır ve dizilerin birbirlerine olan benzerlikleri yüzde olarak ifade edilir. En yüksek benzerlik yüzdesi en iyi eşleşmeye aittir ve bu benzerlik yüzdeleri en yüksekten düşüğe doğru sıralanır (Şekil 2.1.3.2.5.). Sonuçlar bu yüzdelerle yorumlanır.



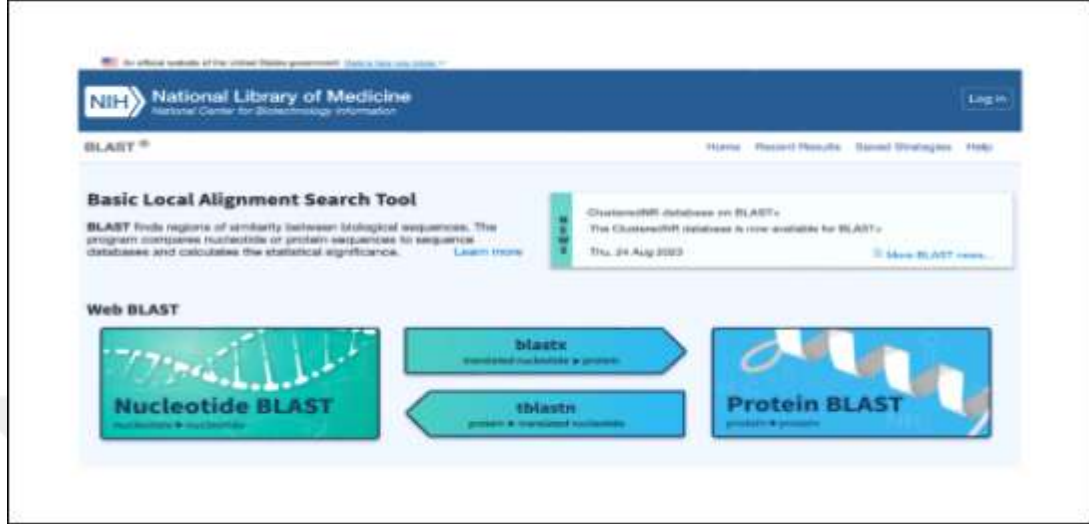
Şekil 2.1.3.2.2. Birinci nesil dizileme yöntemlerinden Sanger yönteminin temel prensibi (G: guanin, A: adenin, C: sitozin, T: timin, P: fosfat, ddNTP'ler: dideoksinükleozid trifosfat, dNTP'ler: deoksiribonükleotid trifosfat, PCR: polimeraz zincir reaksiyonu) (Eren ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)



Şekil 2.1.3.2.3. Dizi analiz sonucunda elde edilen elektroferogram verileri

Elektroferogram değerlendirilirken primer bağlanmasından dolayı ilk 15-40 bp'de düşük kaliteli diziler görülebilir iken, daha uzun segmentlerde tek baz çifti farklılıklarını ayırt edememe görülebilir ve bu dizi kısımlarının hataları önlemek adına kırılmaları ve düzenlenmesi gerekmektedir (Crossley ve ark., 2020). Değerlendirmede aynı zamanda 'Arka plan gürültüsü' olarak adlandırılan hedef diziden daha aşağıda ikincil tepelikler görünebilir. Rekabet eden bu tepenin yüksekliği ana dizi tepe noktasının %20'sinden az olduğunda kabul edilebilir, aksi takdirde düşük

kaliteli, güvenilir olmayan bir dizi olarak kabul edilir ve değerlendirmeye alınmamalıdır (Crossley ve ark., 2020).



Şekil 2.1.3.2.4. Dizileme verilerinin FASTA formatına dönüştürüldükten sonra NCBI veritabanına (Nucleotide BLAST) yüklenmesi

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy
Sequences producing significant alignments			
Download Select columns Show 100			
select all 100 sequences selected			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain W1 chromosomal, complete genome	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain W51 chromosomal, complete genome	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain X-165 chromosomal, partial sequence	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain W52 chromosomal, complete genome	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain CHM277.06.165 chromosomal, partial sequence	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain W17-3 chromosomal, complete genome	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain NG20RMV chromosomal, complete genome	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> strain W58-2 chromosomal, complete genome	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella</i> sp. strain V-12 16S rRNA gene, partial sequence	<i>Moraxella</i> sp.	751	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> JCM 3326 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000
☒ <i>Moraxella anthonomus</i> JCM 3326 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Moraxella</i> sp.	750	1000

Şekil 2.1.3.2.5. Dizilerin birbirlerine olan benzerliklerinin yüzde olarak ifade edilmesi ve benzerlik yüzdelere göre en yüksekten düşüğe doğru sıralanması

Metagenomik dizilemede önerilen 16S rRNA gen bölgesinin tamamının veya tamamına yakın bir kısmının dizilenmesi iken (ideal:1.300-1.500 bp); değişken 5' bölgesini içine alan minimum 500–525 bp'lik bölgeler bazı bakterilerin tanımlanması

için yeterli olabilmektedir (Janda ve Abbott, 2007). Çalışmalarda genellikle ilk ~500 bp hedeflenerek V1-V3 bölgelerinin analizi yapılmaktadır (Church ve ark., 2020). Bu bölgelerin içerdiği değişken bölgeler bazı suşlarda tür ayrımı yapmaya yetmeyebilir ve V1-V6 (~1.060 bp, V5 ve V6 değişken bölgelerini kapsar) gibi daha uzun bir 16S dizisi bölümünün sekanslanması gerekebilir (Church ve ark., 2020). Patojenleri tanımlamada 16S DNA hedef dizilemesiyle ilgili kullanılacak primer çiftleri, yorumlayıcı kriterler gibi yol gösterici bilgiler Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kılavuzunda MM-18-A2'de “*DNA Hedef Dizilemesi ile Bakteri ve Mantarların Tanımlanması için Yorumlayıcı Kriterler; Onaylı Kılavuz*” yer almaktadır (Janet ve Audrey, 2018). Bu 16S rRNA geninin neredeyse aynı dizilerini paylaşan yakın ilişkili türler bulunabilmekte ve bu durumlarda türe özgü diğer genlerin dizilenmesi gerekebilmektedir (Mohkam ve ark., 2016; Starostin ve ark., 2015). Örneğin 16S rDNA dizilemesi ile ayırım yapılamayan *Burkholderia pseudomallei* ile *Burkholderia thailandensis*'i ayırt etmede *groEL* geninin yararlı olduğu çalışmalarla gösterilmiş; *Staphylococcus* türlerini ayırt etmek için de alternatif olarak *groEL* ve *tuf* dizilemeleri önerilmiştir (Woo ve ark., 2008).

16S rRNA dizilimi; DNA ekstraksiyonu, PCR amplifikasyonu, PCR ürünlerinin saflaştırılması, DNA dizilimi ve dizi düzenleme gibi birçok aşamadan oluşmakta ve kolaylaştırıcı ticari kitler mevcut olsa bile iş akışındaki manuel adımların çokluğu, aşamalarda birden fazla otomatize cihaz gerekliliği gibi nedenlerle rutine tam olarak entegre olamamıştır (Woo ve ark., 2008). Söz konusu 16S rRNA dizilimi her ne kadar pratik bir iş akışına sahip olmasa da tanımlanamayan ve kültürde üretilmeyen bakterileri tanımlamada sağladığı faydalar sayesinde kullanımı giderek artmaktadır (Maeda ve ark., 1987; Relman ve ark., 1990). Özellikle kültür negatif bakteriyel enfeksiyonlar 16S rDNA dizilemesinin son derece faydalı olduğu bir gruptur (Woo ve ark., 2008). Örneğin kültürde üretmenin zor olduğu *Tropheryma whippelli*'nin etken olduğu Whipple hastalığı başlangıçta etiyolojisi bilinmeyen sistemik bir hastalık olarak değerlendirilirken; gen dizilimiyle *Tropheryma whippe*'nin filogenetik pozisyonu tanımlanmış ve hastalığı büyük ölçüde aydınlatarak tedavisine yön vermiştir (Woo ve ark., 2008). Yine benzer başarılar *Bartonella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* cinsi bakterilerde yaşanılmış olup, kültür negatif endokarditlerde de

yöntemin yararlılığı doğrulanmıştır (Maeda ve ark., 1987; Relman ve ark., 1990; Wilck ve ark., 2001).

Rutinde karşılaşılan ve geleneksel yöntemlerle tanı konulabilen suşlardan çok, tanımlanamayan, patojenitesi anlaşılamamış, kültürde üretilemeyen, ticari sistemlere göre yalnızca "düşük olasılık/ayırım" veya "kabul edilebilir" olarak tanımlanan bakteri suşlarını tespit etmek için gen dizilemesi yapmak rutin iş akışı için daha avantajlıdır. Çünkü rutinde geleneksel yöntemlerle tanı konulabilen suşlar için dizileme yapmak pratik olmamakla birlikte zaman alıcı ve maliyetli olacaktır.

Sanger dizileme yönteminde tehlikeli kimyasalların ve radyoaktif maddelerin kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle daha az toksik bir yöntemdir (Escalante ve ark., 2014). DNA dizileme yöntemleri arasında en yaygın kullanılan halen otomatik Sanger yöntemidir (Nolan ve ark., 2024).

Son yıllarda daha yüksek miktarlarda DNA molekülünün dizilenmesi ile daha fazla verim elde edilen yeni ikinci ve üçüncü nesil dizileme teknolojileri geliştirilmiştir. Ancak bu yeni nesil dizileme yöntemleri yüksek maliyet ve alternatif teknolojilerin bulunabilirliği nedeniyle rutin klinik mikrobiyoloji uygulamalarına tam olarak girememiş ve daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır (Fairfax ve ark., 2010).

İkinci nesil dizileme metotları: İkinci nesil dizileme teknolojileri, tüm genomun hızlı bir şekilde dizilenmesine olanak tanımaktadır. 2. nesil dizilemenin temel özellikleri, paralel olarak birçok klonal şablonun kullanılması ve enzimatik replikasyon kullanılarak bir dizi belirleme sürecidir (Metzker, 2010). İkinci nesil yeni dizileme teknikleri olarak günümüzde, farklı ticari platformlar mevcuttur. Bu yöntemde öncelikle klonal DNA şablonları oluşturulur ve hepsi mikroakışkanlar kullanılarak paralel olarak dizilenir (Metzker, 2010). İkinci nesil dizileme teknolojilerinde, hibridizasyonla dizileme ve sentezle dizileme olmak üzere iki farklı metot kullanılabilmektedir (Slatko ve ark., 2018). Hibridizasyonla dizileme, DNA dizisini belirlemek için bir dizi örtüşen oligonükleotid dizisinin bir araya getirildiği bir yaklaşımdır (Church, 2006). Sentezle dizileme teknolojisinde ise DNA dizisini belirlemek için daha sonra tanımlanan floresan etiketli nükleotidleri dahil etmek için bir polimeraz veya ligaz enzimi kullanır (Hanna ve ark., 2000). Sentezle dizilemede dideoksi sonlandırıcılar olmadan, tekrarlanan sentez döngüleri, görüntüleme ve

büyüyen zincire ek nükleotidler ekleme yöntemleriyle birlikte Sanger dizilemesinin daha da geliştirilmiş halidir.

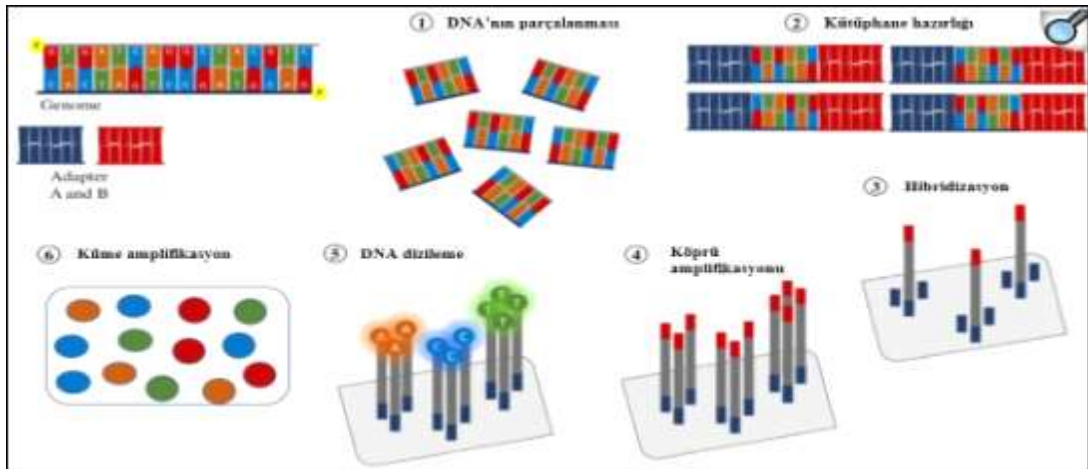
Tüm ikinci nesil dizileme teknolojilerinde, dizi analizinden önce her DNA şablonunun yeterince büyük sayıda kopyasını üretmek için amplifikasyon adımı gereklidir. Dizilemeden önce DNA parçalarını çoğaltmak için yaygın olarak emülsiyon PCR, köprü çoğaltımı ve DNA nanoball üretimi olmak üzere üç farklı teknik kullanılır (Slatko ve ark., 2018). İkinci nesil dizileme teknolojileri, kullandıkları DNA çoğaltma tekniklerine göre kategorize edilebilir. İkinci nesil dizileme reaksiyonları; dizileme reaksiyonları, baz ekleme ve görüntüleme döngüleriyle gerçekleştirilir. Diziyi belirlemek için ardışık görüntüler üst üste bindirilir ve tüm şablon moleküllerinin pozisyonlarında bazlar çağrılır (Metzker, 2010). Baz eklemeleri, DNA polimerizasyonu veya ligasyonu kullanılarak yapılabilir. Görüntüleme ise kemilüminesans (Roche FLX cihazında kullanılan Pirosekanslama kimyası), floresans (Illumina ve LifeTechnologies 5500'de) veya pH değişiklikleriyle (IonTorrent cihazında) yapılır (Metzker, 2010; Tablo 2.1.3.2.1.).

Roche 454 Yöntemi: Günümüzde üretimi durdurulmuş olan bu yöntemin temel mekanizması emülsiyon PCR adımı ve bunu izleyen pirofosfat tespiti, Roche/454 pirosekanslamanın temelini oluşturmaktadır (Harrington ve ark., 2013). Nükleotid katılımının bir yan ürünü olan pirofosfatın tespiti ile belirli bir bazın büyüyen bir DNA zincirine katılıp katılmadığı saptanabilir. Bu metotta dizilenmesi gereken parçalar boyuta göre seçilir (400-600 bp) ve ardından kütüphane inşası için gerekli adaptörleri bağlanır. Kütüphane inşası prosedürü, numunedeki her DNA parçasının PCR amplifikasyonuna dayanır (Harrington ve ark., 2013). Bunun için 400–700 bp uzunluğundaki ayrı DNA parçaları adaptörlere bağlanır ve ayrı bir emülsiyon "boncuk" (emPCR) reaksiyonunda PCR ile çoğaltılır. Amplifikasyon reaksiyonu, bir nanosfer veya boncuk biçiminde tek bir DNA molekülü, yüzeyine bağlı oligonükleotidler veya proplar, bir polimeraz ve diğer temel elementler (dNTP'ler, tampon, MgCl₂, primerler) içeren bir kuyuda gerçekleşir (Harrington ve ark., 2013).

Illumina Yöntemi: Illumina dizilemesi, her iki ucuna uygun adaptörler bağlanmış DNA moleküllerinin (yaklaşık 500 bp) bağlanmış bir adaptöre tamamlayıcı oligonükleotid dizileri içeren katı bir destek (cam slayt) üzerinde tekrarlanan amplifikasyon sentez reaksiyonları için substrat olarak kullanıldığı "köprü amplifikasyonu" olarak bilinen

bir tekniğe dayanmaktadır (Hanna ve ark., 2000). Sentez reaksiyonları sırasında, her biri farklı bir floresan etikete sahip dört baza karşılık gelen tescilli modifiye nükleotidler dahil edilir ve daha sonra tespit edilir. Nükleotidler ayrıca her reaksiyon için sentezin sonlandırıcıları olarak görev yapar ve bir sonraki sentez turu için tespitten sonra bloke edilmezler. Tepkimeler 300 veya daha fazla tur boyunca tekrarlanır (Hanna ve ark., 2000; Carpenter ve ark., 2023; Şekil 2.1.3.2.6.).

IonTorrent sistemi: DNA amplifikasyonu için emülsiyon PCR kullanan platformlar ilk olarak 2010 yılında piyasaya sürülmüştür (Eren ve ark., 2022). Ion Torrent platformu çok kuyulu bir plakadan oluşan bir çip şeklindedir. Ion Torrent teknolojisi, nükleotit dizisini doğrudan yarı iletken bir çip üzerinde dijital bilgiye dönüştürür (Harvey ve ark., 2019). Bir DNA sentez reaksiyonunda, uzayan bir DNA zincirindeki tamamlayıcı bazının karşısına doğru bir nükleotit eklendiğinde, bir hidrojen iyonu salınır. Bu, bir pH metre gibi bir iyon sensörü tarafından voltaj değişimi olarak kaydedilebilen çözeltinin pH'ını değiştirir. Hiçbir nükleotit eklenmezse, voltaj yükselmesi meydana gelmez (Eren ve ark., 2022).

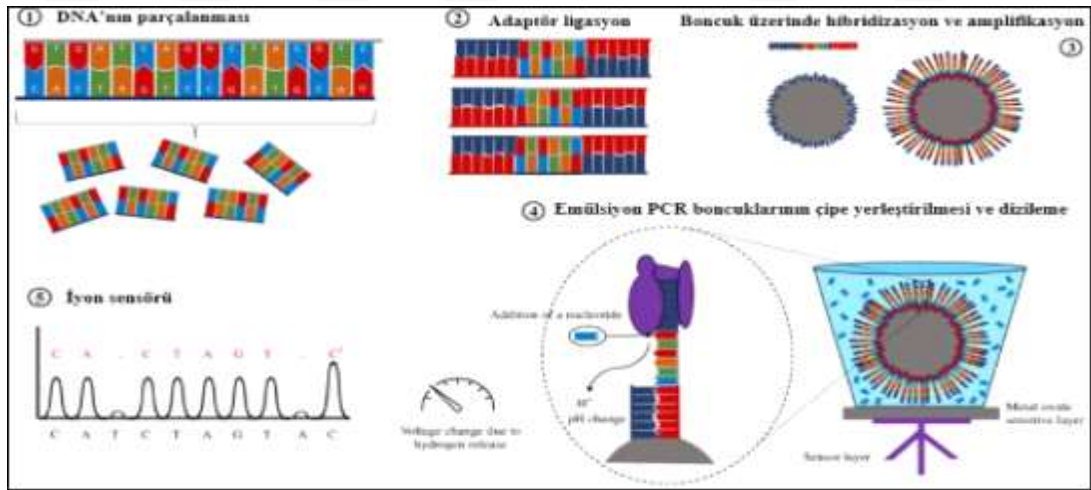


Şekil 2.1.3.2.6. İkinci nesil dizileme yöntemlerinden Illumina yönteminin temel prensibi (G: guanin, A: adenin, C: sitozin, T: timin) (Eren ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Ion Torrent dizileme reaksiyonları, kimyasal bilgileri dizileme bilgisine dönüştüren milyonlarca piksel içeren bir yarı iletken çipi kaplayan milyonlarca kuyuda meydana gelir (Harvey ve ark., 2019). İşlemi başlatmak için DNA, adaptörlere bağlanan 200-

1500 baz parçasına parçalanır. DNA parçaları, boncuklar ve adaptörler üzerindeki tamamlayıcı diziler tarafından bir boncuğa tutturulur ve daha sonra emülsiyon PCR (emPCR) ile boncuk üzerinde çoğaltılır (Eren ve ark., 2022). Bu işlem, milyonlarca boncuğun her birinin bir DNA dizisinin birden fazla kopyasına sahip olmasını sağlar. Her biri yaklaşık 50.000 çoğaltılmış DNA parçası içeren 5 mikron boncuklar kullanır (Eren ve ark., 2022). Boncuklar daha sonra kuyuları içeren çip boyunca akıtılır, böylece her bir kuyuya yalnızca bir boncuk girebilir. Dizileme reaktifleri daha sonra kuyular boyunca akıtıldığında, uygun nükleotid dahil edildiğinde, bir hidrojen iyonu verilir ve sinyal kaydedilir (Şekil 2.1.3.2.7.).

Üçüncü nesil dizileme metotları: DNA dizileme yöntemlerinin kullanımının artmasıyla birlikte yeni teknolojik gelişmelere ihtiyaç duyulmuştur. Birinci ve ikinci nesil dizileme yöntemleri DNA dizilemesi için devrim niteliğinde olsa da zaman, maliyet ve hata oranı gibi dezavantajları nedeni ile birçok açıdan iyileştirilmeye ihtiyaç duyulmuştur. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda daha uzun okuma uzunluğuna sahip, düşük maliyetli ve daha hızlı dizilemeye sahip üçüncü nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiştir (Mardis, 2008).

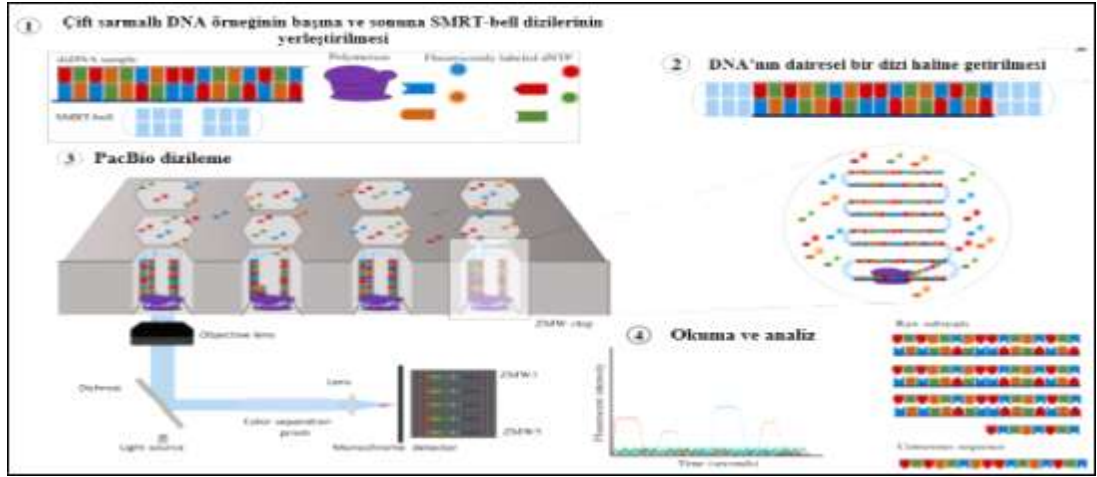


Şekil 2.1.3.2.7. İkinci nesil dizileme yöntemlerinden Ion Torrent yönteminin temel prensibi ve iyon raporlayıcısı (G: guanin, A: adenin, C: sitozin, T: timin) (Eren ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

İkinci nesil dizileme yöntemlerinin aksine, üçüncü nesil dizileme yöntemleri uzun DNA (ve RNA) moleküllerini dizilemeyi amaçlar. Bu yöntemlerin en önemli avantajı

amplifikasyona ihtiyaç duymaması ve DNA'yı parçalamadan gerçek zamanlı analize izin vermesidir (Mardis, 2008). Üçüncü nesil DNA dizileme yöntemleri Pacific Bioscience ve Oxford Nanopore Technology olmak üzere iki teknoloji mevcuttur.

Pacific Bioscience Yöntemi: Pacific Biosciences'ın 2010 yılı sonunda piyasaya sürülen PacBio yöntemi, tek molekül gerçek zamanlı (SMRT dizileme) tabanlı bir yöntem olarak adlandırılmaktadır (Bruijns ve ark., 2018). Bu yöntem 30-50 kb'ye kadar veya daha uzun parçaların dizilenmesine olanak sağlar (Slatko ve ark., 2018). DNA sentezi için gerekli bileşenlerden yararlanarak uzun boyutlu DNA dizilerini okumak için kullanılan bir yöntemdir. Yöntem, çift sarmallı bir DNA örneğinin başına ve sonuna “SMRTbell” olarak bilinen saç tokası şeklindeki dizilerin yerleştirilmesini içerir (Garrido ve ark., 2017). Bu diziler sayesinde DNA dairesel bir dizi haline gelir ve uzun tekrarlı okumalarda baz hataları en aza indirilir. SMRTbell gömülü DNA, sıfır modlu dalga kılavuzları (ZMW) teknolojisiyle yapılmış bir çipin tabanına immobilize edilmiş polimerazlara bağlanır. DNA polimerazı DNA'nın etrafına sararak dizileyen geleneksel DNA dizileme tekniklerinin aksine, bu teknik polimerazı kuyunun tabanına immobilize ederek DNA'yı diziler (Garrido ve ark., 2017). Çipte binlerce pikolitre ZMW kuyusu vardır ve her kuyu sadece 1 polimeraz içerir. Bu nedenle, tek bir DNA molekülü sadece 1 kuyuya bağlanır ve gerçek zamanlı olarak analiz edilebilir. Floresanla işaretlenmiş dNTP DNA'ya dahil edildikçe, her baz için farklı renkli bir parıltı belirir. Sinyal, polimeraz tarafından nükleotid bağlı floresan boya pirofosfatının kesilmesiyle sona erer. Görüntüleme, DNA'ya eklenen her baz için anında gerçekleşir. ZMW'nin dibinde yeşil ve kırmızı lazerlere sahip bir optik sistem, radyasyonları milisaniyeler içinde sürekli olarak gözlemler. Bu işlem diğer kuyularda aynı anda ve paralel olarak gerçekleşir (Liu ve ark., 2012). ZMW, ışığın üssel olarak bozulmasını sağlar. Sonuç olarak, floresan ışık sadece kuyunun dibini aydınlatır ve komşu kuyulara yayılmaz (Şekil 2.1.3.2.8.)



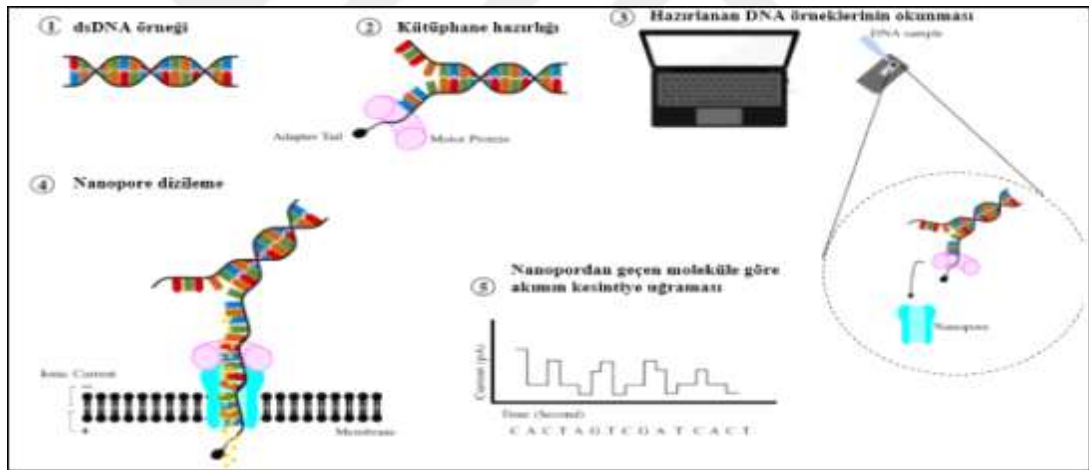
Şekil 2.1.3.2.8. Üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden Pacific Bioscience Yönteminin temel prensibi (dsDNA: çift sarmallı DNA, SMRT: tek molekül gerçek zamanlı, ZMW: sıfır modlu dalga kılavuzu, G: guanin, A: adenin, C: sitozin, T: timin, pA: pikoamper) (Eren ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Bu yöntemin en önemli avantajı DNA dizilemesinin yanı sıra, DNA dizisindeki epigenetik modifikasyonları ve yapısal değişiklikleri de tespit edebilmesidir (Liu ve ark., 2012). Ancak bu yöntem hızlı sıralama yaparken, yüksek hata oranına sahiptir. Bu sorunun kontrolü aynı dizinin birden fazla okunması ve benzer şablonların değerlendirilmesiyle giderilmeye çalışılmıştır (Liu ve ark., 2012).

Oxford Nanopore Teknolojisi Yöntemi: Bu teknik, enzim, amplifikasyon veya floresanla etiketlenmiş nükleotidlerin kullanımını içermediğinden teorik olarak çok daha düşük bir hata oranına sahiptir (Liu ve ark., 2012). Bu yöntem için, membrana elektrik akımı (100 pA-100 mV) ile gömülmüş yapay bir nanopor gerekir (Liu ve ark., 2012). Bu nanopor, *Staphylococcus aureus*'tan türetilen 33 kD'lik bir protein olan alfa-hemolizin (α HL) tarafından oluşturulur (Dönmez ve ark., 2015). DNA dizilenmeden önce, poliA kuyruk içeren adaptör dizisinin DNA'ya sokulması gerekir. Adaptör dizisi bir motor protein tarafından tanınır ve nanopora taşınır. Nanopor adaptör dizisini tespit ettiğinde, DNA tek bir iplikçik olarak nanopordan geçmeye başlar. DNA negatif yüklü olduğundan, DNA nanopordan zardan geçen iyonik akımla hareket eder (Eren ve ark., 2022; Şekil 2.1.3.2.9.). Genetik materyali oluşturan bazların her biri iyonik akımda farklı bir kesinti yaratacaktır. Nanopordan geçen molekülün akımın kesintisine göre karakterizasyonu algoritma tarafından gerçekleştirilir. Diğer yöntemlere göre avantajı

kısa okuma süreleridir (Mohammadi ve Bavi, 2022). Bu yöntemde analiz, floresan, pH veya renk gibi ikincil bir sinyal olmadan gerçekleşir. Polimeraz gibi bir enzime ihtiyaç duymadığı için yüksek sıcaklıklara maruz kalmadan dizileme yapabilir. Ayrıca, amplifikasyon gerektirmediği için uzun bir örnek hazırlama adımı yoktur. En önemli dezavantajı, biyoenformatik algoritmasının elde edilen verileri işlemekte zorluk çekmesidir (Mohammadi ve Bavi, 2022). Dizileme yöntemleri ve temel özellikleri Tablo 2.1.3.2.1.'de özetlenmiştir.

Moleküler yöntemler geleneksel yöntemlere göre son derece özgül ve duyarlı olmasına rağmen pahalı ekipman, eğitilmiş personel ve kontaminasyonları engellemek amacıyla özel laboratuvarlar gerektirdiğinden geleneksel yöntemlerin yerini tamamen almayı başaramamıştır (Buszewski ve ark., 2017). Tüm bu nedenlerle bakteri tanımlamasında uygun yöntem arayışları devam etmekte, halen büyük ölçekli klinik uygulamalar için daha basit işlemlerle bakteri tespit maliyetinin azaltılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.1.3.2.9. Üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden Oxford Nanopore teknolojisi yöntemi (dsDNA: çift sarmallı DNA, SMRT: tek molekül gerçek zamanlı, ZMW: sıfır modlu dalga kılavuzu, G: guanin, A: adenin, C: sitozin, T: timin, pA: pikoamper) (Eren ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Tablo 2.1.3.2.1. Dizileme yöntemleri ve özellikleri

Nesil	Ticari Platform	Kütüphane Hazırlığı	DNA Amplifikasyon Süreci	Dizileme Mekanizması	Ortalama Okuma Uzunluğu	Tespit Yöntemi	Hata Oranı
1	Maxam-Gilbert	Yok	PCR	Restriksiyon parçalanması ve baz spesifik kimyasal bölünme	100 baz çiftinden az	Radyoaktivite	Veri yok
1	Sanger	Yok	PCR	DNA primerleri ve DNA polimeraz kullanılarak zincir sonlandırma	400~900 baz çifti	Radyoaktivite floresans	%0,1
2	Roche 454	Var	Emulsion PCR	Pirosekanslama Nükleotid katılımı sırasında, dNTP'ler şablon DNA ile eşleştiklerinde, pirofosfat grubu serbest bırakılır ve pirofosfat (Ppi) salınır ve Ppi salınımı ölçülür, katılan nükleotid miktarına eşittir.	700 baz çifti	Gerçek zamanlı kemilüminesans	%1 (Genellikle okuma uzunluklarından kaynaklı hatalar)
2	Ion Torrent	Var	Emulsion PCR	İyon yarı iletken dizilemesi DNA sentezi sırasında hidrojen iyonlarının serbest bırakılmasından kaynaklanan pH'daki değişimi hesaplayarak ölçer	200~ baz çifti	Yarı iletken cihazda pH ölçümü	%1,7 (Genellikle okuma uzunluklarından kaynaklı hatalar)
2	Illumina • MiniSeq • MiSeq • NextSeq • NovaSeq • HiSeq	Var	Bridge PCR	Sentez yoluyla dizileme Illumina sistemi, dört nükleotidin de DNA polimeraz ile birlikte akış hücresi kanallarına eş zamanlı olarak eklendiği bir dizileme-sentez yaklaşımını kullanır.	2-600 baz çifti	Floresan görüntüleme	%0,26-%0,76 (Genellikle okuma uzunluklarından kaynaklı hatalar)
3	Pacific Biosciences	Var	PCR'ye gerek yok	Gerçek zamanlı tek molekül dizileme teknolojisi Zero-mode waveguide (ZMW) adı verilen nano yapıdaki boşluklar içerisinde DNA polimerazın aktivitesi gerçek zamanlı olarak izlenmektedir	800 baz çifti	Gerçek zamanlı floresan görüntüleme	%12,9 (Genellikle okuma hataları)
3	Oxford Nanopore • MinION • GridION • PromethION	Var	PCR'ye gerek yok	Nanopor teknolojisi Membran üzerine sabitlenmiş olan nano boyuttaki porlar içerisinden moleküllerin geçişi sırasında iyonik akımın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.	10kb~880 kb	Gerçek zamanlı floresan görüntüleme	%10,5 (Genellikle okuma hataları)

2.1.4. Kütle spektrometrisi

Kütle spektrometrisi veya diğer adıyla Matr4iks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon süresi (MALDI-TOF-MS) sistemi, mikroorganizmaların peptid kütle parmak izlerini oluşturarak tanımlama yapmaktadır (Wieser ve ark., 2012). Kütle spektrometrisinin bakterileri tanımlamak için kullanılabileceğini gösteren ilk çalışma 1975 yılında Anhalt ve Fenselau tarafından gerçekleştirilmiştir (Anhalt ve Fenselau, 1975). Ancak rutinde kullanılacak MALDI-TOF-MS (MS) cihazlarının üretilip geliştirilerek ticari olarak piyasaya sunulması zaman almıştır. Kütle spektrometrisi yöntemi ile her mikroorganizma için özgün bir kütle spektrumu elde edilmektedir (Wieser ve ark., 2012). Protokollerinin basit performansı, sonuçların hızlı bir şekilde değerlendirilebilmesi ve nispeten uygun maliyetli oluşu gibi avantajlara sahip olması ile klinik laboratuvarların tanı algoritmasına hızlı bir şekilde girmeyi başarmıştır.

Bu yöntem, geleneksel fenotipik ve moleküler tanımlama yöntemlerine göre insan patojenlerinin daha kolay ve hızlı teşhisine olanak tanımaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda bakteri türlerinin tanımlanmasında diğer yöntemlerle yüksek uyum oranları görülmesine rağmen benzer kütle spektrumuna sahip bazı bakterileri de hatalı tanımladığı bilinmektedir (Costa ve ark., 2022). Örneğin; *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex, *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* complex, *Burkholderia cepacia* complex ve *Streptococcus mitis* group gibi türleri tanımlama da hatalı sonuçlarla karşılaşılabilmiştir (Chen ve ark., 2021). Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen nadir görülen ve/veya özellikle yavaş ve zor üreyen etkenlerin tanımlanmasında sorunlar yaşanabilmektedir. Yaygın olmayan veya tanımlanması zor bakteri suşlarının tanımlanmasında KS'nin performansı net olarak bilinmemektedir. Öte yandan KS'nin elde ettiği kütle spektrumlarına ait grafiksel görüntüleri sistemin veri tabanındaki referans mikroorganizmalar ile karşılaştırarak cins ve tür bazında tanımlama yapar (Messeur ve ark., 2018). Bu nedenle sistemin sahip olduğu veritabanındaki mikrobiyal türlerin kapsamı, başarılı tanımlama için en kritik adımdır ve referans kütüphanesinde bulunan veriler sürekli olarak güncellenmekte, yeni türler kütüphaneye eklenmektedir. Kullanılmakta olan ticari sistemlerden biri olan VITEK® MS V3.2 in vitro tanı (IVD) veri tabanında onaylı 1095 bakteri, 221 mantar olmak üzere toplam 1316 mikroorganizma türü bulunmaktadır ve 1316 türü kapsayan 15.556

suşa karşılık gelen 47.204 spektral veri bulunmaktadır. Ayrıca araştırma amaçlı (RUO) veribanında ise 1445 mikroorganizma yer almaktadır (Grohs ve ark., 2023).

Veritabanına eklenen yeni izolatların doğruluğunu teyit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Rutin kullanıma başarıyla girmiş olsa da kütle spektrometrisinin klinik tanıda uygulanmasını gözden geçiren, güvenilirliğini araştıran çok az sayıda çalışma mevcuttur (Lau ve ark., 2014; Ye ve ark., 2018).

Cihaza genel bakış: Kütle spektrometrisi analiz örneğinin kolaylıkla hareket edebilen gaz fazındaki iyonlara dönüştürülüp elektromanyetik alanlar oluşturularak iyonları kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayırma işlemini yapabilen cihazlardır (Griffiths, 2008). Kütle spektrometrisi cihazları temelde bir iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü ve bir detektörden oluşur. Cihazlar kullanılan parçalara göre isimlendirilir.

(i) İyonizasyon kaynağı: Cihazlarda iyon kaynağı olarak electrospray ionization (EI), atmospheric pressure ionization (API), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ve Matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon (MALDI) kullanılabilir (Singhal ve ark., 2015).

(ii) Kütle analizörü: İyonlaştırıcı kaynaktan elde edilen iyonların ayrılmasını sağlayan cihaz kısmıdır. Yüklü iyonları ayırma şekline göre gruplandırılırlar. Kütle analizörü olarak quadrupol (Q), ion trap (IT), Time-Of-Flight (TOF), Fourier transformation ion cyclotron resonance (FT-ICR) kullanılabilir (Singhal ve ark., 2015).

(iii) Detektör bölümü: İyonların dedektöre ulaşma zamanına göre kütle spektrumlarının belirlendiği kısımdır.

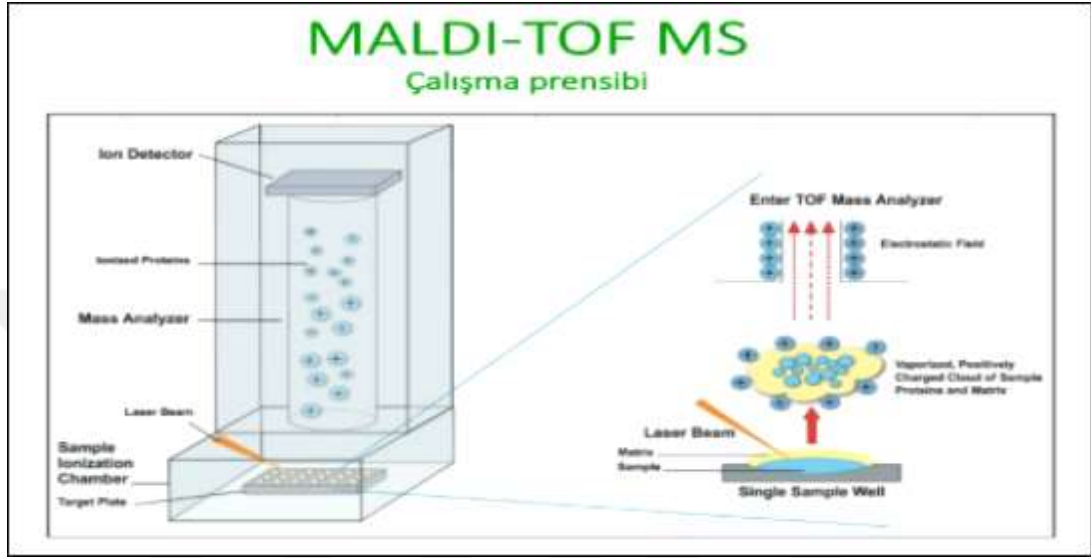
Analizör ve dedektör vakumlu ortamda bulunmalı; iyonların hava molekülleriyle çarpışması engellenerek etkili bir ayırma işlemi yapılabilir. Çeşitli iyonlaştırıcı kaynaklar arasında sadece ESI ve MALDI proteinlerle çalışmaya uygundur (Özel ve ark., 2013). ESI ile iyonlar atmosferik basınç altında oluşturulurken, MALDI'de atmosferik basınç veya vakum altında oluşturulabilir (Özel ve ark., 2014).

Lazer desorpsiyon sistemleri çeşitli kütle analizörleri ile birlikte kombine edilebilir. Kütle spektrometri cihazında iyon kaynağı olarak Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI), kütle analizörü olarak Time-Of-Flight (TOF) kullanılmıştır (Özel ve ark., 2014).

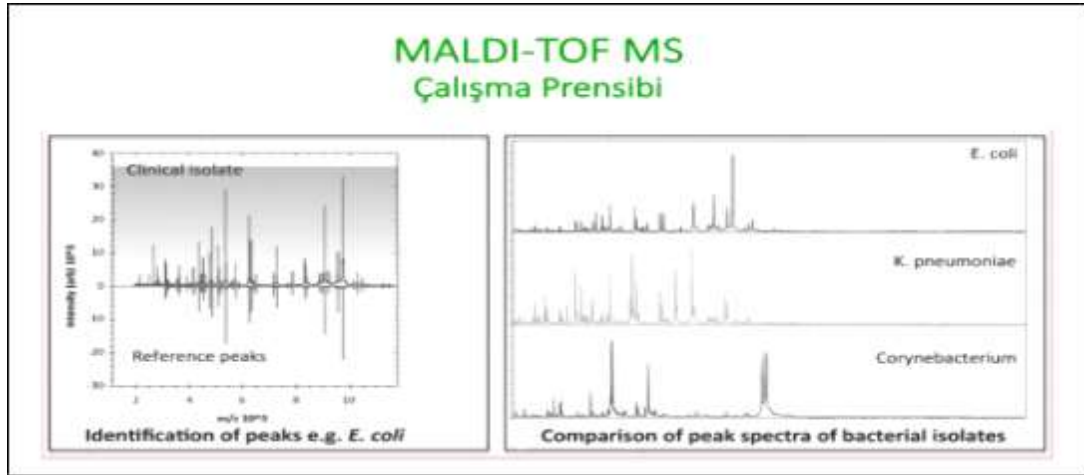
Çalışma prensibi: MALDI iyonlaştırma tekniğinde ultraviyole ışınlarının absorpsiyonunu artırarak iyonlaştırmayı kolaylaştırabilen bir matriks kullanılır (Çırak, 2010). Analiz numunesi ve matriks uygun bir çözücünde çözülerek karıştırılır ve örnek yükleme plakalarına aktarılır. Yeterli kütle spektrumları elde edebilmek için bu aşamada plak üzerinde yaklaşık 5×10^5 hücre olmalıdır (Kostrzewa ve ark., 2019). Sinapinik asit ve α -siyano-4-hidroksinamik asit sırasıyla, protein ve peptid analizi için en çok kullanılan matrikslerdir (Liao ve ark., 2023). Çözücünün uçması için bir süre beklenir ve kristalize hale gelmiş matriks proteinlerinin arasına gömülü peptidler elde edilmiş olur. Vakum altında genellikle nitrojen kaynaklı UV lazeri ile uyarılar (pulse) yapılır. Lazer atışı yapılan numuneler matrixinde yardımıyla kısa süre içerisinde gaz fazda iyon haline geçerler. Matrix aynı zamanda doğrudan lazer ışınına maruz kalan proteinlerin yapısal bütünlüklerini kaybederek parçalara ayrılmasını da engeller (Angeletti, 2017). Serbestleşen iyonlar elektromanyetik alanda hızlandırıldıktan sonra uçuş tüpüne geçerler. Uçuş tüpü 1-2 m uzunluğunda bir tüptür ve dedektöre bağlıdır. Elektromanyetik alanlar iyon hareketini iyonun kütlesiyle ters; iyonun yüküyle de doğru orantılı olarak etkiler. Serbestleşen iyonların uçuş tüpünde geçirdikleri zamana TOF adı verilir (Biruni Laboratuvarı, 2020). İyonlar m/e değerlerine göre farklı zamanda dedektöre ulaşırlar ve böylece m/z oranını gösteren grafikler (kütle spektrumları) elde edilir (<https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2022/04/Banu-Bayratkar.pdf>, Erişim tarihi: 27 Mayıs 2025). Ortaya çıkan grafiklerin x eksenini m/z oranını gösterirken y eksenini yoğunluğu (belli bir kütledeki moleküllerin sayısı) gösterir (Çırak, 2010; Şekil 2.1.4.1.; Şekil 2.1.4.2.). Her mikroorganizma için özgün bir spektrum elde edilmesinin sebebi, hücre içinde bol miktarda bulunan temel bir protein olan ribozomal proteinlerden kaynaklanmaktadır (Suh ve Limbach, 2004). Ribozomal proteinler mikrobiyal üreme koşullarından, çevresel koşullardan en az etkilenen ve bu yüzden rutin tanımlama için en uygun olan proteinlerdir (Suh ve Limbach, 2004). Özgül olan bu proteinler sayesinde mikroorganizmaların spesifik moleküller parmak izleri oluşturularak identifikasyon yapılmaktadır (Wieser ve ark., 2012).

Kütle spektrometrisi ile 400 ile 350 000 Da molekül ağırlığındaki proteinler, peptitler, oligosakkaritler ve oligonukleotitler gibi biyomoleküllerin dedeksiyonu ve tanımlanması yapılabilmektedir (Özel ve ark., 2014). MALDI Biotyper® (Bruker

Daltonik GmbH, Almanya) ve VITEK® MS (bioMérieux, Fransa) kütle spektrometri yöntemini kullanarak tanımlama yapan otomatize cihazlardır. Bu cihazlar sırasıyla Kasım ve Ağustos 2013'te Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır (Van ve ark., 2015).



Şekil 2.1.4.1. Kütle spektrometrisi çalışma prensibi (Banu Bayratkar, 2022'den uyarlanmıştır.)



Şekil 2.1.4.2. Kütle spektrometrisi çalışma prensibi (Banu Bayratkar, 2022'den uyarlanmıştır.)

Her iki sistem de 2000–20.000 m/z aralığında protein/peptit kütle spektrumları elde edebilir ve yalnızca araştırma amaçlı (RUO) ve in vitro tanı (IVD) olmak üzere iki versiyonu mevcuttur (Kostrzewa ve ark., 2019). Ancak biyoinformatik yaklaşımları farklılık gösterir. VITEK® MS IVD, identifikasyon için denetimli makine öğrenimine (supervised machine learning) dayalı bir algoritma olan 'Gelişmiş Spektrum Sınıflandırıcısı' kullanır (Mesureur ve ark., 2018). 2000 ile 20.000 Dalton arasındaki spektrumları, bir türün tanımlanması/farklılaştırılması için önemli olan ağırlıklarına göre 1300 segmente ('bins') ayırarak spektrum sınıflandırması yapar. Sonuçlar, cihaz tarafından yüzde değerleri hesaplanarak verilir (Markus Kostrzewa, 2019; Schröttner ve ark., 2016):

- 1) Tek bir tanımlama için güven değeri %99,9 ise mükemmel bir eşleşme anlamına gelir.
- 2) Güven değeri %60-99,8 aralığında ise iyi bir eşleşme olarak kabul edilir. Güven değerleri %60'ın üzerinde olan birden fazla tanımlama sonucu sağlanmışsa, sonuçların "low discrimination result" temsil ettiği kabul edilir.
- 3) %60'ın altındaki bir güven değeri kabul edilemez olarak değerlendirilir ("tanımlama yok")

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmamızın etik kurul onayı (SAÜTF-KAEK No: 176638-112); Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Girişimsel Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, 21.10.2022 tarihli imza ile alınmıştır (Ek 1).

3.2. Çalışma Grubu

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 2023-23-50-105).

Çalışmamız Aralık 2023-Eylül 2024 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Daha önce kan, idrar, solunum yolu örnekleri, doku, yara gibi çeşitli klinik numunelerden izole edilmiş, KS ile tanımlanarak stoklanmış 116 kolleksiyon materyali ile birlikte; KS ile tanımlanamayan 10 mikroorganizma çalışmaya dahil edildi. Tanımlanan 116 suşun 12'si KS'nin farklı identifikasyon yüzdeleri vererek arada kaldığı suşlardan oluşmaktadır. Kültür kolleksiyon materyallerinden klinik olarak yaygın olmayıp nadir karşılaşılan ve tanımlanmasında güçlük yaşanmış mikroorganizmalar öncelikli olarak seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilme ve çalışma dışı bırakılma kriterleri aşağıda sıralanmaktadır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Klinik olarak nadir karşılaşılan KS ile tanımlanmış bakteriyel suşlar
- Tanımlamada güçlük yaşanılmış, alışılmadık morfoloji ve biyokimyasal özelliklere sahip; KS ile tanımlanmış bakteriyel suşlar
- Yavaş büyüyen bakteriyel suşlar
- Kütle spektrometrisi ile tanımlanamayan suşlar

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:

- Uygun sıcaklıkta saklanamayan suşlar (-80°C Derin dondurucunun bozulması vb.)
- Sanger dizileme yöntemi ile tür/cins düzeyinde tanımlama elde edilemeyen suşlar

3.3. Kütle Spektrometrisi ile İdentifikasyon

Laboratuvarımızın derin dondurucusunda (- 80°C) boncuklu besiyerlerinde daha önce isimleri yazılarak alikotlanıp saklanmış kültür koleksiyon suşları saf bakteri izolatları elde etmek ve KS ile tekrar tanımlayıp teğit etmek amacıyla Koyun Kanlı Agar (RTA, Türkiye) besiyerlerine ekilip canlandırıldı. Anaerop bakteriler ise anaerop besiyerlerine ekilerek, özel anaerop ortamın sağlandığı poşetlerde (GENbag-bioMérieux; Marcy l'Etoile, France) tekrar canlandırıldı.

Canlandırılan suşlara KS ile identifikasyon yaparken plate denilen üzerinde daire şeklinde 48 kuyucuk bulunan metal bir plaka kullanıldı. Bu plakalarda her 16 kuyucuğa 1 adet olacak şekilde toplamda 3 adet kalibrasyon kontrol kuyucuğu bulunmaktadır (Şekil 3.3.1.). Önce besiyerindeki kolonilerden 1µL steril öze ile alınarak doğrudan hedef plakanın yüzeyine sürüldü. İç kalite ve sistem kalibratörü olarak ise taze E. coli ATCC 8739 suşu kullanılarak ortadaki kalibrasyon kuyucuklarına sürüldü. Daha sonra bakteriyel biyokütle içinde kimyasal matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA) bulunan çözücü (1µL) ile kaplandı ve kurumaları beklendi (Bizzini ve ark., 2010). Kurutulduktan sonra hedef plaka VITEK® MS cihazına yüklendi. Her izolat “In Vitro Diagnostic (IVD)” modülü V3.2 veri tabanı ile tanımlandı.



Şekil 3.3.1. Kütle spektrometrisinin numune hazırlığı

Kütle spektrometrisi ile tekrar tanımlanarak saflıkları da teyit edilen bakteri kolonilerinden 1-2 adet steril öze ile alınarak içine 2 ml Tryptic Soy Broth besiyeri konulan ependorflarda numara verilip isim yazılarak alikotlandı. Anaerob bakteriler ise doğrudan skim milk saklama besiyerlerine alınarak 16 s rRNA dizi analizi çalışılana kadar - 80°C derin dondurucuda saklandı.

3.4. Nükleik Asit (DNA) İzolasyonu

Genomik DNA, üretici firmanın önerileri doğrultusunda QIASymphony® DSP Virüs/Pathogen Mini Kit (Qiagen) kullanılarak numunelerden izole edildi. Her DNA örneğinden 1 µL alınarak, numunelerin genomik DNA konsantrasyonları 2-2000 ng/µL ölçüm aralığına sahip MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (Maestrogen Inc., Hsinchu, Taiwan) kullanılarak ölçüldü (Resim 3.4.1.). Polimeraz Zincir Reaksiyonu öncesinde spektrometride ölçülen konsantrasyon değeri yüksek numunelerin dilüsyonları yapılarak ortalama konsantrasyon 20-40 ng/µL olacak şekilde ayarlandı (Yartasi ve ark., 2024).



Resim 3.4.1. Numunelerin genomik DNA konsantrasyonlarının ölçüldüğü MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (NanoDrop) cihazı

3.5. 16S rRNA Bölgesinin Amplifikasyonu

Dizilenecek 16S rRNA bölgesi (v1-v5) 27F 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' ve 878R 5'-GGAGTACCAGGGTATCTAAT-3' primerleri kullanılarak çoğaltıldı (Yartasi ve ark., 2024). PCR için total hacim 25 µl olacak şekilde bir reaxion mix hazırlandı.

PCR için hazırlanan reaxion mix bileşenleri:

- 12,5 µl 2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix,
- 1.0 µl forward primer (10 pmol/µl),
- 1.0 µl reverse primer (10 pmol/µl),
- 4,5 µL Template DNA (20-40 ng/ µL),
- 6 µl steril bidistile saf su

Real-time PCR Rotor-Gene Q (QIAGEN, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak çalışılmış olup şu ısıl döngü programı izlendi: 95°C'de 15 dakika; 40 döngü 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika; 72°C'de 5 dakika. *E. coli* ATCC25922 PCR 'nin kontrol suşu olarak kullanıldı.

3.6. 16S rRNA Sekans

Elde edilen pcr ürünleri dizileme yapmadan önce, üreticinin talimatlarına göre ‘ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent’ (Affymetrix, Santa Clara, ABD) kullanılarak saflaştırıldı. Ortalama 20-40 ng/μL olacak şekilde saflaştırılmış PCR amplifikasyon ürünleri, ‘BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit’ (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak döngü dizileme yapıldı (Yartasi ve ark., 2024). ‘CleanDTR - BigDye terminator removal sequencing kit’ (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak dizi analizi öncesinde pürifikasyon yapıldı. Reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi Applied Biosystems Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirildi (Resim 3.6.1.) Dizileme verileri FASTA formatına dönüştürüldü ve NCBI veritabanında BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool-Nükleotid BLAST) algoritması kullanılarak dizilerle karşılaştırıldı. En yakın eşleşmeler Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kılavuzu MM18-A'ya göre elde edildi (Petti ve ark., 2008).



Resim 3.6.1. Dizi analizinin yapıldığı Applied Biosystems Hitachi 3500 Genetic Analyzer otomatize dizi analizi cihazı

4. BULGULAR

Çalışmamıza 126 suş dahil edildi. Suşların 116'sı (%92,1) KS ile farklı güven değeri ile tanımlanırken, 10'u (%7,9) tanımlanamadı. Çalışmaya dahil edilen 126 suшта KS'nin tanımlamada cihazın verdiği güven yüzdesi ortalaması %88,8 iken; dizi analizi suşları NCBI veritabanında ortalama %98,6 BLAST benzerlik yüzdesi ile tanımlandı.

4.1. Kütle Spektrometrisi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kütle spektrometrisi 126 suşun 108'ini (%85,7) %99,9 güven değeriyle tanımlandı. Altı suшта (%4,7) iki tür arasında kalarak %50-60; 1 suшта (%0,7) üç farklı tür arasında kalarak %33,3; 1 suшта (%0,7) ise %66 güven değeri vererek tanımlandı. On suшта (%7,9) tanımlama yapamadı.

4.1.1. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında tür/cins düzeyinde uyumlu bulunan suşlar

Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında tür düzeyinde uyumlu bulunan suşlar Tablo 4.1.1.1'de; yalnızca cins düzeyinde uyumlu bulunan suşlar Tablo 4.1.1.2.'de sunulmuştur.

4.1.2. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında uyumsuz bulunan suşlar

Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında uyumsuz bulunan suşlar Tablo 4.1.2.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1.1.1. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında tür düzeyinde uyumlu bulunan suşlar

SUŞ NO	KS	KS (%)	Dizi Analizi	Dizi Analizi (%)	BLAST Yapılan Baz Uzunluğu
1	<i>Escherichia coli</i> (KONTROL 8739)	99,9	<i>Escherichia coli</i>	99,8	526
2	<i>Staphylococcus aureus</i> (KONTROL 25923)	99,9	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,8	614
3	<i>Lactococcus garvieae</i>	99,9	<i>Lactococcus garvieae</i>	99,2	642
4	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9	<i>Bacillus licheniformis</i>	94,4	250
5	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	99,9	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	99,0	723
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	99,9	<i>Listeria monocytogenes</i>	100,0	606
7	<i>Pseudoglutamicibacter cumminsii</i>	99,9	<i>Pseudoglutamicibacter cumminsii</i>	98,2	729
8	<i>Clostridium perfringens</i>	99,9	<i>Clostridium perfringens</i>	100,0	703
9	<i>Finegoldia magna</i>	99,9	<i>Finegoldia magna</i>	97,7	429
10	<i>Providencia rettgeri</i>	99,9	<i>Providencia rettgeri</i>	98,5	732
11	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99,9	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99,6	461
12	<i>Roseomonas mucosa</i>	99,9	<i>Roseomonas mucosa</i>	99,7	694
13	<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>	99,9	<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>	99,8	462
14	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	99,9	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	99,5	608
15	<i>Leuconostoc lactis</i>	99,9	<i>Leuconostoc lactis</i>	98,6	716
16	<i>Shewanella algae</i>	99,9	<i>Shewanella algae</i>	99,1	553
17	<i>Rothia mucilaginosa</i>	99,9	<i>Rothia mucilaginosa</i>	99,6	462
18	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	99,9	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	98,2	628
19	<i>Yersinia enterocolitica</i>	99,9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	100,0	626
20	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	99,9	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	98,2	613
21	<i>Peptococcus niger</i>	99,9	<i>Peptococcus niger</i>	99,0	454
22	<i>Clostridium perfringens</i>	99,9	<i>Clostridium perfringens</i>	98,3	644
23	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	99,9	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	98,7	471
24	<i>Pandoraea apista</i>	99,9	<i>Pandoraea apista</i>	99,8	623
25	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	99,9	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	98,9	746
26	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99,9	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	100,0	734
27	<i>Streptococcus sinensis</i>	99,9	<i>Streptococcus sinensis</i>	98,5	615
28	<i>Citrobacter freundii</i>	99,9	<i>Citrobacter freundii</i>	99,0	729
29	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	98,9	627
30	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99,9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98,5	609
31	<i>Brevibacterium casei</i>	99,9	<i>Brevibacterium casei</i>	99,6	551
32	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	99,9	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	98,5	661
33	<i>Moellerella wisconsensis</i>	99,9	<i>Moellerella wisconsensis</i>	99,8	551
34	<i>Ralstonia pickettii</i>	99,9	<i>Ralstonia pickettii</i>	96,7	369
35	<i>Ralstonia pickettii</i>	99,9	<i>Ralstonia pickettii</i>	97,5	473
36	<i>Ralstonia pickettii</i>	99,9	<i>Ralstonia pickettii</i>	98,3	467
37	<i>Ralstonia pickettii</i>	99,9	<i>Ralstonia pickettii</i>	96,4	147
38	<i>Ralstonia pickettii</i>	99,9	<i>Ralstonia pickettii</i>	99,4	355
39	<i>Corynebacterium afermentans</i>	99,9	<i>Corynebacterium afermentans</i>	88,0	302
40	<i>Enterococcus italicus</i>	99,9	<i>Enterococcus italicus</i>	97,2	352
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99,9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97,6	668
42	<i>Schaalia turicensis</i>	99,9	<i>Schaalia turicensis</i>	99,5	576
43	<i>Shewanella algae</i>	99,9	<i>Shewanella algae</i>	98,8	609
44	<i>Comamonas testosteroni</i>	99,9	<i>Comamonas testosteroni</i>	99,9	730
45	<i>Cutibacterium acnes</i>	99,9	<i>Cutibacterium acnes</i>	99,0	691
46	<i>Peribacillus simplex</i>	99,9	<i>Peribacillus simplex</i>	99,5	658
47	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99,9	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99,8	560
48	<i>Enterococcus hirae</i>	99,9	<i>Enterococcus hirae</i>	97,8	657
49	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,9	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,6	729
50	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,9	<i>Burkholderia cepacia</i>	96,4	740
51	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99,9	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99,4	666
52	<i>Comamonas testosteroni</i>	99,9	<i>Comamonas testosteroni</i>	98,9	542
53	<i>Providencia stuartii</i>	99,9	<i>Providencia stuartii</i>	97,6	744
54	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	99,9	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	100,0	510
55	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	99,9	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	98,5	526
56	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	99,9	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	98,9	540
57	<i>Burkholderia contaminans</i>	99,9	<i>Burkholderia contaminans</i>	98,3	460
58	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99,9	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99,8	650
59	<i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>)	99,9	<i>Propionibacterium acnes</i>	97,3	520
60	<i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>)	99,9	<i>Propionibacterium acnes</i>	99,7	605
61	<i>Winkia neuvi</i> (<i>Actinomyces neuvi</i>)	99,9	<i>Actinomyces neuvi</i>	98,9	588

Tablo 4.1.1.1. (devam) Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında tür düzeyinde uyumlu bulunan suşlar

62	<i>Burkholderia contaminans</i>	99,9	<i>Burkholderia contaminans</i>	93,0	227
63	<i>Rhizobium radiobacter</i>	99,9	<i>Rhizobium radiobacter</i>	100,0	615
64	<i>Mammaliicoccus sciuri</i>	99,9	<i>Mammaliicoccus sciuri</i>	99,2	739
65	<i>Mammaliicoccus sciuri</i>	99,9	<i>Mammaliicoccus sciuri</i>	99,2	659
66	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	50,0	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99,3	728
67	<i>Achromobacter denitrificans</i>	50,0	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99,1	735
68	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	50,0	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99,0	725
69	<i>Achromobacter denitrificans</i>	50,0	<i>Chryseobacterium gleum</i>	98,9	739
70	<i>Chryseobacterium gleum</i>	50,0	<i>Bacillus pumilus</i>	98,6	649
71	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	50,0	<i>Bacteroides ovatus/ xylanisolvans</i>	98,0	612
72	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99,9	<i>Nocardia farcinica</i>	97,5	709
73	<i>Bacteroides ovatus/ xylanisolvans</i>	99,9	<i>Nocardia kroppenstedtii</i>	97,5	647
74	<i>Nocardia farcinica</i>	99,9	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	97,6	449
75	<i>Nocardia farcinica</i>	99,9	<i>Nocardia farcinica</i>	100,0	657
76	<i>Nocardia kroppenstedtii</i>	99,9	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	99,4	639
77	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	99,9	<i>Delftia acidovorans</i>	99,2	468
78	<i>Delftia acidovorans</i>	99,9	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	98,5	470
79	<i>Delftia lacustris</i>	99,9	<i>Delftia lacustris</i>	96,0	683
80	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100,0	739
81	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	99,9	<i>Aerococcus urinae</i>	100,0	641
82	<i>Aerococcus urinae</i>	99,9	<i>Aerococcus loyolae</i>	99,2	639
83	<i>Aerococcus loyolae</i>	99,9	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	98,5	612
84	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	99,9	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	99,8	612
85	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	99,9	<i>Herbaspirillum huttiense subsp. putei</i>	96,0	612
86	<i>Herbaspirillum huttiense subsp. putei</i>	99,9	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	96,0	612
87	<i>Hafnia alvei</i>	33,3	<i>Hafnia alvei</i>	100,0	612
88	<i>Hafnia paralvei</i>	33,3	<i>Hafnia paralvei</i>	100,0	612
89	<i>Obesumbacterium proteus</i>	33,3	<i>Obesumbacterium sp.</i>	100,0	612
90	<i>Bacteroides ovatus/ xylanisolvans</i>	99,9	<i>Bacteroides xylanisolvans/ovatus</i>	98,8	612
91	<i>Lactococcus lactis</i>	99,9	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	100,0	612
92	<i>Salmonella enterica subs. enterica</i>	99,9	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona</i>	99,2	612
ORTALAMA		96,65	98,60	588	
<i>Escherichia coli*</i>		99,9	<i>Shigella dysenteriae</i>	100,0	755
			<i>Escherichia coli</i>	100,0	
			<i>Escherichia fergusonii</i>	99,8	
<i>Escherichia fergusonii*</i>		99,9	<i>Escherichia coli</i>	99,8	612
			<i>Shigella flexneri</i>	99,8	
			<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,8	

*2 suşta dizi analizinde aynı benzerlik oranına sahip birden fazla cins/tür saptandığından cins/tür düzeyinde uyum/uyumsuzluk kategorisi net olarak belirlenemedi.

KS: Kütle spektrometrisi; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Tablo 4.1.1.2. Kütle spektrometrisi ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında yalnızca cins düzeyinde uyumlu bulunan suşlar

SUŞ NO	KS	KS (%)	Dizi Analizi	Dizi Analizi (%)	KS'nin Tanımladığı Türün Dizi Analizi Yüzdesi	KS-Dizi Analizi Arası Fark (%)	BLAST Yapılan Baz Uzunluğu
1	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99,9	<i>Bacillus safensis</i>	97,6	97,4 (<i>B. pumilus</i>)/97,2 (<i>B. altitudinis</i>)	0,2/0,4	684
2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	99,9	<i>Brevundimonas olei</i>	99,3	98,5 (<i>Brevundimonas diminuta</i>)	0,8	548
3	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	66,0	<i>Chryseobacterium arthrosphaerae</i>	99,1	97,6 (<i>Chryseobacterium indologenes</i>)	1,5	577
4	<i>Delftia acidovorans</i>	99,9	<i>Delftia lacustris</i>	99,9	99,7 (<i>Delftia acidovorans</i>)	0,2	695
5	<i>Raoultella planticola</i>	99,9	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	98,4	98,2 (<i>Raoultella planticola</i>)	0,2	743
6	<i>Schaalia turicensis</i>	99,9	<i>Schaalia radingae</i>	98,7	88,8 (<i>Schaalia turicensis</i>)	9,9	608
7	<i>Lelliottia amnigena</i>	99,9	<i>Lelliottia aquatilis</i>	97,5	97,3 (<i>Lelliottia amnigena</i>)	0,2	608
8	<i>Globicatella sanguinis</i>	99,9	<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	99,2	98,9 (<i>Globicatella sanguinis</i>)	0,3	726
9	<i>Veillonella dispar</i>	99,9	<i>Veillonella parvula</i>	98,6	98,0 (<i>Veillonella dispar</i>)	0,6	652
10	<i>Cupriavidus pauculus</i>	99,9	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	98,5	97,1 (<i>Cupriavidus pauculus</i>)	1,4	659
			<i>Chryseobacterium arthrosphaerae</i>	99,4			
11	<i>Chryseobacterium gleum</i>	99,9	<i>Chryseobacterium aureum</i>	99,4	98,9 (<i>Chryseobacterium gleum</i>)	0,5	617
			<i>Citrobacter meridianamericanus</i>	97,7			
12	<i>Citrobacter koseri</i>	99,9	<i>Citrobacter freundii</i>	97,7	94,4 (<i>Citrobacter koseri</i>)	3,3	741
			<i>Pseudomonas parafulva</i>	99,3			
13	<i>Pseudomonas putida</i>	99,9	<i>Pseudomonas fulva</i>	99,3	99,2 (<i>Pseudomonas putida</i>)	0,1	721
			<i>Pseudomonas parafulva</i>	99,6			
14	<i>Pseudomonas putida</i>	99,9	<i>Pseudomonas fulva</i>	99,6	99,4 (<i>Pseudomonas putida</i>)	0,2	706
			<i>Herbaspirillum frisingense</i>	95,3			
15	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	99,9	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	95,3	95,0 (<i>Herbaspirillum huttiense</i>)	0,3	426
16	<i>Myroides sp.</i>	99,9	<i>Myroides sp.</i>	99,9	-		711
17	<i>Lactacaseibacillus sp.</i>	99,9	<i>Lactacaseibacillus rhamnosus</i>	99,4	-		709
18	<i>Granulicatella sp.</i>	99,9	<i>Granulicatella adiacens</i>	99,8	-		610
19	<i>Myroides sp.</i>	99,9	<i>Myroides odoratimimus</i>	98,2	-		623
Ortalama		98,11		98,54	97,22	1,32	650

KS: Kütle spektrometrisi; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Tablo 4.1.2.1. Kütle spektrometrisi ve 16S rRNA dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında uyumsuz bulunan suşlar

SUŞ NO	KS	KS (%)	Dizi Analizi	Dizi Analizi (%)	KS'nin tanımladığı türün dizi analizi (%)	KS-Dizi Analizi Arası Fark	BLAST Yapılan Baz Uzunluğu
1	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	99,9	<i>Lelliottia aquatilis</i>	99,1	96,5 (<i>Pluralibacter gergoviae</i>)	2,6	752
2	<i>Peribacillus simplex</i>	99,9	<i>Bacillus</i> sp.	99,7	99,5 (<i>Peribacillus simplex</i>)	0,2	658
3	<i>Parvimonas micra</i>	50,1	<i>Citrobacter koseri</i>	99,3	87,6 (<i>Parvimonas micra</i>)	11,7	741
	<i>Cupriavidus necator</i>	49,9			82,0 (<i>Cupriavidus necator</i>)	17,3	
4	<i>Mycoplasma</i>	99,9	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99,0	83,0 (<i>Mycoplasma</i>)	16,0	618
			<i>Micrococcus luteus</i>	99,0			
5	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	99,9	<i>Parvimonas micra</i>	99,2	77,8 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>)	21,4	649
6	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99,9	<i>Klebsiella aerogenes</i>	98,9	98,3 (<i>Raoultella ornithinolytica</i>)	0,6	350*
7	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	99,9	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,2	98,8 (<i>Leclercia adecarboxylata</i>)	0,4	590
8	<i>Finegoldia magna</i>	99,9	<i>Campylobacter ureolyticus</i>	97,3	79,7 (<i>Finegoldia magna</i>)	17,6	590
9	<i>Franconibacter helveticus</i>	99,9	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	98,1	93,7 (<i>Franconibacter helveticus</i>)	4,4	364*
			<i>Phytobacter</i> sp.	98,1			
			<i>Enterobacter</i> sp.	98,1			
			<i>Pantoea</i> sp.	98,1			
10	<i>Mycoplasma fermentans</i>	99,9	<i>Corynebacterium lujinxingii</i>	98,6	78,8 (<i>Mycoplasma fermentans</i>)	19,8	631
			<i>Corynebacterium afermentans</i>	98,6			
11	<i>Cutibacterium acnes</i>	99,9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,6	88,7 (<i>Cutibacterium acnes</i>)	10,9	556
12	<i>Pseudoglutamicibacter cumminsii</i>	99,9	<i>Vaginella massiliensis</i>	97,1	0 (<i>Pseudoglutamicibacter cumminsii</i>)	97,1	735
			<i>Weeksella</i> sp.	97,1			
13	<i>Prevotella bivia</i>	99,9	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,3	0 (<i>Prevotella bivia</i>)	99,3	717
ORTALAMA		96,06		98,80	76,00	22,80	611

*BLAST yapılan baz uzunluğu 500 bp'nin altında olan suşlar.

KS: Kütle spektrometrisi; BLAST: Basic Local Alignment Search

4.1.3. Kütle spektrometrisi ile tür/cins ayrımı yapılamayan suşlar

Kütle spektrometrisinin farklı yüzdelere vererek arada kaldığı toplam 12 suş (% 9,5) bulundu (Tablo 4.1.3.1.).

Yedi suşta 2 tür arasında kaldı ve dizi analizi türlerden birini doğruladı. Bu suşların detayı aşağıda belirtildiği şekildedir. Bu suşlar;

- Üç adet *Achromobacter xylosoxidans* (%50)/*Achromobacter dentrificans* (%50) suşları dizi analizinde *Achromobacter xylosoxidans* (>%99 benzerlik oranı) olarak tanımlandı.
- *Chryseobacterium gleum* (%50)/*Chryseobacterium indologenes* (%50) suşu dizi analiziyle *Chryseobacterium gleum* (>%98) olarak;
- *E.coli* (%50,1)/*Citrobacter freundii* (%49,9) suşu dizi analiziyle *Citrobacter freundii* (>%98) olarak;
- *Bacteroides ovatus*/ *xylanisolvens* suşu *Bacteroides xylanisolvens* (>%98) olarak;
- *Bacillus altitudinis/pumilus* suşu *Bacillus pumilus* (>%98) olarak tanımlandı.

İki suşta dizi analizi cins düzeyini doğrularken tür düzeylerini farklı tanımladı. Bu suşların detayı aşağıda belirtildiği şekildedir. Bu suşlar;

- *Bacillus altitudinis/pumilus* suşu dizi analizi ile *Bacillus safensis* (>%97) olarak tanımlandı.
- %66 yüzde vererek tanımladığı *Chryseobacterium indologenes* suşu dizi analizi ile *Chryseobacterium arthrosphaerae* (>%99) olarak tanımlandı.

Bir suşta dizi analizi cins düzeyinde farklı tanımladı. Bu suş;

- *Parvimonas micra* (%50,1)/*Cupriavidus necator* (%49,9) suşu dizi analizi ile *Citrobacter koseri* (>%99) olarak tanımlandı.

İki suşta dizi analizi, KS ile aynı suşlar arasında kaldı. Bu suşların detayı aşağıda belirtildiği şekildedir. Bu suşlar;

- *Bacteroides ovatus*/ *xylanisolvans* suşunun dizi analiz sonucunda *Bacteroides ovatus* (%98,78)/ *Bacteroides xylanisolvans* (%98,78) aynı benzerlik yüzdesine sahipti.
- *Hafnia paralvei* (%33,3)/*Obesumbacterium proteus* (%33,3)/*Hafnia alvei* (%33,3) suşunun dizi analizinde de; *Hafnia paralvei* (%100)/*Obesumbacterium sp.* (%100)/*Hafnia alvei* (%100) aynı benzerlik yüzdelere sahipti.

Tablo 4.1.3.1. Kütle spektrometrisinin tür/cins ayrımı yapamadığı suşlar

SUŞ NO	KS	KS (%)	Dizi Analizi	Dizi Analizi (%)	KS'nin tanımladığı türün dizi analizi yüzdesi	BLAST Baz Uzunluğu
1	<i>E.coli</i> <i>Citrobacter freundii</i>	50,1 49,9	<i>Citrobacter freundii</i>	98,7	96,7 (<i>E. coli</i>)	525
2	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Achromobacter denitrificans</i>	50,0 50,0	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99,3	99,0 (<i>A. denitrificans</i>)	728
3	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Achromobacter denitrificans</i>	50,0 50,0	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99,1	98,9 (<i>A. denitrificans</i>)	735
4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Achromobacter denitrificans</i>	50,0 50,0	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99,0	98,9 (<i>A. denitrificans</i>)	725
5	<i>Chryseobacterium gleum</i> <i>Chryseobacterium indologenes</i>	50,0 50,0	<i>Chryseobacterium gleum</i>	98,9	97,4 (<i>C. indologenes</i>)	739
6	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99,9	<i>Bacillus pumilus</i>	98,6	98,0 (<i>B. altitudinis</i>)	649
7	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99,9	<i>Bacillus safensis</i>	97,6	97,2 (<i>B. altitudinis</i>) 97,4 (<i>B. pumilus</i>)	684
8	<i>Bacteroides ovatus</i> / <i>xylanisolvans</i>	99,9	<i>Bacteroides xylanisolvans</i>	98,0	97,9 (<i>B. ovatus</i>)	612
9	<i>Bacteroides ovatus</i> / <i>xylanisolvans</i>	99,9	<i>Bacteroides xylanisolvans/ovats</i>	98,7	-	739
10	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	66,0	<i>Chryseobacterium arthrosphaerae</i>	99,1	97,6 (<i>C. indologenes</i>)	577
11	<i>Parvimonas micra</i> <i>Cupriavidus necator</i>	50,1 49,9	<i>Citrobacter koseri</i>	99,3	87,6 (<i>P. micra</i>) 82,0 (<i>C. necator</i>)	741
12	<i>Hafnia alvei</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Obesumbacterium proteus</i>	33,3 33,3 33,3	<i>Hafnia alvei</i> <i>Hafnia paralvei</i> <i>Obesumbacterium sp.</i>	100,0 100,0 100,0	-	683

KS: Kütle spektrometrisi; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

4.1.4. Kütle spektrometrisi ile tanımlanamayan suşlar

Çalışmamıza dahil edilen 126 suşun 10'u (%7,9) KS ile tanımlanamadı. Kütle spektrometrisi ile tanımlanamayan 10 suştan 4 ü dizi analizi ile *Delftia lacustris*, *Flavobacterium lindanitolerans*, *Oligella urethralis*, *Helcococcus kunzii* olarak tanımlandı (≥ 97 benzerlik oranı). 5 suşta aynı benzerlik oranına sahip birden fazla cins/tür saptandı. 1 suş ise sadece cins düzeyinde (*Corynebacterium sp.*) $\geq 97\%$ benzerlik oranı ile tanımlandı (Tablo 4.1.4.1.).

Tablo 4.1.4.1. Kütle spektrometrisi ile tanımlanamayan suşların dizi analizi sonuçları

SUŞ NO	KS	Dizi Analizi	Dizi Analizi (%)	BLAST Baz Uzunluğu	NOT
1	Okumadı	<i>Corynebacterium sp.</i>	97,2	536	KS veritabanında <i>Corynebacterium sp.</i> Mevcut
2	Okumadı	<i>Afipia broomeae</i> <i>Bradyrhizobium sp.</i>	97,1 97,1	549	VITEK® 2 Compact sistemi ile <i>Saprochaete clavata</i> olarak tanımlandı. <i>Afipia broomeae</i> KS veritabanında mevcut değil fakat; <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium denitrificans</i> mevcut
3	Okumadı	<i>Nocardia farcinica</i> <i>Nocardia kroppenstedtii</i> <i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	97,3 97,3 97,3	661	VITEK® 2 Compact sistemi ile <i>Nocardia sp.</i> olarak tanımlandı. KS veritabanında <i>Nocardia</i> türleri mevcut
4	Okumadı	<i>Delftia lacustris</i>	98,3	696	KS veritabanında <i>Delftia lacustris</i> mevcut değil (Sadece <i>Delftia acidovorans</i> mevcut)
5	Okumadı	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas songnenensis</i> <i>Pseudomonas xanthomarina</i>	99,4 99,4 99,4	735	VITEK® 2 Compact sistemi ile <i>Acinetobacter lwoffii</i> olarak tanımlandı. KS veritabanında <i>Pseudomonas stutzeri</i> mevcut sadece
6	Okumadı	<i>Flavobacterium lindanitolerans</i>	97,2	726	VITEK® 2 Compact sistemi ile %50 <i>Chryseobacterium indologenes</i> %50 <i>Brevundimonas diminuta</i> olarak tanımlandı. KS de sadece <i>Flavobacterium columnare</i> ile <i>Flavobacterium psychrophilum</i> mevcut
7	Okumadı	<i>Actinomyces bacterium</i> <i>Nocardia farcinica</i>	93,0 93,0	713	VITEK® 2 Compact sistemi ile Low discrim %50 <i>Kocuria rosea</i> %50 d. <i>nishino/k.sed</i> (<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> / <i>Kytococcus sedentarius</i>) olarak tanımlandı. <i>Nocardia farcinica</i> KS veritabanında mevcut iken; <i>Actinomyces bacterium</i> mevcut değil
8	Okumadı	<i>Enterococcus hulanensis</i> <i>Enterococcus avium</i> <i>Enterococcus hirae</i>	99,8 99,8 99,8	540	<i>Enterococcus avium/hirae</i> KS veritabanında mevcut iken; <i>Enterococcus hulanensis</i> mevcut değil
9	Okumadı	<i>Oligella urethralis</i>	99,2	604	<i>Oligella urethralis</i> KS veritabanında mevcut
10	Okumadı	<i>Helcococcus kunzii</i>	98,8	579	<i>Helcococcus kunzii</i> KS veritabanında mevcut

KS: Kütle spektrometrisi; BLAST: Basic Local Alignment Search

4.2. Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

16S rRNA gen bölgesinin dizi analiz sonuçları, NCBI BLAST'taki benzerlik yüzdelere göre 3 farklı tanımlama kriteri oluşturularak yapıldı.

Tanımlama kriteri 1:

BLAST ile tür düzeyinde tanımlama yapılırken $\geq 99\%$ benzerlik oranı sınır değer kabul edilirken; cins düzeyinde tanımlamada $\geq 97\%$ oranındaki dizi benzerlikleri sınır değer kabul edildi. Dizi benzerlik oranı $< 97\%$ olması tanımlanamama kriteri olarak kabul edildi.

Toplamda 111(%88,1) suş cins düzeyinde tanımlandı. 52 suş (% 41,2) yalnızca cins düzeyinde tanımlanırken, 50 suş (% 39,6) tür düzeyinde tanımlandı. 9 suшта (% 7,1) aynı benzerlik yüzdesine sahip iki veya daha fazla tür bulunduğundan türler arasında net bir ayırım yapamadı. 6 suшта (%4,7) aynı benzerlik yüzdesine sahip iki veya daha fazla cins bulunduğundan cins düzeyinde ayırım yapamadı. 9 suş (% 7,1) benzerlik oranı <97 olduğundan tanımlanamadı olarak kabul edildi (Tablo 4.2.1.).

Tanımlama kriteri 2:

GenBank'ta tür düzeyinde tanımlama yapılırken ≥ 97 benzerlik oranı sınır değeri kabul edilirken; cins düzeyinde tanımlamada ≥ 95 oranındaki dizi benzerlikleri sınır değeri kabul edildi. Dizi benzerlik oranı <95 olması hali ise tanımlanamama kriteri olarak kabul edildi.

Toplamda 116 (%92,1) suş cins düzeyinde tanımlandı. 6 suş (% 4,7) yalnızca cins düzeyinde tanımlanırken, 93 suş (% 73,8) tür düzeyinde tanımlandı. 17 suшта (%13,4) türler arasında net bir ayırım yapamadı. 6 suшта (%4,7) cins düzeyinde net bir ayırım yapamadı. 4 suş (% 3,1) benzerlik oranı <95 olduğundan tanımlanamadı olarak kabul edildi (Tablo 4.2.1.).

Tanımlama kriteri 3:

GenBank'ta tür ve cins tanımlaması için sınır değeri kabul edilmeden eşleşen en yüksek benzerlik yüzdesi baz alındı. 126 suş tür/cins düzeyinde tanımlandı.

Toplamda 119 (%94,4) suş cins düzeyinde tanımlandı. 2 (%1,5) suş yalnızca cins düzeyinde tanımlanırken. 99 (% 78,5) suş tür düzeyinde tanımlanırken, 18 suшта (%14,2) türler arasında net bir ayırım yapamadı. 7 (%5,5) suшта cins düzeyinde net bir ayırım yapamadı (Tablo 4.2.1.).

Tablo 4.2.1. Dizi analizinde belirlenen kriterlere göre tür/cins düzeyinde tanımlanan suş sayıları

Tanımlamalar	Tanımlama Kriteri 1	Tanımlama Kriteri 2	Tanımlama Kriteri 3
	($\geq 99\%$ Tür, $\geq 97\%$ Cins)n	($\geq 97\%$ Tür, $\geq 95\%$ Cins) n	Eşleşen en yüksek yüzde* n
Tür düzeyinde tanımlanabilen suş	50 (%39,6)	93 (%73,8)	99 (%78,5)
Yalnızca cins düzeyinde tanımlanabilen suş	52 (%41,2)	6 (%4,7)	2 (%1,5)
Cins ayrımı yapılamayan suş	6 (%4,7)	6 (%4,7)	7 (%5,5)
Tür ayrımı yapılamayan suş	9 (% 7,1)	17 (%13,4)	18 (%14,2)
Tanımlanamayan suş	9 (% 7,1) (<97)	4 (% 3,1) (<95)	-
TOPLAM	126	126	126

*Tüm suşlarda minimum %88 eşleşme görüldü.

4.2.1. Blast yapılan dizi uzunluğu ortalamaları

Dizi analizi yapılan 126 suşun NCBI’da BLAST yapılan dizi uzunluğu ortalamaları 604’tür. Kütle spektrometrisi ile cins düzeyinde uyum bulunan suşların dizi uzunluğu ortalaması 600 iken; tür düzeyinde uyumlu bulunan suşların dizi uzunluğu ortalaması 588’dir (Tablo 4.1.1.1.; Tablo 4.1.1.2.). Cins ve tür düzeyinde farklı tanımlanan suşların dizi uzunluğu ortalamaları ise 611’dir (Tablo 4.1.1.2; Tablo 4.1.2.1.).

Çalışmamızda 22 adet suşun dizi uzunluğu 500 bp’nin altında olmasına rağmen veri elde edilebildi. 19 adet suş (13 suş $>97\%$ benzerlik ile) KS ile tür düzeyinde uyumlu olarak tanımlanırken; suşlardan 1’i cins düzeyinde aynı, tür düzeyinde farklı saptandı. 2 suş ise her iki yöntemle cins düzeyinde farklı saptandı.

4.2.2. Dizi analizinde tür/cins ayrımı yapılamayan suşlar

Dizi analizinde tür/cins düzeyinde ayırım yapılamayan suş sayısı belirlediğimiz kriterlere göre değişiklik gösterdi.

Sonuçların tanımlama kriteri 1’e göre değerlendirilmesi:

Dizi analizinde 17 suşta aynı benzerlik oranı verilerek tür/cins ayrımı yapılamadı.

- 6 suşta aynı benzerlik yüzdesi ile 2 veya daha fazla cins arasında kalarak ayırım yapamadı (2 suşta 3 farklı cins düzeyi arasında kalırken, 4 suş için 2 farklı cins düzeyi arasında kaldı).

- 9 suşta ise türler arasında net bir ayrım yapamadı. *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* (2 suş), *Chryseobacterium* olmak üzere toplamda 6 suşta sadece 2 tür arasında kalırken; *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* olmak üzere 3 suşta 3 tür arasında kalarak net bir tür ayrımı yapamadı.

Sonuçların tanımlama kriteri 2'ye göre değerlendirilmesi:

Dizi analizinde 23 suşta aynı benzerlik oranı verilerek tür/cins ayrımı yapılamadı.

- 6 suşta aynı benzerlik yüzdesi ile 2 veya daha fazla cins arasında kalarak ayrım yapamadı (2 suşta 3 farklı cins düzeyi arasında kalırken, 4 suş için 2 farklı cins düzeyi arasında kaldı).
- 17 suşta ise türler arasında net bir ayrım yapamadı. *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* (3 suş), *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacteroides* olmak üzere toplamda 11 suşta sadece 2 tür arasında kalırken; *Nocardia* (3 suş), *Delftia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* olmak üzere 6 suşta 3 tür arasında kalarak net bir tür ayrımı yapamadı.

Sonuçların tanımlama kriteri 3'e göre değerlendirilmesi:

Dizi analizinde 25 suşta aynı benzerlik oranı verilerek tür/cins ayrımı yapılamadı.

- 7 suşta aynı benzerlik yüzdesi ile 2 veya daha fazla cins arasında kalarak ayrım yapamadı (2 suşta 3 farklı cins düzeyi arasında kalırken, 5 suş için 2 farklı cins düzeyi arasında kaldı).
- 18 suşta ise türler arasında net bir ayrım yapamadı. *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* (2 suş), *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Herbaspirillum* (3 suş), *Bacteroides* olmak üzere toplamda 12 suşta sadece 2 tür arasında kalırken; *Nocardia* (3 suş), *Delftia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* olmak üzere 6 suşta 3 tür arasında kalarak net bir tür ayrımı yapamadı.

4.3. Kütle Spektrometrisi ve Dizi Analizi Sonuçlarının Kriterlere Göre Karşılaştırılması

Bakterilerin tanımlanmasında iki yöntem arasındaki cins ve tür düzeyinde uyum, 3 farklı tanımlama kriteri ile elde edilen sonuçlara göre değerlendirildi.

Sonuçların tanımlama kriteri 1'e göre değerlendirilmesi:

126 suşun 93'ü (%73,8) cins düzeyinde uyumlu bulunurken; 41 suş (%32,5) tür düzeyinde uyumlu saptandı. 7 suş ise (%5,5) tür düzeyinde farklı tanımlandı. 3 suşta ise KS sadece cins düzeyinde tanımlama yaparak tür adı vermedi. 13 suş ise (%10,3) her iki yöntemle cins düzeyinde farklı tanımlandı (Tablo 4.3.1.).

Benzerlik yüzdesi <%97 olan 9 suş (7'si her iki yöntemde tür düzeyinde uyumlu; 1'i cins düzeyinde uyumlu, 1'i KS ile tanımlanamayan suş) dizi analizinde tanımlanamadı olarak kabul edildi (Tablo 4.3.1.).

İki suşta ise cins/tür düzeyinde uyum/uyumsuzluk kategorisi net olarak belirlenemedi. Dizi analizinde birden fazla cins/tür saptanması halinde yüksek benzerlik oranına sahip suş tanımlamada kabul edildi. Ancak 2 suşta dizi analizinde aynı benzerlik oranına sahip birden fazla cins/tür saptandı.

Kütle spektrometrisi ile tanımlanan *Escherichia fergusonii* suşunun dizi analizinde; *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter hormaechei* olmak üzere aynı benzerlik oranına sahip (%99,84) 4 tür saptandı (Tablo 4.1.1.1.). *Escherichia coli* suşunun dizi analizinde; *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* olmak üzere aynı benzerlik oranına (%100) sahip 2 tür saptandı. Bu suşlar için her 3 tanımlama kriterinde de cins/tür düzeyinde uyum/uyumsuzluk kategorisi net olarak belirlenemedi (Tablo 4.1.1.1.).

Sonuçların tanımlama kriteri 2'ye göre değerlendirilmesi:

126 suşun 98'i (%77,7) cins düzeyinde uyumlu bulunurken; 75 suşun (%59,5) tür düzeyinde uyumlu olduğu, 14 (%11,1) suşun ise tür düzeyinde farklı tanımlandığı görüldü. 4 suşta ise KS sadece cins düzeyinde tanımlama yaparak tür adı vermedi (Tablo 4.3.1.).

13 suş ise (%10,3) her iki yöntemle cins düzeyinde farklı tanımlandı. Benzerlik yüzdesi <%95 olan 4 suş (3'ü her iki yöntemde de tür düzeyinde uyumlu;1'i KS ile tanımlanamayan suş) dizi analizinde tanımlanamadı olarak kabul edildi (Tablo 4.3.1.).

Sonuçların tanımlama kriteri 3'e göre değerlendirilmesi:

126 suşun 101'i (%80,1) cins düzeyinde uyumlu bulundu. 101 suşun 82'si (%65,1) tür düzeyinde de uyumlu bulunurken; 18 suş (%14,2) ise tür düzeyinde farklılık gösterdi. *Myroides* sp. suşu her iki yöntemle de tür düzeyinde tanımlanamadığı için tür düzeyinde karşılaştırma yapılamadı.

126 suşun 13'ü (%10,3) her iki yöntemde cins ve tür düzeyinde farklı tanımlandı (Tablo 4.3.1.).

Tüm kriterlere göre tür düzeyinde farklı tanımlanan suşlarda KS'nin güven aralığı ortalaması %98,11 iken; dizi analizinde benzerlik yüzdesi %98,54 idi (Tablo 4.1.1.2.). Dizi analizinde en yüksek benzerlik oranına sahip suş tanımlamada kabul edildi. Ancak iki yöntemle tür düzeyinde farklı saptanan suşlarda; dizi analizinde daha düşük benzerlik yüzdesinde KS ile aynı tür saptandı. Bu türlere karşılık gelen benzerlik yüzdelерinin ortalaması ise %97,22'dir. Sadece %1,32'lik fark olduğu görüldü (Tablo 4.1.1.2.).

Tüm tanımlama kriterlerine göre cins düzeyinde farklı bulunan 13 suşta KS % 96,06 güven değeri ile tanımlarken; dizi analizinde ortalama %98,80 benzerlik yüzdesi ile tanımlandı. Ancak iki yöntemle tür düzeyinde farklı saptanan suşlarda; dizi analizinde daha düşük benzerlik yüzdesinde KS ile aynı tür saptandı. Bu türlere karşılık gelen benzerlik yüzdelерinin ortalaması ise %76'dır. Farkın %22,80 olduğu görüldü (Tablo 4.1.2.1.).

Tablo 4.3.1. İki yöntem arasında cins ve tür düzeyindeki uyumun, üç farklı tanımlama kriteri ile değerlendirilmesi

Tanımlamalar	Tanımlama Kriteri 1	Tanımlama Kriteri 2	Tanımlama Kriteri 3
	($\geq$ %99 Tür, $\geq$ %97 Cins) n (%)	($\geq$ %97 Tür, $\geq$ %95 Cins) n (%)	Eşleşen en yüksek yüzde*n (%)
Tür düzeyinde uyumlu suş	41 (32,5)	75 (59,5)	82 (65,1)
Cins düzeyinde uyumlu suş	93 (73,8)	98 (77,7)	101 (80,1)
Tür düzeyinde uyumsuz suş	7 (5,5)	14 (11,1)	18 (14,2)
Cins düzeyinde uyumsuz suş	13 (10,3)	13 (10,3)	13 (10,3)
Tanımlanamayan suş	9	4	-

*Tüm suşlarda minimum %88 eşleşme görüldü.

4.4. Dizi Analizi Sonuçları ile Türü/Alt Türü Belirlenen Suşların KS Sonuçları ile Karşılaştırılması

- Tür düzeyi KS ile belirlenemeyen 3 adet suşun (*Lacticaseibacillus*, *Granulicatella*, *Myroides*) dizi analizi ile tür düzeyleri tanımlanırken (*Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Granulicatella adiacens*, *Myroides odoratimimus*) ($\geq$ 98 benzerlik oranı); 2 adet suşun da alttürleri *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ($\geq$ 99 benzerlik oranı) tanımlandı (Tablo 4.4.1.).

Tablo 4.4.1. 16S rRNA dizi analizi sonuçları ile türü/alt türü belirlenen suşlar

Suş No	KS	KS (%)	Dizi Analizi	Dizi Analizi (%)	BLAST Yapılan Baz Uzunluğu
1	<i>Lacticaseibacillus</i>	99,9	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99,4	709
2	<i>Granulicatella sp.</i>	99,9	<i>Granulicatella adiacens</i>	99,8	610
3	<i>Lactococcus lactis</i>	99,9	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	100,0	641
4	<i>Myroides sp.</i>	99,9	<i>Myroides odoratimimus</i>	98,2	623
5	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	99,9	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona</i>	99,2	639

KS: Kütle spektrometrisi; BLAST: Basic Local Alignment Search

4.5. Metotlara Göre Tanımlama Süreleri

Kütle spektrometrisi ile tanımlama da geçen süre 10-20 dk/suş iken; 16S rRNA dizilemesinde tanımlama için geçen süre 8-12 saat/suştur.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Zor tanımlanan mikroorganizmaların son zamanlarda artması, tedavide gecikmelere sebep olabilmekte ve mortalite oranlarının artmasına neden olmaktadır. Bu durum, konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasında zorluk çekilen bu etkenlerin tanımlanması için yeni yöntemler geliştirme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu tür mikroorganizmaların tanımlanmasında altın standart moleküler yöntemler olmakla birlikte uygulama zorlukları, maliyet gibi nedenlerden dolayı rutin laboratuvarlarda uygulanması zordur (Costa ve ark., 2022). Uzun yıllar kimya alanında kullanılan kütle spektrometrisinin, soft iyonizasyon teknikleriyle (MALDI) birleştirilmesiyle geliştirilen KS sistemi; son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasındaki yüksek hassasiyeti, uygulama kolaylığı, hızlı tanımlama yapabilmesi nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanıma girmiştir ve geleneksel tanımlamanın yerini alabilecek umut verici bir yöntem olarak kabul edilmektedir. (Cherkaoui ve ark., 2010; Eigner ve ark., 2009).

Kütle spektrometrisi ile tek bir koloniden tanımlama yapılabilmesi, örneklerde tanımlanabilen koloni sayılarının artması özellikle de polimikrobiyal üremelerde tüm isolatların aynı anda tanımlanabilmesi büyük bir avantajdır (Kostrzewa ve ark., 2019). Kütle spektrometrisinin tanımlamadaki performansını değerlendirmek amacıyla 1660 suş ile yapılan çalışmada, KS sonuçları konvansiyonel yöntemlerle (gram boyama, API, Vitek 2 sistem) karşılaştırılmış ve KS'nin tanımlama için gereken süreyi 55 kat azaltırken, maliyeti 5 kat azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda konvansiyonel yöntemlerle tanımlanabilen suş sayısından 2,5 kat daha fazla tür tanımladığını göstermişlerdir (Seng ve ark., 2013).

Özellikle tanımlanması zor, atipik biyokimyasal profil sergileyebilen veya klinikte nadir karşılaşılan bakterilerin tanımlanmasında geleneksel yöntemler yorucu ve zaman alıcı olabildiğinden hatta tüm yöntemlere rağmen tanımlanamadığından; bu suşlarda KS ile tanımlamanın önemi artmaktadır. Yeni ortaya çıkan patojenlerin tanımlanmasında da KS'nin faydalı olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir: 2011

yılında yeni bir tür olan *Elizabethkingia anophelis* KS kullanılarak tanımlanmıştır. O dönemdeki ticari tanımlama sistemleri *Elizabethkingia* türlerini güvenli bir şekilde ayırt edemezken, *E. meningoseptica* ve *E. miricola* ile yakından ilişkili olan bu tür Atlanta'daki bir veri tabanı kullanılarak KS tarafından tanımlanmıştır (Perrin ve ark., 2017). Bu durum ortaya çıkan yeni bir patojen için KS'nin hızlı bir şekilde uyarlanabildiğini, yalnızca araştırma amaçlı kullanılan RUO sisteminin veritabanının da böyle durumlarda yeni patojenleri tanımlamaya yardımcı olabildiği görülmüştür (Ceng ve ark., 2019). Rutin kullanıma girmiş olsa da özellikle nadir görülen ve tanımlanması zor olan bakterilerin tanımlanmasında, literatürde KS'nin performansını altın standart moleküler yöntemlerle karşılaştıran çok az sayıda çalışma mevcuttur (Lau ve ark., 2014; Ye ve ark., 2018).

Dizi analizini referans yöntem kabul ederek KS'nin performansını değerlendiren çalışmalarda: Naifang ve ark. yaygın olmayan/tanımlanması zor 180 klinik izolatta KS'nin suşların %84,4'ünü tür düzeyinde doğru bir şekilde tanımladığı, %12,8'i yalnızca cins düzeyinde tanımladığını belirttiler. %1,7 izolat yanlış tanımlanırken, %1,1 izolat tanımlanamamıştır (Ye ve ark., 2018). Lau ve ark. fenotipik testlerle tanımlanması zor olan 67 bakteri ile yaptıkları çalışmada suşların %45'i tür düzeyinde KS ile doğru bir şekilde tanımlanırken, %30'u yalnızca cins düzeyinde tanımlanmıştır. %6'sında izolat yanlış tanımlanırken, %19'unda tanımlama yapılamamıştır (Lau ve ark., 2014). Bizzini ve ark. zor tanımlanan 410 bakteriyel suş ile yaptıkları çalışmada suşların %62'sini tür düzeyinde uyumlu bulurken, %9,6'sını yalnızca cins düzeyinde uyumlu bulmuşlardır. İzolatların %32,4'ünde güvenilir bir tanımlama elde edememişlerdir (Bizzini ve ark., 2011). Costa ve ark. 97 suş ile yaptıkları çalışmalarında KS %27,84'ünü tür düzeyinde; %47,42'sini cins düzeyinde tanımlamıştır. İki (%2,06) suş yanlış tanımlanırken, %22,68 izolat tanımlanamamıştır (Costa ve ark., 2022). Yapılan bu çalışmalarda uyum oranlarında büyük farklılıklar görülmektedir. Çünkü Naifang Ye ve ark ile A. Bizzini ve ark dizi analiz sonuçlarını değerlendirirken tür/cins düzeyinde tanımlamada bir sınır değer belirlemezken; Costa ve ark. çalışmalarında tür düzeyinde tanımlamada $\geq 98,7$; cins düzeyinde tanımlamada ≥ 96 benzerlik oranını sınır değer kabul etmiş; Lau SKP ve ark. ise tür düzeyi için $\geq 99\%$ sınır değerini baz alırken, cins düzeyinde sınır değer

belirlememişlerdir (Bizzini ve ark., 2011; Costa ve ark., 2022; Lau ve ark., 2014; Ye ve ark., 2018).

Dizi analizinin değerlendirildiği farklı çalışmalarda farklı kesme yüzdeleri kullanılmıştır: Drancourt ve ark. çevresel ve klinik olarak tanımlanamayan bakterilerde 16S rDNA dizi analizinin faydasını değerlendirirken tür ve cins tanımlaması için sırasıyla $>99\%$ ve $>97\%$ dizi benzerliklerini sınır değer alırken; bazı çalışmalar tür düzeyi için 97% benzerlik düzeyini önermektedir. (Drancourt ve ark., 2000; Stackebrandt ve Goebel, 1994). Janda ve Abbott, tür tanımlaması için kriter olarak minimum $>99\%$ ve ideal olarak $>99,5\%$ dizi benzerliğinin kullanılmasını önermişlerdir (Janda ve Abbott, 2007). Dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde sınır değer kullanılmayan başka çalışmalar da mevcuttur (Tang ve ark., 1998).

Çalışmamızda dizi analizi sonuçlarını değerlendirmede net bir eşik değer mevcut olmaması nedeni ile farklı tanımlama kriterleri oluşturarak sonuçlarımızı değerlendirdik. Bu açıdan çalışmamız literatürde bu konuda yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır ve elde ettiğimiz veriler dizi analiz çalışmalarında yol gösterici olacaktır.

Çalışmamızda farklı tanımlama kriterlerine göre cins/tür düzeyinde uyumlu/uyumsuz suş oranları değişiklik gösterdi. Tür düzeyinde tanımlama için $\geq 99\%$, cins düzeyinde tanımlamada $\geq 97\%$ benzerlik oranı sınır değer kabul edildiğinde (TK1); cins düzeyinde $73,8\%$; tür düzeyinde $32,5\%$ oranında uyum saptandı. Tür tanımlama için $\geq 97\%$, cins düzeyinde tanımlamada $\geq 95\%$ benzerlik oranı sınır değer kabul edildiğinde (TK2); hem cins ($77,7\%$) hem tür düzeyinde ($59,5\%$) uyum oranında artış saptandı. İki yöntem arasındaki cins ve tür düzeyindeki en yüksek uyum tanımlama için herhangi bir sınır değer belirlenmediğinde (TK3) görüldü (cins düzeyinde $80,1\%$; tür düzeyinde $65,1\%$). Her 3 kriterde de cins düzeyinde yanlış tanımlama oranı $10,3\%$ idi (Tablo 4.3.1.).

Çalışmamızda saptadığımız uyum oranlarını değerlendirdiğimizde; TK1’de diğer çalışmalara kıyasla düşük uyum oranları mevcuttu (Lau ve ark., 2014; Ye ve ark.,

2018). Tanımlama kriteri 2’de bazı çalışmalara göre uyum oranları yüksek iken, bazı çalışmalara göre düşük bulundu (Bizzini ve ark., 2011; Costa ve ark., 2022). Tanımlama kriteri 3’de ise genel olarak diğer çalışmalara göre yüksek uyum oranlarının olduğu görüldü (Bizzini ve ark., 2011; Costa ve ark., 2022; Lau ve ark., 2014). Karşılaştırılan çalışmalarla uyum oranlarımızdaki farklılığın, diğer çalışmalarda net bir kriter belirlenememiş olmasından kaynaklandığını düşündük.

Çalışmamızda tür/cins düzeyinde tanımlanan suş sayılarının 3 kritere göre değişiklik göstermesi, uyum oranlarının da değişmesine sebep olmuştur (Tablo 4.2.1.; Tablo 4.3.1.). Örneğin çalışmamızda dizi analizinde %98,25 benzerlik oranıyla tür düzeyinde tanımlanan *Sphingobacterium multivorum* suşu; tanımlama kriteri 1’de benzerlik yüzdesi tür tanımlaması için gereken eşiğin ($\geq$ %99) altında olduğundan cins düzeyinde tanımlanabildi. Ancak bu suş tanımlama kriteri 2’ye göre tür tanımlanması için gereken eşiğin ($\geq$ %97) üstünde olduğundan tür düzeyinde tanımlandı. Suşların %38,8’i (49/126) dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanmasına rağmen kriter 1 de cins düzeyinde tanımlandı. Kriter 2’ ye göre ise sadece 6 suş (%0,05) tür düzeyinde tanımlanmasına rağmen cins düzeyinde tanımlandı. Kriterlerin sınır değeri yükseldikçe, tür düzeyinde tanımlanan suş sayısı azalırken, cins düzeyinde tanımlanan suş sayısı arttı. Tanımlamada sınır değer yükseldikçe, sonuçların her ne kadar daha güvenilir olduğu düşünülse de tür düzeyinde tanımlanabilen suş sayısında belirgin bir kayıp olmaktadır (Janda ve Abbott, 2007).

Literatürde halen tanımlamada kabul edilebilir sınır değer konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır (Drancourt ve ark., 2000; Janda ve Abbott, 2007; Stackebrandt ve Goebel, 1994). Dizi analizi ile bakteri tanımlanmasında net bir eşik değer olmaması, çalışmalarda belirlenen sınır değerlerin birbirinden farklılık göstermesi veya sınır değer kullanılmaması, sonuçların sağlıklı bir şekilde kıyaslanmasını önlemektedir (Costa ve ark., 2022; Drancourt ve ark., 2000; Tang ve ark., 1998). Bu durum çalışmalarda bakterilerin tür/cins düzeyinde tanımlanmasında farklı uyum oranlarının görülmesini açıklayabilmekte ve dizi analizi ile güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için sonuçların değerlendirilmesinde belli bir standart oluşturulması gerektiğini göstermektedir (Drancourt ve ark., 2000; Lau ve ark., 2014; Ye ve ark., 2018).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar da diğer çalışmalarla benzer şekilde oluşturulan kriterlere göre dizi analiz sonuçlarının değiştiğini, sonuçların doğru bir şekilde yorumlanması ve yapılan çalışmalar ile sağlıklı bir şekilde kıyaslanabilmesi için standart bir tanımlama kriterinin belirlenmesi gerektiğini gösterdi.

Dizi analizi ile ilgili yapılan çalışmalarda benzer dizilere sahip olup bir sonraki en yakın tür eşleşmesi ile arasında %0,5-1 fark bulunan sonuçlarda net bir tür belirlemenin çok zor olduğu belirtilmektedir (Palys ve ark., 1997; Woo ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da 15 suş (%11,9) tür düzeyinde farklı tanımlandı. Ancak dizi analiz sonuçlarında bu suşlar için daha düşük benzerlik yüzdesinde KS ile aynı tür tanımlandı. Bu suşlarda dizi analizinde iki tür arasındaki benzerlik yüzdelерinin farkının %1,32 olduğu görüldü (Tablo 4.1.1.2.).

Janda ve Abbott çalışmalarında bir sonraki en yakın türe ait yüzdelik fark <%0,5 (>%99,5 benzerlik) olan eşleşmeler için, bu kadar küçük farklılıklarda, en yüksek benzerlik oranına sahip eşleşmenin kesin tanımlama olarak kabul edilmesinin yanlış olabileceğini söylediler ve nihai tür tanımlamasında fenotip gibi diğer başka özelliklerin dikkate alınması gerektiğini önerdiler (Janda ve Abbott, 2007). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda her iki yöntemin tür düzeyinde farklı tanımladığı 15 suşa; KS'nin tanımladığı türlerin benzerlik yüzdeleri, dizi analizinde eşleşen en yüksek benzerlik oranına çok yakın olduğundan (%1,32); KS'in tür düzeyinde bu suşları doğru tanımlayıp tanımlamadığının net olarak belirlenebilmesi için için tüm genom analizine ihtiyaç vardır. Çalışmamızda cins düzeyinde farklı tanımlanan 13 suşta (%10,3) ise Dizi analizinde iki cinsin benzerlik yüzdesi arasındaki farkın %22,80 olduğu görüldü (Tablo 4.1.2.1.). Bu farkın tür düzeyinde farklı tanımlanan suşlarda mevcut olan farktan çok daha büyük olduğu görüldü.

Cins düzeyinde tanımlamada yapılan bu hatalar bazen tedavi açısından yanlış uygulamalara neden olabilmektedir (Thaden ve ark., 2017). Çalışmamızda cins düzeyinde farklı saptadığımız suşlardan 5'i (5/13) taksonomik olarak aynı aileye ait iken 8 suş ise filogenetik açıdan birbirine çok daha uzaktı.

Aynı filogenetik aileye mensup olan suşlardan 4'ü Enterobacteriaceae ailesinden iken 1'i Bacillaceae ailesindendi. Kütle spektrometrisinin *Pluralibacter gergoviae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Leclercia adecarboxylata* olarak tanımladığı 3 suş, dizi analizinde sırası ile yine aynı aileden olan *Lelliottia aquatilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cancerogenus* olarak tanımlandı. *Franconibacter helveticus* suşu ise dizi analizinde Enterobacteriaceae ailesinden olan 4 suş arasında kaldı. Yapılan çalışmalarda, dizi analizinin enterik bakterileri tanımlamasında yetersiz kalabildiği bildirilmiştir (Mollet ve ark., 1997). *Enterobacter* türleri ile *Escherichia coli* arasında net ayırım yapılamadığı, *Enterobacter* ve *Pantoea* izolatlarını tür düzeyinde tanımlamada başarısız olduğu bildirilmiştir (Janda ve Abbott, 2007; Drancourt ve ark., 2000). Aynı zamanda taksonomik değişiklikler bakterilerin isimlendirilmesinde ve gruplandırılmasında değişikliklere neden olmaktadır. Örneğin, *Raoultella ornithinolytica* 2001 yılına kadar *Klebsiella ornithinolytica* olarak adlandırılırken 2001'de *Raoultella* olarak yeniden adlandırılmıştır (Hajjar ve ark., 2020). GenBank'ta çok sayıda doğrulanmamış 16S rDNA dizisi mevcut olduğu bilinmektedir; *Routella* cinsine ait GenBank veritabanı güncellenmemiş olabilir (Woo ve ark., 2008). Bu açıdan bakıldığında çalışma sonucumuz GenBank'ın veritabanının güncellenmesine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Yukarıda belirttiğimiz tüm bu nedenler saptadığımız farklılıklara sebep olmuş olabilir. Bu nedenle bu tür suşlarda dizi analiz sonuçlarını yorumlarken dikkatli olunmalıdır.

Kütle spektrometrisinin *Peribacillus simplex* olarak tanımladığı suş dizi analizi ile *Bacillus sp.* olarak tanımlandı. İkisi de gram pozitif sporlu basildi ve *Peribacillus simplex* başlangıçta *Bacillus* cinsinin bir parçası iken, *Bacillus*'un etrafındaki veya yakınındaki bir cinsi ifade eden "Peri-" ön ekini alarak zamanla ayrılmıştır (Patel ve Gupta, 2020). Ancak çalışmalarda dizi analizinde GenBank'ta çok az *Bacillus* dizisinin mevcut olması, *Bacillus* türlerinin aynı 16S rDNA dizilerine sahip olabilmesi nedeni ile *Bacillus* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasında zorluk yaşanıldığı bildirilmiştir (Ash ve ark., 1991; Drancourt ve ark., 2000) Çalışmamızda karşılaştığımız farklılığın bu nedenden kaynaklanmış olabileceğini düşündük. Ancak bu suşlar filogenetik açıdan birbirine yakın olduğundan tedavide seçilecek

antimikrobiyal ajanlarda çok fazla bir değişiklik olması beklenmemektedir (Thaden ve ark., 2017). Filogenetik açıdan çok daha uzak olan suşlarda ise hatalar tedaviye yanlış yön verebilir ve tedavi başarısızlığına sebep olabilir (Hisamoto ve ark., 2022; Natsis ve Cohen, 2018).

Kütle spektrometrisi kütüphanesindeki çok fazla bakteriyi tanımlayabilme özelliğine sahip olmakla birlikte benzer kütle spektrumlarına sahip bakteriler ile yakından ilişkili bakteri gruplarını doğru tanımlamada güçlük yaşayabildiği bilinmektedir (Chen ve ark., 2021). Örneğin, MS V3.2 veritabanında *Shigella* sp. ve *E. coli* O157 şüphesi olduğu zaman, *Escherichia coli* ve *Shigella* izolatları arasında ayırım yapılamadığını; bu nedenle gerek duyulduğunda serolojik testler kullanılarak doğrulanması gerektiği belirtilmiştir (Devanga ve ark., 2017). Örneğin *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter asburiae*'nin; *Aeromonas hydrophila* ile *Aeromonas caviae*'nin KS ile ayırt edilemediği, *Myroides* türlerinin KS ile tür düzeyinde tanımlanamadığı bilinmektedir (Ye ve ark., 2018). Kötü spektrumlar, yetersiz pik düzeyleri veya çok fazla pik varlığında birden fazla cins arasında kalabilmekte veya tanımlama yapamayabilmektedir (iyi bir spektrum olsa dahi). Çalışmamızda KS'nin farklı yüzdelere vererek arada kaldığı toplam 12 suş (12/126) bulundu. Dizi analizi 12 suşun 10'unda (%83,3) KS'nin cins düzeyinde doğru tanımladığını gösterdi (Tablo 4.1.3.1.). Kütle spektrometrisinin *A. xylosoxidans* /*A. dentrificans* ayırımını yapamadığı 3 suş mevcuttu. Bu suşlar dizi analizi ile *A. xylosoxidans* olarak tanımlandı. Bu durum bakterinin genomik yapısı nedeniyle benzer kütle spektrumlarına sahip olmasından kaynaklanmış olabilir. Naifang ve ark. bizimle benzer şekilde bu suşlarda KS'nin arada kaldığını, dizi analiziyle *A. xylosoxidans* olarak tanımlandığını bildirmişlerdir (Ye ve ark., 2018). Kütle spektrometrisinin arada kaldığı suşların GenBank'taki benzerlik yüzdeleri kıyaslandığında, *Parvimonas micra* suşu hariç hepsinde en fazla %2'lik bir fark (5'i <%0,5 fark) bulunuyordu. Örneğin *C. gleum*/*C. indologenes* suşunda dizi analizinde *C. gleum* %98,92; *C. indologenes* ise %97,43 benzerlik oranına sahipti ve %1,49'luk bir fark bulunuyordu. Bu çok yakından ilişkili türlerde benzer kütle spektrumlarının mevcut olması KS'nin net tür ayırımı yapamamasını açıklayabilir. Kütle spektrometrisinin arada kaldığı *Parvimonas micra* / *Cupriavidus necator* suşunda ise dizi analizi *Citrobacter koseri* (%99,33) olarak tanımladı. *P.*

Micra ile *C. Koseri*'nin dizi analizindeki benzerlik yüzdeleri kıyaslandığında diğer suşların aksine %11.77'lik daha yüksek bir fark olduğu görüldü.

Kütle spektrometrisi çeşitli sebepler nedeni ile bazen mikroorganizmaları tanımlayamamaktadır. Yapılan çalışmalarda suşların KS ile tanımlanamama oranı %1'den %19'a kadar değişiklik göstermektedir (Lau ve ark., 2014; Ye ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda ise 10 suş (%7,9) KS ile tanımlanamadı. Kütle spektrometrisi ile suşları tanımlayamamanın nedenlerinden biri tanımlanmak istenen suşa ait referans spektrumunun veri tabanında mevcut olmamasıdır. Dizi analizi ile tanımlanabilen 2 tür (*Delftia lacustris*, *Flavobacterium lindanitolerans*), KS veritabanında mevcut değildi. Kütle spektrometrisinin tanımlayamadığı 2 suşta da dizi analizi ile cins ayrımı yapamadı. Dizi analizinin ayrım yapamadığı cinslerden biri (*Afipia broomeae*, *Actinomyces bacterium*) KS veritabanında mevcut değildi. *Oligella urethralis* ile *Helcococcus kunzii* ise KS veritabanında mevcut olmasına rağmen tanımlanamadı. Bu suşlarda referans spektrum mevcut olmasına rağmen KS'nin tür içinde biyoçeşitlilik gösteren bakteri gruplarını tanımasına yeterli olacak sayıda spektrumun bulunmaması tanımlanamama nedeni olabilir (Seng ve ark., 2013). Seng ve ark. yaptıkları çalışmada; *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* ve *Nocardia* suşlarında KS'de referans spektrumları olmasına rağmen bu suşları tanımlayamadığını ve bu nedenle moleküler tanımlamaya ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir (Seng ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda da KS ile tanımlanamayan 4 suşun dizi analizi ile *Enterococcus sp.*, *Nocardia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* cinslerine ait olduğu görüldü. Referans spektrumu bulunan suşlarda yeterli protein sinyalinin elde edilememesi de suşun kütle spektrumu oluşturulamamasına neden olabilir ve veritabanıyla karşılaştırılamadığı için yine bir tanımlama yapılamayabilir. Bazı bakterilerin sahip olduğu hücre yapı özellikleri nedeniyle KS tanımlamada zorluk yaşayabilmektedir. Örneğin *Corynebacterium sp.* gibi gram pozitif basillerin hücre duvar yapısı nedeniyle yeterli spektrum oluşturulamamakta ve tanımlama yapamamaktadır (Bizzini ve ark., 2010). Kütle spektrometrisinin bakteri tanımlayamama sebeplerinden biri de özellikle nazlı büyüyen bakterilerin az miktarda koloni oluşturabilmeleri ve KS ile tanımlamada protein ekstraksiyonu aşamasını etkilemeleri olabilir. Bu nedenle özellikle bu bakterilerin protein ekstraksiyon

aşamasında ekstra bazı optimizasyon işlemleri yapmak gerekebilir (Bizzini ve ark., 2010).

Dizi analizi (16S rRNA geni) bakterilerin tanımlanmasında ve özellikle KS ile tanımlanamayan suşların taksonomilerinin aydınlatılmasında altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte literatürde tür/cins düzeyinde farklı tanımlama oranları bildirilmiştir (Mignard ve Flandrois, 2006; Woo ve ark., 2003). Çalışmalar incelendiğinde; 16S rRNA gen dizilemesinin genel olarak >%90 cins tanımlaması sağladığı; %65 ila %83 arasında tür tanımlaması yapabildiği; analiz sonunda izolatların %1 ila %14'ünün tanımlanamadan kaldığını göstermektedir (Drancourt ve ark., 2000; Janda ve Abbott, 2007). Çalışmamızda elde ettiğimiz dizi analizi sonuçları da diğer çalışmalar ile uyumlu idi; dizi analizi suşların %94,4'ünü cins düzeyinde tanımlarken; %78,5'ini tür düzeyinde tanımladı. Suşların %14,2'sinde aynı benzerlik oranları vererek net bir tür ayrımı yapamazken; %5,5'inde ise cins düzeyinde net bir ayrım yapamadı.

Dizi analizinde aynı benzerlik yüzdelerine sahip olup net bir tür ayrımı yapılamayan 17 suşun 7'sinde (%41,1); KS referans yöntemden daha iyi performans göstererek bu suşlarda türler arasında ayrım yapabilmiştir (*Herbaspirillum huttiense* (2), *Nocardia farcinica* (2), *Aerococcus urinae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Delftia acidovorans*). Yapılan başka çalışmada da 16S rRNA gen dizilimi ile yalnızca cins düzeyinde tanımlayabildiği 21 izolatın 12'si (%57,1) için MALDI Biotyper® cihazı ile yaptıkları çalışmada KS'nin yüksek güvenilirlik ($\geq 2,0$ log(skor)) ile tür sonucu verdiği bildirilmiştir (Mellmann ve ark., 2008). Dizi analizinde tür düzeyinde tanımlanmasında çeşitli sebepler nedeniyle zorluklar yaşanabilmektedir (Woo ve ark., 2008). Nükleotid veri tabanlarına çok az sayıda dizinin kaydedilmiş olması, bir komplekse ait genom varlıkları isimlendirmede yaşanan sıkıntılar ile yeni taksonların ortaya çıkışı tanımlamanın tür düzeyine kadar gidebilmesini zorlaştırabilmektedir (Janda ve Abbott, 2007). Bazı türlerin benzer veya özdeş 16S rRNA dizilerini paylaşmaları da dizilemede 16S rRNA gen bölgesinin kullanılması da tür düzeyinde tanımlama da hatalara neden olmaktadır (Bartoš ve ark., 2024). Bartoš ve ark. tüm genom düzeyinde ayrımı yapılmış farklı türlerin özdeş 16S rRNA kopyalarına

(> 99.9% benzerlik) sahip olduğu 179 suş tespit etmişlerdir (Bartoš ve ark., 2024). Çok yavaş bir evrimleşme süreci olsa da 16S gen bölgesinin de cins ve tür düzeyinde yatay transferinin mümkün olduğunu belirtmiş; 16S rRNA mevcut özellikleri sayesinde değerli bir belirteç olmasına rağmen, yakından ilişkili taksonları filogenetik olarak sınıflandırmada 16S rRNA'nın cins düzeyinin ötesinde uygulanabilirliğini sorgulamışlardır (Bartoš ve ark., 2024). Bu nedenle dizi analiz yöntemlerinde 16S rRNA dizilemesinin sınırlamaları göz önünde bulundurulmalı ve neredeyse aynı 16S rDNA dizisini paylaşan bakteri gruplarında gerekirse farklı hedef genler (*groEL* ve *tuf* vb.) tanımlamada kullanılmalı veya tüm genom analizi yapılmalıdır (Peng ve ark., 2020). Aynı zamanda GenBank'ta çok sayıda doğrulanmamış 16S rDNA dizisi mevcuttur ve analiz yapacak kişi program parametrelerini değerlendirmede yeterince tecrübeli değilse bu sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabilir (Woo ve ark., 2008). Drancourt ve ark. aynı dizileri farklı programlar kullanarak aynı veritabanıyla karşılaştırdıklarında farklı benzerlik sonuçları elde ettiklerini ve bunun sonucunda farklı kimliklerin atandığını; dizi değerlendirme ve analizi ile ilgili kullanılan programların boşluk atayıp atamamasına göre benzerlik sonuçlarını etkileyebileceğini belirttiler (Drancourt ve ark., 2000). Çünkü benzerlik puanları, analiz edilen dizilerin uzunluklarına ve benzerliği optimize etmek için sorgu dizisine eklenen boşluk sayısına bağlıdır.

Dizi analizinde doğru sonuçlar elde edilebilmesi için BLAST yapılan baz uzunluğu da önem arz etmektedir. Metagenomik dizi analizlerinde değişken 5' bölgesini içine alan minimum 500–525 bp'lik bölgelerin bakterilerin tanımlanması için yeterli olabileceği bilinmektedir (Janda ve Abbott, 2007). Bizim çalışmamızda da 104 suşun (%82,5) BLAST yapılan dizi uzunluğu 500 bp'nin üzerinde idi. Ancak dizi uzunluğu 500 bp'nin altında olan 22 suş (%17,4) vardı ve bu suşlarda veri elde edilebildiğinden (17 suş tür düzeyine kadar tanımlandı) çalışmamızda değerlendirme dışı bırakılmadı. Blast yapılan baz uzunluğunun kısa olmasının, 4 suшта tür düzeyinde net ayırım yapılamamasına (3 suş *Herbaspirillum* sp'ye ait), 1 suшта ise cins düzeyinde ayırım yapılamamasına (*Phytobacter* sp./*Enterobacteriaceae* bacterium/*Enterobacter* sp./*Pantoea* sp.) neden olduğunu düşünüyoruz. Bu suşlarda sonuçların daha güvenilir

bir şekilde elde edilmesi için daha uzun bir dizileme veya tüm genom analizi yapmak gerekmektedir (Janda ve Abbott, 2007).

Çalışmanın sınırlamaları

Çalışmamızın bazı sınırlamaları da vardır. Çalışmaya dahil ettiğimiz suş sayısı (126) yeterli olmakla birlikte bu suşlar nadir veya tanımlanması zor bakterilerdi. Çalışılan türlere ait birden fazla suş çalışmaya dahil edilemedi. Çalışmamızın diğer bir sınırlamasını 16S rRNA gen bölgesinin tamamını dizilenememesi oluşturdu. Suşların 16S rRNA gen bölgesinin yalnızca V1-V5 bölgesi (~800 bp) çoğaltılarak dizilendi. Dizi analizinin tür veya cins düzeyinde ayırım yapamadığı 27 suшта (%21,4) farklı bir yöntem kullanamamış olmamız çalışmamızın diğer bir eksik yönünü oluşturmaktadır.

Sonuç olarak,

- Kütle spektrometrisi ile dizi analiz sonuçları arasındaki uyum oranlarının farklı tanımlama kriterlerine göre farklılık göstermesi (TK1’de düşük; TK 2’de kısmen daha yüksek; TK 3’de ise en yüksek); KS ve dizi analizi yöntemlerinin sağlıklı bir şekilde kıyaslanabilmesi için dizi analiz sonuçlarında standart bir tanımlama kriterlerinin belirlenmesine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.
- Dizi analizi ile bakteriler, deneyimli personel ile yoğun bir ön hazırlık aşamasından sonra yaklaşık olarak 8-12 saatte tanımlanırken; KS ile kolay bir ön hazırlık aşamasından sonra ortalama 10-20 dakika gibi kısa bir sürede tanımlanabilmiştir.
- Dizi analizi yöntemlerinin pahalılığı, yoğun iş yükü gerektirmesi, rutinde kullanılan sistemlere entegrasyonlarının zor oluşu ile rutinde uygulanabilirliği kısıtlı iken, KS cihazları laboratuvarındaki iş akışını büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır.
- Rutinde sıklıkla izole edilen bakterilere ek olarak nadir/tanımlanması zor suşlarda da KS’nin kullanımı büyük yarar sağlamakta ancak bu konuda yapılan çalışmalarda uyumsuz bulunan suşlar ile rutinde karşılaşıldığında daha dikkatli olunmalı veya ek testlere başvurulmalıdır.

- Bu nedenle çalışmamız literatüre büyük katkı sağlayacaktır ve nadir görülen/tanımlanması zor bakterilerde KS'nin duyarlılığını araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



6. KAYNAKLAR

- Escalante, A. E., Barbolla, L. J., Ramírez-Barahona, S., & Eguiarte, L. E. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 85(4), 1249–1264. <https://doi.org/10.7550/rmb.43498>
- Angeletti S. (2017). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of microbiological methods*, 138, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
- Anhalt, J. P., & Fenselau, C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 47(2), 219–225. <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>
- Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International journal of systematic bacteriology*, 41(3), 343–346. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-343>
- Austin B. (2017). The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1247–1256. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0840-8>
- Bartoš, O., Chmel, M., & Swierczková, I. (2024). The overlooked evolutionary dynamics of 16S rRNA revises its role as the "gold standard" for bacterial species identification. *Scientific reports*, 14(1), 9067. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59667-3>
- Behera, H. S., Chayani, N., Bal, M., Khuntia, H. K., Pati, S., Das, S., & Ranjit, M. (2021). Identification of population of bacteria from culture negative surgical site infection patients using molecular tool. *BMC surgery*, 21(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12893-020-01016-y>
- Bilgehan H. (1999) Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 9.baskı. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, s: 315-320
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., & Prod'hom, G. (2010). Performance of Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1549–1554. <https://doi.org/10.1128/jcm.01794-09>
- Bizzini, A., Jaton, K., Romo, D., Bille, J., Prod'hom, G., & Greub, G. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of clinical microbiology*, 49(2), 693–696. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-10>

Bruijns, B., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39(21), 2642–2654. <https://doi.org/10.1002/elps.201800082>

Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M., & Railean-Plugaru, V. (2017). Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1607–1623. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0207>

Cahais, V., Gayral, P., Tsagkogeorga, G., Melo-Ferreira, J., Ballenghien, M., Weinert, L., Chiari, Y., Belkhir, K., Ranwez, V., & Galtier, N. (2012). Reference-free transcriptome assembly in non-model animals from next-generation sequencing data. *Molecular ecology resources*, 12(5), 834–845. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03148.x>

Carpenter, R. E., Tamrakar, V. K., Almas, S., Sharma, A., Rowan, C., & Sharma, R. (2023). Optimization of the Illumina COVIDSeq™ protocol for decentralized, cost-effective genomic surveillance. *Practical laboratory medicine*, 34, e00311. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2023.e00311>

Carroll, K. C., Borek, A. P., Burger, C., Glanz, B., Bhally, H., Henciak, S., & Flayhart, D. C. (2006). Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 44(6), 2072–2077. <https://doi.org/10.1128/JCM.02636-05>

Chen, X. F., Hou, X., Xiao, M., Zhang, L., Cheng, J. W., Zhou, M. L., Huang, J. J., Zhang, J. J., Xu, Y. C., & Hsueh, P. R. (2021). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. *Microorganisms*, 9(7),1536. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071536>

Cheng, Y., Perng, C., Jian, M., Cheng, Y., Lee, S., Sun, J., & Shang, H. (2018). Multicentre study evaluating matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of clinically isolated *Elizabethkingia* species and analysis of antimicrobial susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(3), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.015>

Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., & Schrenzel, J. (2010). Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1169–1175. <https://doi.org/10.1128/jcm.01881-09>

Church G. M. (2006). Genomes for all. *Scientific American*, 294(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0106-46>

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine

Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical microbiology reviews*, 33(4), e00053-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>

Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>

Clarridge J. E., 3rd (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>

Janet A. Hindler, Audrey N. Schuetz (2018). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; MM18-A2 approved guideline. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA

Costa, L. V. D., Miranda, R. V. D. S. L., Fonseca, E. L. D., Gonçalves, N. P., Reis, C. M. F. D., Frazão, A. M., Cruz, F. V., Brandão, M. L. L., Ramos, J. N., & Vieira, V. V. (2022). Assessment of VITEK® 2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility. *Journal of microbiological methods*, 194, 106419. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106419>

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>

Çırak, Meltem Yalınay. (2010). Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization time-of- flight, Mass Spectrometry (MALDI- TOF MS) (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi). Türkiye: Ankara Gazi Üniversitesi

Dahm R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology*, 278(2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>

Daniel, F., Kesterson, D., Lei, K., Hord, C., Patel, A., Kaffenets, A., Congivaram, H., & Prakash, S. (2022). Application of Microfluidics for Bacterial Identification. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 15(12), 1531. <https://doi.org/10.3390/ph15121531>

Devanga Ragupathi, N. K., Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Inbanathan, F. Y., & Veeraraghavan, B. (2017). Accurate differentiation of Escherichia coli and Shigella serogroups: challenges and strategies. *New microbes and new infections*, 21, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.09.003>

Deveci, A., & Coban, A. Y. (2014). Optimum management of *Citrobacter koseri* infection. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(9), 1137–1142. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.944505>

Dönmez, D., Şimşek, Ö., & Kaçar, Y. A. (2015). Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. <https://derleme.gen.tr/index.php/derleme/article/view/268>

Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J., & Raoult, D. (2000). 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623–3630. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3623-3630.2000>.

Eigner, U., Holfelder, M., Oberdorfer, K., Betz-Wild, U., Bertsch, D., & Fahr, A. (2009). Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *PubMed*, 55(7–8), 289–296. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19894408>

Eren, K., Taktakoğlu, N., & Pirim, I. (2022). DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian journal of medicine*, 54(Suppl1), 47–56. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280>

Fairfax M.R., Salimnia H. (2010). Quantitative PCR: an introduction. In: Grody W.W., Strom C., Kiechle F.L., editors. Handbook of molecular diagnostics. Academic Press; London: pp. 3–14.)

Fairfax, M. R., Bluth, M. H., & Salimnia, H. (2018). Diagnostic Molecular Microbiology: A 2018 Snapshot. *Clinics in laboratory medicine*, 38(2), 253–276. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.02.004>

Fegan, M., Francis, P., Hayward, A. C., Davis, G. H., & Fuerst, J. A. (1990). Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6), 1143–1146. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1143-1146.1990>

Fontana, C., Favaro, M., Pelliccioni, M., Pistoia, E. S., & Favalli, C. (2005). Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. *Journal of clinical microbiology*, 43(2), 615–619. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.615-619.2005>

Funke, G., Monnet, D., deBernardis, C., von Graevenitz, A., & Freney, J. (1998). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), 1948–1952. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.7.1948-1952.1998>

Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(4), 427. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>

Garcia-Garrote, F., Cercenado, E., & Bouza, E. (2000). Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 38(6), 2108–2111. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.6.2108-2111.2000>

Garrido-Cardenas, J. A., Garcia-Maroto, F., Alvarez-Bermejo, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2017). DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors* (Basel, Switzerland), 17(3), 588. <https://doi.org/10.3390/s17030588>

Griffiths J. (2008). A brief history of mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(15), 5678–5683. <https://doi.org/10.1021/ac8013065>.

Grohs, P., Remaud, E., Lath, C., Vuong, K., Parolini, M. L., Dannaoui, E., & Podglajen, I. (2023). Comparison of the New VITEK MS PRIME System with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper Microflex LT for the Identification of Microorganisms. *Annals of laboratory medicine*, 43(6), 574–584. <https://doi.org/10.3343/alm.2023.43.6.574>

Gürsoy NC, Otlu B. (2017). Mikrobiyotada Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri. *J Biotechnol and Strategic Health Res.*;1 (Special issue): 56-67

Hajjar, R., Ambaraghassi, G., Sebahang, H., Schwenter, F., & Su, S. H. (2020). *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and Resistance. *Infection and drug resistance*, 13, 1091–1104. <https://doi.org/10.2147/IDR.S191387>

Hanna, G. J., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Richman, D. D., Martinez-Picado, J., Sutton, L., Hazelwood, J. D., & D'Aquila, R. T. (2000). Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2715–2721. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2715-2721.2000>

Hardin SH. (2001) DNA sequencing. *Encycl Life Sci.*;291:1304 1351.

Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 137(9), 1296–1303. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>

Harvey, N. R., Albury, C. L., Stuart, S., Benton, M. C., Eccles, D. A., Connell, J. R., Sutherland, H. G., Allcock, R. J. N., Lea, R. A., Haupt, L. M., & Griffiths, L. R. (2019). Ion torrent high throughput mitochondrial genome sequencing (HTMGS). *PloS one*, 14(11), e0224847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224847>

Hisamoto, T., Hirabayashi, M., Nakatani, M., Akiyama, Y., Takehana, A., Jikuya, S., Nakashima, C., Shimoyama, H., & Kuwano, Y. (2022). Subcutaneous abscess in the shoulder caused by *Prevotella bivia* infection. *Anaerobe*, 76, 102609. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102609>

Hue-Roye, K., & Vege, S. (2008). Principles of PCR-based assays. *Immunohematology*, 24(4), 170–175.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>

Jeong, J., Yun, K., Mun, S., Chung, W. H., Choi, S. Y., Nam, Y. D., Lim, M. Y., Hong, C. P., Park, C., Ahn, Y. J., & Han, K. (2021). The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology. *Scientific reports*, 11(1), 1727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80826-9>

Jesumirhewe, C., Ogunlowo, P. O., Olley, M., Springer, B., Allerberger, F., & Ruppitsch, W. (2016). Accuracy of conventional identification methods used for Enterobacteriaceae isolates in three Nigerian hospitals. *PeerJ*, 4, e2511. <https://doi.org/10.7717/peerj.2511>

Kaushal, S., Priyadarshi, N., Garg, P., Singhal, N. K., & Lim, D. K. (2023). Nano-Biotechnology for Bacteria Identification and Potent Anti-bacterial Properties: A Review of Current State of the Art. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(18), 2529. <https://doi.org/10.3390/nano13182529>

Kostrzewa, M., Nagy, E., Schröttner, P., & Pranada, A. B. (2019). How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria - the rare and the unknown. *Expert review of molecular diagnostics*, 19(8), 667–682. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1643238>

Lau, S. K., Tang, B. S., Teng, J. L., Chan, T. M., Curreem, S. O., Fan, R. Y., Ng, R. H., Chan, J. F., Yuen, K. Y., & Woo, P. C. (2014). Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories. *Journal of clinical pathology*, 67(4), 361–366. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201818>

Liao, J., Wang, H., Zhou, S., Liu, Y., Zhao, X., & Pan, Y. (2023). α -Cyano-3-aminocinnamic acid: A novel reactive matrix for qualitative and quantitative analysis of plant N-glycans by MALDI-MS. *Analytica chimica acta*, 1283, 341970. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341970>

Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J., & Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1681–1686. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1681-1686.2002>

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R. C., Ristic, M., Cox, D., & McDade, J. E. (1987). Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *The New England journal of medicine*, 316(14), 853–856. <https://doi.org/10.1056/NEJM198704023161406>
- Mardis E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- McCulloch, T. R., Wells, T. J., & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. (2022). Towards efficient immunotherapy for bacterial infection. *Trends in microbiology*, 30(2), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.005>
- TeKippe, E. M., & Burnham, C. D. (2014). Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(12), 2163–2171. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2183-y>
- Meena, S., Mohanty, A., Kaistha, N., Sasirekha, U., & Meena, J. (2021). Comparative Assessment of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Conventional Methods in the Identification of Clinically Relevant Yeasts. *Cureus*, 13(6), e15607. <https://doi.org/10.7759/cureus.15607>
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., Lasala, P., Kostrzewa, M., & Harmsen, D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 46(6), 1946–1954. <https://doi.org/10.1128/JCM.00157-08>

- Mesureur, J., Arend, S., Cellière, B., Courault, P., Cotte-Pattat, P. J., Totty, H., Deol, P., Mick, V., Girard, V., Touchberry, J., Burrowes, V., Lavigne, J. P., O'Callaghan, D., Monnin, V., & Kerié, A. (2018). A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(10), e0006874. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006874>
- Metzker M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Mignard, S., & Flandrois, J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of microbiological methods*, 67(3), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>
- Milosavljevic, M. N., Milosavljevic, J. Z., Kocovic, A. G., Stefanovic, S. M., Jankovic, S. M., Djesevic, M., & Milentijevic, M. N. (2021). Antimicrobial treatment of *Corynebacterium striatum* invasive infections: a systematic review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 63, e49. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163049>
- Mohammadi, M. M., & Bavi, O. (2021). DNA sequencing: an overview of solid-state and biological nanopore-based methods. *Biophysical reviews*, 14(1), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00857-y>
- Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Mobasher, M. A., & Ghasemi, Y. (2016). Identification of *Bacillus* Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* Gene Sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 8–18. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9208-z>
- Mollet, C., Drancourt, M., & Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular microbiology*, 26(5), 1005–1011. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6382009.x>
- Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS computational biology*, 8(12), e1002808. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Natsis, N. E., & Cohen, P. R. (2018). Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections. *American journal of clinical dermatology*, 19(5), 671–677. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0362-9>
- Nielsen, H. L., Tarpgaard, I. H., Fuglsang-Damgaard, D., Thomsen, P. K., Brisse, S., & Dalager-Pedersen, M. (2018). Rare *Elizabethkingia anophelis* meningitis case in a

Danish male. *JMM case reports*, 5(8), e005163. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005163>

Nolan, D. J., DaRoza, J., Brody, R., Ganta, K., Luzuriaga, K., Huston, C., Rosenthal, S., Lamers, S. L., & Rose, R. (2024). Comparing Gold-Standard Sanger Sequencing with Two Next-Generation Sequencing Platforms of HIV-1 gp160 Single Genome Amplicons. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 40(11), 659–669. <https://doi.org/10.1089/aid.2024.0012>

Nomura F. (2015). Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et biophysica acta*, 1854(6), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.022>

O'Hara, C. M., & Miller, J. M. (2003). Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other nonenteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+ card. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2096–2101. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2096-2101.2003>

Özbek E, Atmaca (2024). Anaerob bakteriler; izolasyon, identifikasyon, yeni türlerin oluşturduğu hastalıklar. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.*;54(1):1-14..

Özel Duygu Demiralp, İçci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan (2013). *Temel Proteomik Stratejiler*, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8.

Özel Duygu Demiralp, İçci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan (2014). *Temel Proteomik Stratejiler*, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Palys, T., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International journal of systematic bacteriology*, 47(4), 1145–1156. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1145>

Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 406–438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>

Peng, Y., Zhao, S., Wang, K., Song, J., Yan, Y., Zhou, Y., Shi, K., Jian, F., Wang, R., Zhang, L., & Ning, C. (2020). A Multiplex PCR Detection Assay for the Identification of Clinically Relevant *Anaplasma* Species in Field Blood Samples. *Frontiers in microbiology*, 11, 606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00606>

Perrin, A., Larssonneur, E., Nicholson, A. C., Edwards, D. J., Gundlach, K. M., Whitney, A. M., Gulvik, C. A., Bell, M. E., Rendueles, O., Cury, J., Hugon, P., Clermont, D., Enouf, V., Loparev, V., Juieng, P., Monson, T., Warshauer, D.,

- Elbadawi, L. I., Walters, M. S., . . . Brisse, S. (2017). Evolutionary dynamics and genomic features of the *Elizabethkingia anophelis* 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15483>
- Peterson, L. R., Hamilton, J. D., Baron, E. J., Tompkins, L. S., Miller, J. M., Wilfert, C. M., Tenover, F. C., & Thomson, R. B., Jr (2001). Role of clinical microbiology laboratories in the management and control of infectious diseases and the delivery of health care. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(4), 605–611. <https://doi.org/10.1086/318725>
- Petti, C. A., & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing : approved guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Petti, C. A., & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing : approved guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Prescott, J. F. (2003). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. *Canadian Veterinary Journal*, 44(12), 986. <https://europepmc.org/article/PMC/PMC340368>
- Relman, D. A., Loutit, J. S., Schmidt, T. M., Falkow, S., & Tompkins, L. S. (1990). The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *The New England journal of medicine*, 323(23), 1573–1580. <https://doi.org/10.1056/NEJM199012063232301>
- Rubin, C. M., & Schmid, C. W. (1980). Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing. *Nucleic acids research*, 8(20), 4613–4619. <https://doi.org/10.1093/nar/8.20.4613>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schröttner, P., Gunzer, F., Schüppel, J., & Rudolph, W. W. (2016). Identification of Rare Bacterial Pathogens by 16S rRNA Gene Sequencing and MALDI-TOF MS. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (113), 53176. <https://doi.org/10.3791/53176>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Seng, P., Abat, C., Rolain, J. M., Colson, P., Lagier, J. C., Gouriet, F., Fournier, P. E., Drancourt, M., La Scola, B., & Raoult, D. (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser

desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2182–2194. <https://doi.org/10.1128/JCM.00492-13>

Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550(7676), 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>

Simar, S. R., Hanson, B. M., & Arias, C. A. (2021). Techniques in bacterial strain typing: past, present, and future. *Current opinion in infectious diseases*, 34(4), 339–345. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000743>

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>

Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>

Snyder, J. W., Munier, G. K., & Johnson, C. L. (2008). Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms. *Journal of clinical microbiology*, 46(7), 2327–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00075-08>

Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., Miyabe, A., Murata, S., Saito, T., & Nomura, F. (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(7), 1905–1911. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4877-7>

Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>

Stager, C. E., & Davis, J. R. (1992). Automated systems for identification of microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 5(3), 302–327. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.3.302>

Starostin, K. V., Demidov, E. A., Bryanskaya, A. V., Efimov, V. M., Rozanov, A. S., & Peltek, S. E. (2015). Identification of Bacillus strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep16989>

Stranneheim, H., & Lundeberg, J. (2012). Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology journal*, 7(9), 1063–1073. <https://doi.org/10.1002/biot.201200153>

Suh, M. J., & Limbach, P. A. (2004). Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *European journal of mass spectrometry* (Chichester, England), 10(1), 89–99. <https://doi.org/10.1255/ejms.626>

Talamantes-Becerra, B., Carling, J., Kennedy, K., Gahan, M. E., & Georges, A. (2019). Identification of bacterial isolates from a public hospital in Australia using complexity-reduced genotyping. *Journal of microbiological methods*, 160, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.016>

Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E., & Persing, D. H. (1998). Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 36(12), 3674–3679. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.12.3674-3679.1998>

Tekintaş, Y., Hoşgör-Limoncu, M. (2018). Bakteriyoloji alanında kullanılan modern tanı yön- temleri: hızlı ve etkili. *Klinik Dergisi*, 31(3), 176-80.

Thaden, J. T., Pogue, J. M., & Kaye, K. S. (2017). Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4), 403–416. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1207834>

Tille P (2014) Bailey's and Scott's Diagnostic Microbiology. 13th edition; Chapter: Quality in the Clinical Microbiology Laboratory.

Ullah, I., Khan, M. S., Khan, S. S., Ahmad, W., Zheng, L., Shah, S. U. A., Ullah, M., & Iqbal, A. (2021). Identification and characterization of thermophilic amylase producing bacterial isolates from the brick kiln soil. *Saudi journal of biological sciences*, 28(1), 970–979. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.017>

Ustaçelebi Ş. (ed) (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara

Van Belkum, A., Chatellier, S., Girard, V., Pincus, D., Deol, P., & Dunne, W. M., Jr (2015). Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert review of proteomics*, 12(6), 595–605. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1091731>

Viau, R. A., Kiedrowski, L. M., Kreiswirth, B. N., Adams, M., Perez, F., Marchaim, D., Guerrero, D. M., Kaye, K. S., Logan, L. K., Villegas, M. V., & Bonomo, R. A. (2017). A Comparison of Molecular Typing Methods Applied to Enterobacter cloacae complex: hsp60 Sequencing, Rep-PCR, and MLST. *Pathogens & immunity*, 2(1), 23–33. <https://doi.org/10.20411/pai.v2i1.99>

- Visser, M. R., Bogaards, L., Rozenberg-Arska, M., & Verhoef, J. (1992). Comparison of the autoSCAN-W/A and Vitek Automicrobic systems for identification and susceptibility testing of bacteria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 11(11), 979–984. <https://doi.org/10.1007/BF01967786>
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 965–974. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>
- Wilck, M. B., Wu, Y., Howe, J. G., Crouch, J. Y., & Edberg, S. C. (2001). Endocarditis caused by culture-negative organisms visible by Brown and Brenn staining: utility of PCR and DNA sequencing for diagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 39(5), 2025–2027. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.2025-2027.2001>
- Woo, P. C., Ng, K. H., Lau, S. K., Yip, K. T., Fung, A. M., Leung, K. W., Tam, D. M., Que, T. L., & Yuen, K. Y. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 1996–2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.1996-2001.2003>
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(10), 908–934.
- Yartasi, E., Durmaz, R., Ari, O., Mumcuoglu, I., & Dinc, B. (2024). Molecular characterization of the multi-drug resistant *Myroides odoratimimus* isolates: a whole genome sequence-based study to confirm carbapenem resistance. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 27(4), 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00472-9>
- Ye, N., Zhang, B., Ling, H., Huang, Y., Xu, Y., & Wang, Z. (2018). Use of MALDI-TOF MS for Rapid Identification of Clinical Bacterial Strains that Are Uncommon or Difficult to Identify. *Annals of clinical and laboratory science*, 48(5), 646–653.

7. EKLER

7.1. EK-1: Etik kurul kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 12.04.2025-E.463791

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Etik Kurulu

Sayı : E-43012747-050.04-463791 - 243
Konu : Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Etik
Kurul Başvuru Dosyası

12.04.2025

Sayın Doç. Dr. Özlem AYDEMİR

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 19.03.2025 tarih ve 243 sayılı değişiklik başvurunuz.

Destekleyicisi olduğunuz "Klinik Örneklerden Nadir Olarak İzole Edilen ve Tanımlanması Zor Mikroorganizmaların İdentifikasyonunda Kütle Spektrometrisi ile Yeni Nesil Dizi Analizi Yönteminin Uygununun Araştırılması" isimli çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmanın isminin "Klinik Örneklerden Nadir Olarak İzole Edilen ve Tanımlanması Zor Mikroorganizmaların İdentifikasyonunda Kütle Spektrometrisi ile Dizi Analizi Yönteminin Uygununun Araştırılması" olarak değiştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan bir sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir ve uygun bulunmuştur.

Ancak çalışma bitiş tarihinden itibaren en geç 3 ay içerisinde çalışma sonuç raporunun Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Etik Kuralına gönderilmesi gerekmektedir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Pelin TANYERİ
Sağlık Bilimleri Etik Kurulu Başkanı

Hasan KONAK
Etik Kurulu Sekr.

Güvenli Elektronik
İmzalı Aslı ile Aynıdır
12.04.2025

Bu belge güvenli elektronik imza ile onaylanmıştır.

Doküman Kodu: 85586.TİBEC7.Pia.Kodu: M052

Bilgi Tutarı Adresi : <https://ekim.gov.tr/etk/85586.TİBEC7.Pia.Kodu: M052>

Adres: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Kocacık Kampüsü, Kocacık.

Adaptör: Sakarya

Telefon No: 264 295 6630 Faks No: 264 295 6629

e-Posta: tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ad: www.tip.sakarya.edu.tr

Bilgi için: Hasan Konak

Uyarı: Güvenli İmza

ÖZGEÇMİŞ

