



Streptococcus pneumoniae'nin FTIR-ATR ile Maliyet Etkin ve Hızlı Serotiplendirme Pilot Çalışması

Pilot Study for Cost-Effective and Rapid Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by FTIR-ATR

Gizem Öztürk¹(ID), Emine Arzu Başkale¹(ID), Ayşe Nur Yurdcu¹(ID), Figen Teker¹(ID), Ayşegül Bülbül¹(ID), Muhammed Emin Demirkol²(ID), Nuriye Ünal Şahin²(ID), Selin Nar Ogtun²(ID), Ateş Kara³(ID)

¹ Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı, Aziz Sançar Araştırma Merkezi, Türkiye Aşı Enstitüsü, Ankara, Türkiye

² Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Biyolojik Ürünler Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Makale atfı: Öztürk G, Başkale EA, Yurdcu AN, Teker F, Bülbül A, Demirkol ME ve ark. *Streptococcus pneumoniae*'nin FTIR-ATR ile maliyet etkin ve hızlı serotiplendirme pilot çalışması. J Pediatr Inf 2025;19(4):229-238.

Öz

Giriş: *Streptococcus pneumoniae*, yaygın ve bulaşıcı hastalıklara neden olan bir patojen olup, özellikle yaşamın ilk iki yılındaki bebek, çocuk ve yaşlılar için ciddi bir küresel halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. *S. pneumoniae*, özellikle çocuklarda olmak üzere yetişkinlerin de nazofarenksinde kolonize olabilen bir bakteri olup; akut orta kulak iltihabı, solunum yolu enfeksiyonları ve hatta yaşamı tehdit edebilecek düzeyde invaziv enfeksiyonlara (sepsis ve menenjit gibi ciddi klinik tablolara) yol açabilir. *S. pneumoniae*'nin serotiplendirilmesi, özellikle enfeksiyon yönetimi, epidemiyolojik çalışmalar ve aşı geliştirmede kritik bir rol oynar. *S. pneumoniae*'nin bilinen yüzden fazla farklı serotipi vardır. Her serotipin ise farklı patojenitesi, yaygınlığı, bulaşıcılığı ve antimikrobiyal direnç kalıpları vardır. Mevcut aşılardan kapsadığı serotiplerin toplumdaki yaygınlığını izlemek ve gelecekte geliştirilmesi gereken aşılardan planlamak için serotip dağılımını anlamak önemlidir.

Gereç ve Yöntemler: Tüm bu konuları göz önünde bulundurarak, bu çalışmada; Fourier Dönüşümlü Kızılötesi-Zayıflatılmış Toplam Yansıma (FTIR-ATR) spektroskopisi cihazı kullanılarak, pnömokok serotiplendirme çalışması gerçekleştirilebilmek için hızlı, uygun maliyetli bir analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğünden dört farklı *S. pneumoniae* izolatu (serotip 3, serotip 19A, serotip 23B ve serotip 9L) temin edilmiştir. Ekimi yapılan bakteri izolatları %5 karbondioksit atmosferinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, bu kültür örnekleri Shimadzu FTIR-ATR cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve serotip kütüphanesi oluşturmak için bir yöntem geliştirilmiştir.

Abstract

Objective: *Streptococcus pneumoniae* is a pathogen that causes widespread and contagious diseases and poses a serious global public health threat, especially for infants, children and the elderly in the first two years of life. *S. pneumoniae* is a bacterium that can colonize the nasopharynx of adults, especially children, and can cause acute otitis media, respiratory tract infections and even life-threatening invasive infections (serious clinical conditions such as sepsis and meningitis). Serotyping of *S. pneumoniae* plays a critical role especially in infection management, epidemiological studies and vaccine development. There are more than one hundred known serotypes of *S. pneumoniae*. Each serotype has different pathogenicity, prevalence, infectivity and antimicrobial resistance patterns. Understanding the serotype distribution is important for monitoring the prevalence of serotypes covered by existing vaccines in the community and for planning future vaccines.

Material and Methods: Considering all these issues, this study aimed to develop a rapid and cost-effective analysis method for pneumococcal serotyping using Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflection (FTIR-ATR) spectroscopy. For this purpose, four different *S. pneumoniae* isolates (serotype 3, serotype 19A, serotype 23B and serotype 9L) were provided by the General Directorate of Public Health. Cultivated bacterial isolates were incubated at 37 °C in a 5% carbon dioxide atmosphere for 24 hours. Then, these culture samples were analyzed using Shimadzu FTIR-ATR device and a method was developed to create a serotype library

Yazışma Adresi/Correspondence Address

Gizem Öztürk

Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı,
Aziz Sançar Araştırma Merkezi,
Türkiye Aşı Enstitüsü
Ankara, Türkiye

E-mail: ozturk9189@gmail.com

Geliş Tarihi: 17.02.2025 Kabul Tarihi: 25.07.2025

Çevrim İçi Yayın Tarihi: 25.12.2025

Bu eser CC BY-NC Atıf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.

Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.

*Telif Hakkı 2025 Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları ve Bağışıklama Derneği. Makale metnine www.cocukenfeksiyon.org web sayfasından ulaşılabilir.

Bulgular: Farklı *S. pneumoniae* izolatlarının FTIR-ATR spektrumlarından elde edilen sonuçlarına göre, 3100 ile 950 nanometre arasındaki pikler *S. pneumoniae* bakterisinin serotiplendirilmesine olanak sağlayabilecek farklı bölgelerine aittir. Çünkü bu bölgelerdeki pikler her serotipin kendine özgü parmak izini sunabilecek karbonhidrat, lipid, nükleik asit ve proteinlerine aittir.

Sonuç: Analiz edilen tüm verilerdeki pikler arasındaki değişimler minimal olduğundan, yöntemlerin serotipleri ayırt edebilme konusunda duyarlılığının sınırlı kaldığı görülmüştür. Öte yandan elde edilen verilerin analizlerinde spektrumların örtüşmesi, yöntemin yüksek tekrarlanabilirliğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus pneumoniae*, bakteriyel enfeksiyon, FTIR-ATR, serotipleme, kütüphane hazırlama

Giriş

Streptococcus pneumoniae, gram pozitif ve hücre dışı bir patojendir. Başlıca yayılımı damlacık yoluyla (1). *S. pneumoniae*; otitis media, sinüzit, bakteriyeminin eşlik etmediği pnömoni gibi invaziv olmayan pnömokok enfeksiyonlarına yol açabileceği gibi mortalite riski yüksek invaziv enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Sepsis, menenjit ve bakteriyemik pnömoni bu ciddi tablolar arasında yer almaktadır (2). İnvaziv pnömokok hastalığı, öncelikle beş yaş altı çocukları, 65 yaş üstü bireyleri ve komorbiditeleri olan ya da bağışıklık sistemi baskılanmış kişileri etkilemektedir (3,4).

Serotip, bir mikroorganizmanın yüzeyinde bulunan antijenik yapılara (genellikle polisakkarit veya proteinler) göre sınıflandırılmasıdır. Aynı tür içindeki farklı suşların, bağışıklık sistemi tarafından farklı şekillerde tanınmasını sağlayan bu yüzey antijenleri temel alınarak yapılan bu sınıflandırma, özellikle aşı geliştirme, epidemiyolojik takip ve tanı açısından büyük önem taşımaktadır (5). Bakteri hücrelerini çevreleyen polisakkarit kapsül, *S. pneumoniae*'nin başlıca virülans faktörü olup serotipinin belirlenmesini sağlar. Her serotip, yapısal olarak farklı kapsüller polisakkaritlere sahiptir; bu da onları antijenik olarak farklı kılar. Günümüzde 100'den fazla farklı pnömokok serotipi tanımlanmıştır (6). Bu serotiplerin dağılımının izlenmesi; yerel epidemiyolojiyi anlamak, aşı stratejilerini belirlemek ve serotip dağılımını izlemek açısından büyük önem

Results: According to the results obtained from FTIR-ATR spectra of different *S. pneumoniae* isolates, peaks between 3100 and 950 nanometers belong to different regions that can allow serotyping of *S. pneumoniae* bacteria. Because the peaks in these regions belong to carbohydrates, lipids, nucleic acids and proteins that can present the unique fingerprint of each serotype.

Conclusion: However, since the changes between the peaks in all analyzed data were minimal, it was seen that the sensitivity of the methods in distinguishing serotypes was limited. On the other hand, the overlapping of the spectra in the analysis of the obtained data indicates the high reproducibility of the method.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, bacterial infection, FTIR-ATR, serotyping, library preparation

taşımaktadır. Günümüzde geleneksel serotipleme yöntemlerinden biri olan Quellung reaksiyonu yaygın şekilde kullanılsa da, bu yöntem iş gücü yoğun ve zaman alıcı olup özel reaktifler ve uzmanlık gerektirmektedir (7). Günümüzde klasik olarak, Quellung reaksiyonu (kapsül şişme testi) kullanılsa da lateks aglütinasyon testleri, polimeraz zincirleme tepkimesi temelli yöntemler, DNA sekanslama (whole genome sequencing, WGS) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi-Zayıflatılmış Toplam Yansıma (FTIR-ATR) temelli yöntemler de farklı avantajlarından ötürü kullanılabilir. Her yöntemin avantajları ve sınırlılıkları olup, uygulama bağlamına göre seçim yapılmaktadır. Özellikle FTIR-ATR gibi yeni teknikler, gelecekte serotiplendirmeyi daha erişilebilir ve düşük maliyetli hale getirme potansiyeli taşımaktadır (8).

Konjuge pnömokok aşısının klinik kullanıma girmesi, pnömokok hastalıklarının yükünü azaltmada çok etkili olduğu görülmüş olsa da serotip sayısının yüksekliği, serotip dağılımının değişimi nedeniyle aşı kapsamı dışındaki yeni serotiplerin enfeksiyon etkeni olarak daha yüksek oranda tespit edilmesi hala önemli bir sorundur (9). Bu nedenle serotipleme, epidemiyolojik çalışmalar ve aşı etkilerinin değerlendirilmesi açısından hayati bir rol oynamaktadır. Tablo 1'de klinik kullanıma girmiş olan aşılardan kapsadığı serotipler görülmektedir.

FTIR-ATR analizi, elektromanyetik spektrumun kızılötesi (IR) bölgesinde yer alan ve görünür ışıktan daha uzun dalga boyuna (yaklaşık 2.5-25 µm) ve daha düşük frekansa

Tablo 1. Klinik kullanımda olan pnömokok aşılarının kapsadığı serotipler

Aşı	Kapsadığı Serotipler
PCV7	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV10	PCV7 + 1, 5, 7F
PCV13	PCV10 + 3, 6A, 19A
PCV15	PCV13 + 22F, 33F
PCV20	PCV15 + 8, 10A, 11A, 12F, 15B
PCV21	PCV20 + 9N, 17F, 20, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B

PCV7: 7 vlanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV10: 10 vlanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV13: 13 vlanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV15: 15 vlanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV20: 20 vlanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV21: 21 vlanlı konjuge pnömokok aşısı.

(yaklaşık 4000-400 cm^{-1}) sahip ışınının örnek tarafından absorpsiyonunu ölçmeye dayanmaktadır. Bu teknikte, örnek IR ışınına maruz bırakıldığında, moleküler düzeydeki kovalent bağlar karakteristik frekanslarda titreşerek ışınımı absorbe etmektedir (10). Her fonksiyonel grup, belirli bir titreşim moduna karşılık gelen özgün bir absorpsiyon bandı oluşturur. Bu titreşim modları -örneğin gerilme (stretching), bükülme (bending), kayma (scissoring) ve burulma (twisting)- molekül içi bağların türüne, bağ kuvvetine ve atomların kütesine bağlı olarak farklılık gösterir (11). FTIR spektroskopisi ile elde edilen bu absorpsiyon spektrumu, bir bileşiğin kimyasal yapısına özgü olan ve "moleküler parmak izi" olarak adlandırılan nitelikli bir profil sunmaktadır (12).

Bakteriyel izolatların FTIR analizi, hücre duvarı bileşenleri (örneğin polisakkaritler, proteinler, lipidler ve nükleik asitler) dahil olmak üzere birçok biyomolekülün özgül titreşimlerini kapsayarak, mikroorganizmalara özgü spektral profillerin elde edilmesini sağlar (13). Böylece bu teknik, mikroorganizma düzeyinde hızlı, etiketsiz ve reaktif gerektirmeyen karakterizasyon ve sınıflandırma olanağı sunar. FTIR-ATR spektroskopisi, farklı taksonomik düzeylerde bakteri ve maya türlerini ayırt etmek için kullanılmaktadır (14). Bu yöntem basit, hızlı ve analiz için özel reaktif gerektirmemesi açısından avantajlıdır (15). Bakteriyel ayırım uygulamalarında, *Cryptococcus neoformans* ve enterokok gibi mikroorganizmalar için kapsül türleri, serotipler veya serogrup düzeyinde tanımlama çalışmaları yapılmıştır (16).

Serotip veya serogrup düzeyinde tanımlamaların yapılabildiği göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışma; maliyeti düşük, uygulanması kolay bir yöntemle oluşturulacak bir referans kütüphane aracılığıyla serotipleme ihtiyacını karşılamak amacıyla planlanmıştır. Hızlı, düşük maliyetli, etiket gerektirmeyen ve geniş uygulama alanlarına sahip FTIR-ATR cihazı kullanılarak geliştirilen serotipleme yönteminin yaygın kulla-

nım potansiyeli incelenmiş; elde edilen ilk bulgular, literatür açısından da önemli katkılar sunmuştur. Bu kapsamda, farklı serotipleri içeren izolatların karşılaştırmalı analizi yapılmış ve elde edilen spektrumların yüksek düzeyde tekrarlanabilirliği de değerlendirilmiştir.

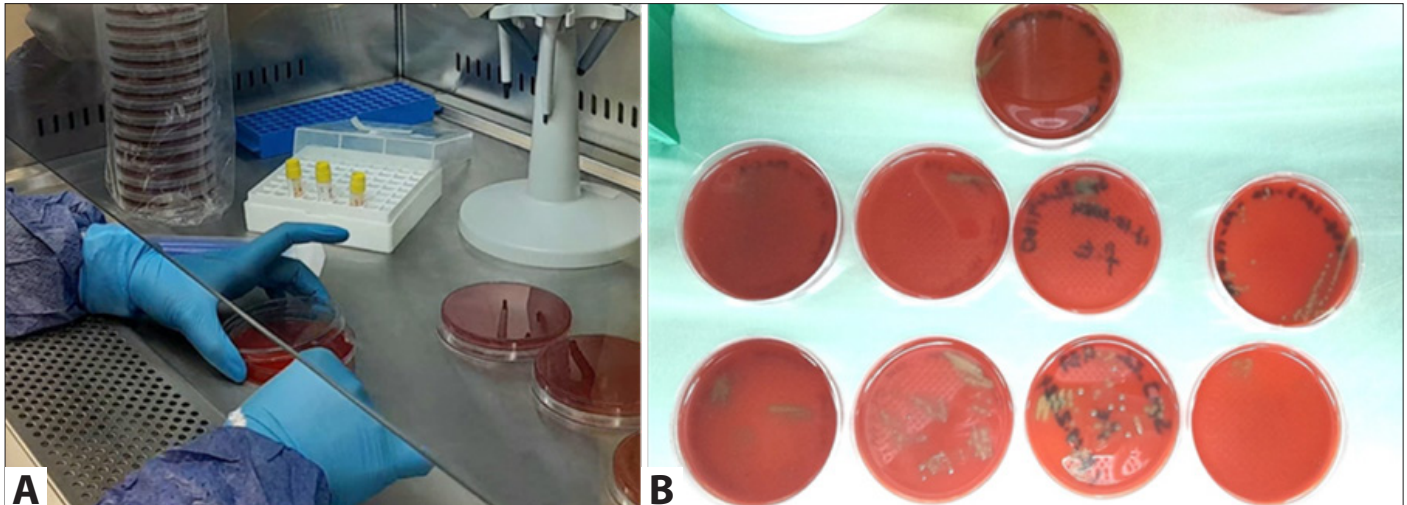
Gereç ve Yöntemler

İzolatların Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan *S. pneumoniae* izolatları, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığından temin edilmiştir. Toplam; dört farklı serotipe (3, 19A, 23B ve 9L) ait sekiz izolat olacak şekilde seçilmiştir. Serotip seçimi, bu suşların mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik açıdan farklı enfeksiyon özellikleri göstermesi dikkate alınarak yapılmıştır. Mevcut 13-valan konjuge pnömokok aşısı kapsamında yer almasına rağmen, serotip 3'ün antikor aracılı eliminasyona karşı diğer serotiplere oranla büyük olasılıkla kapsülünün daha kalın olması nedeniyle daha dayanıklı olduğu bilinmektedir (17). Serotip 19A ise özellikle çocuk yaş grubunda daha sık görülmekte ve yüksek antibiyotik direnç oranları ile ilişkilendirilmektedir (18). Serotip 23B, Türkiye'de pnömokokal enfeksiyonlardan göreceli olarak sık izole edilen serotiplerden biri olarak tanımlanmıştır (19). Aşı kapsamı dışında kalan Serotip 9L ise, çoklu serotip içeren pnömöni vakalarıyla ilişkili basın ikincil serotiplerden biri olarak rapor edilmiştir (20).

Bakteri Kültürü Hazırlığı

Çalışmada kullanılan *S. pneumoniae* serotipleri (3, 19A, 23B, 9L), yağsız süt tozu içerisinde $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. İzolatlar, çalışma öncesinde steril koşullarda koyun kanlı agar (%5 defibrine koyun kanı içeren besiyeri) yüzeyine ekildikten sonra, %5 karbondioksit (CO_2) içeren atmosferik koşullarda $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 1A'da *S. pneumoniae* serotiplerinin ekimi ve Şekil 1B'de inkübasyon sonrası görünümü gösterilmiştir.



Şekil 1. (A) *S. pneumoniae* serotiplerinin ekimi ve (B) %5 CO_2 içeren atmosferde, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyonu sonrası görünümü.

FTIR Spektrum Ölçümü ve Serotip Kütüphanesinin Analizi

FTIR-ATR, örneklerde bulunan kimyasal yapıların ve özgül fonksiyonel grupların varlığı veya yokluğu hakkında bilgi sağlar. FTIR-ATR spektroskopisi, mikroorganizmaların kendilerine özgü spektral parmak izi profillerine dayanarak tanımlanmasında uzun süredir kullanılan bir tekniktir. Bakteriler de dahil olmak üzere mikrobiyal hücrelere ait FTIR spektrumları; karbohidratlar, proteinler, lipitler ve bunlara ait fonksiyonel grupların varlığını gösteren karakteristik pikler oluşturmaktadır. Bu spektral desenler, veri tabanlarında yer alan referans spektrumlarla karşılaştırılarak mikroorganizmaların tür veya serotip düzeyinde tanımlanmasını mümkün kılar. Özellikle bakteriyel tanımlama amacıyla, elde edilen FTIR spektrumları, referans spektrumlarla karşılaştırılarak örneklerin özgün spektral özellikleri aracılığıyla ayrımı sağlanabilir (21). Bu çalışmanın kapsamında, kullanılan izolatlar için bir spektral kütüphane oluşturulması amacıyla bir yöntem geliştirilmiş ve analizler Shimadzu marka bir FTIR-ATR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Streptokok türlerine ait FTIR-ATR analizleri iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birinci yöntemde, kanlı agar yüzeyinden steril pamuklu çubuk yardımıyla doğrudan alınan örnekler ATR kristaline uygulanmış ve spektrum ölçümleri yapılmıştır. İkinci yöntemde ise, kanlı agardan alınan örnekler bakteriyel taşıma ortamına aktarılmış ve bu süspansiyon doğrudan ATR kristali üzerine damlatılarak ölçümler yapılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen tüm spektrumlar birleştirilerek analiz edilmiş ve bir serotip kütüphanesinin oluşturulmasına yönelik olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

Farklı *S. pneumoniae* İzolatlarının Invitro Ortamda Kültüre Edilmesi

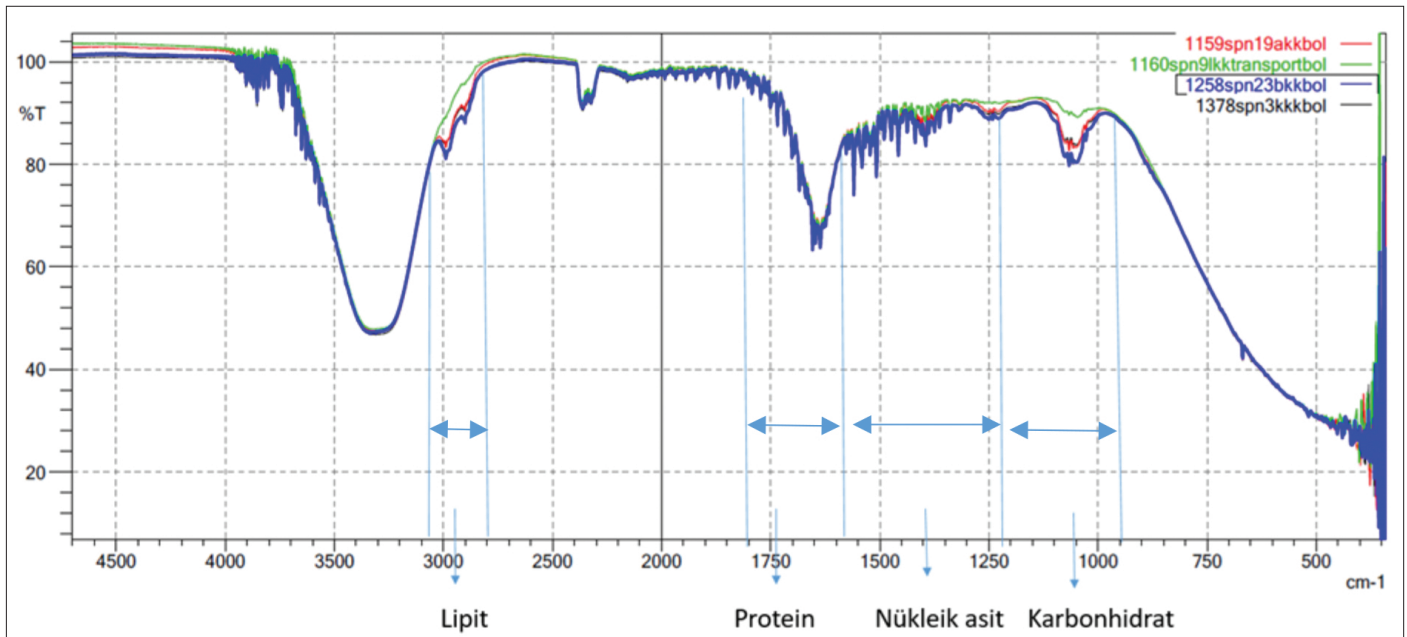
Toplam sekiz izolat içeren dört farklı *S. pneumoniae* serotipine (3, 19A, 23B ve 9L) ait bakteriler, -86 °C'de depolanmış örneklerden elde edilmiştir. Bu izolatlar, koyun kanlı agar plaklarına inoküle edilmiş ve bakteri kolonilerinin oluşumunu sağlamak amacıyla %5 CO₂ içeren atmosfer koşullarında, 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci sonunda, tüm plaklarda mikrobiyal üremenin gerçekleştiği gözlenmiştir.

FTIR-ATR Spektrumlarının Analizi

S. pneumoniae serotiplerine ait (3, 19A, 23B ve 9L) FTIR-ATR spektrumlarında lipit, protein, aminoasit ve karbohidrat bölgeleri sırasıyla Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu spektrumda 3100 ile 2700 cm⁻¹ (nanometre yerine dalga sayısı birimi tercih edilir) aralığında gözlenen absorpsiyon pikleri, söz konusu izolatların lipid bileşenlerinde mevcut olan metil (-CH₃) ve metilen (-CH₂) gruplarının simetrik ve asimetrik germe titreşim modlarına karşılık gelmektedir. Bu bulgu, bakteriyel hücre zarı ve iç yapılarındaki lipid profillerinin spektroskopik yolla tanımlandığını ortaya koymaktadır.

Spektrumun 1800-1400 cm⁻¹ (dalga sayısı) aralığında gözlenen pikler, izolatların protein bileşenlerine ait amit I ve amit II bantlarını temsil etmektedir. Bu bantlar, proteinlerin ikincil yapılarına ilişkin bilgiler sunar.

1400-1200 cm⁻¹ aralığı ise daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu bölgede, -CH₂ gruplarının eğilme titreşimleri, karboksilat (COO⁻) gruplarının simetrik germe titreşimleri ve izolatların



Şekil 2. *S. pneumoniae* serotiplerinin FTIR-ATR spektrumlarında sırasıyla lipit, protein, aminoasit ve karbonhidrat bölgeleri.

nükleik asitlerine özgü fosfodiester (P=O) bağlarının asimetrik germe titreşimleri çakışmaktadır.

İki farklı yöntemle ait analizler, tüm serotiplere ait her izolat için üçer teknik replikasyonla gerçekleştirilmiş ve elde edilen FTIR spektrumları; analitik tekrarlanabilirlik, serotiplendirmeye olanak sağlayabilecek spektral bölgesel varyasyonlar ile kapsüller polisakkarit bölgelerindeki fonksiyonel grup benzerlikleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

FTIR-ATR tekniği kullanılarak *S. pneumoniae* serotiplerinin kimyasal karakterizasyonu iki farklı örnek hazırlama metoduyla gerçekleştirilmiştir.

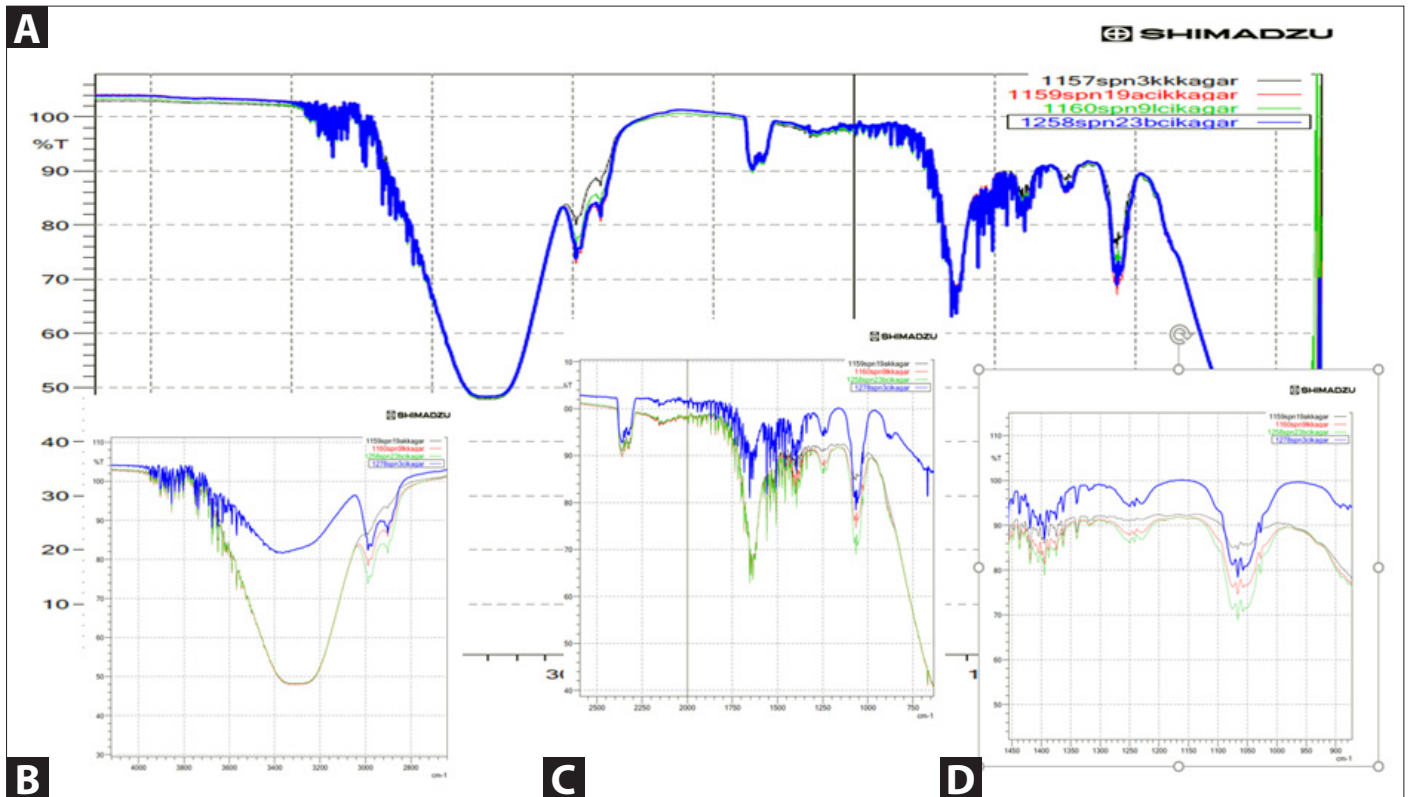
İlk yöntemde, kanlı agar besiyerinden doğrudan izole edilen koloni örnekleri, ATR kristal yüzeyine transfer edilerek spektral analizler yapılmış ve elde edilen spektrumlar Şekil 3'te sunulmuştur. Bu spektrum serotip 3, 19A, 23B ve 9L'ye ait, doğrudan kanlı agardan alınıp ATR kristaline yerleştirilen izolatların FTIR-ATR spektrumlarını ve serotipler arasındaki farklılıkların gözlemlendiği bölgelerin büyütülmüş versiyonlarını göstermektedir. İkinci yöntemde ise, kanlı agardan alınan koloni örnekleri steril bir bakteri taşıma ortamına süspansedildikten sonra ATR kristaline aktarılmış ve bu örnekleme prosedürüyle elde edilen FTIR-ATR spektrumları Şekil 4'te gösterilmiştir. Buna ek olarak, Şekil 5'te, serotipler arası varyasyonların

belirginleştiği spektral bölgelerin detaylı görünümü sunulmuştur. Bu iki farklı örnekleme yaklaşımı, bakteri hücre duvarı bileşenleri ve metabolik profillerdeki potansiyel değişimlerin spektroskopik olarak değerlendirilmesine olanak tanımıştır.

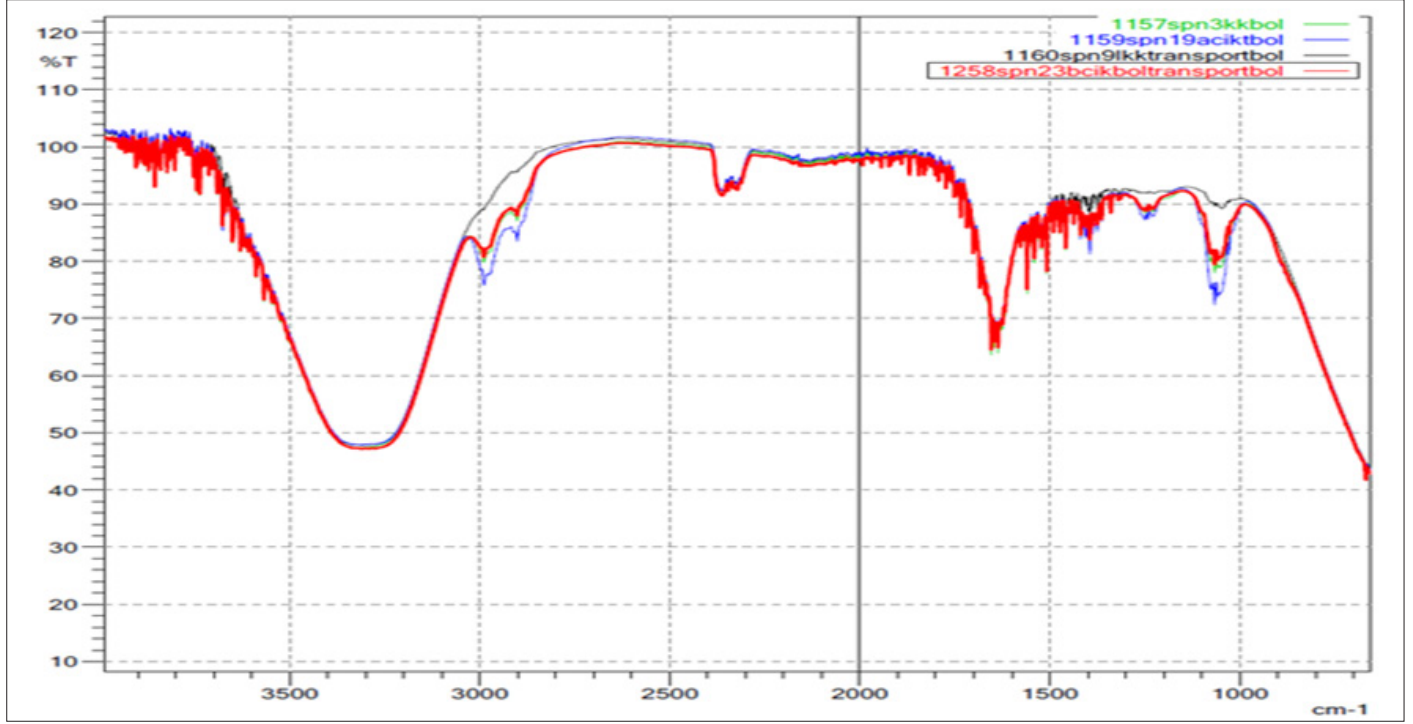
Şekil 5'te, bakteri taşıma ortamından elde edilen spn3, spn 19A, spn 23B ve spn 9L izolatlarına ait FTIR-ATR spektrumlarının serotiplemeye olanak sağlayabilecek farklılıklar gösteren bölgelerinin yakın görünümü sunulmuştur. Ayrıca, serotip 9L, serotip 23B ve serotip 19A'nın bakteri taşıma ortamında gerçekleştirilen ardışık üç set analizinden elde edilen FTIR-ATR spektrum görüntüleri sırasıyla Şekil 6, 7 ve 8'de gösterilmiştir. Tüm bu spektrumlar bir araya getirilerek, serotip kütüphanesi oluşturulması amacıyla incelenmiştir.

Tartışma

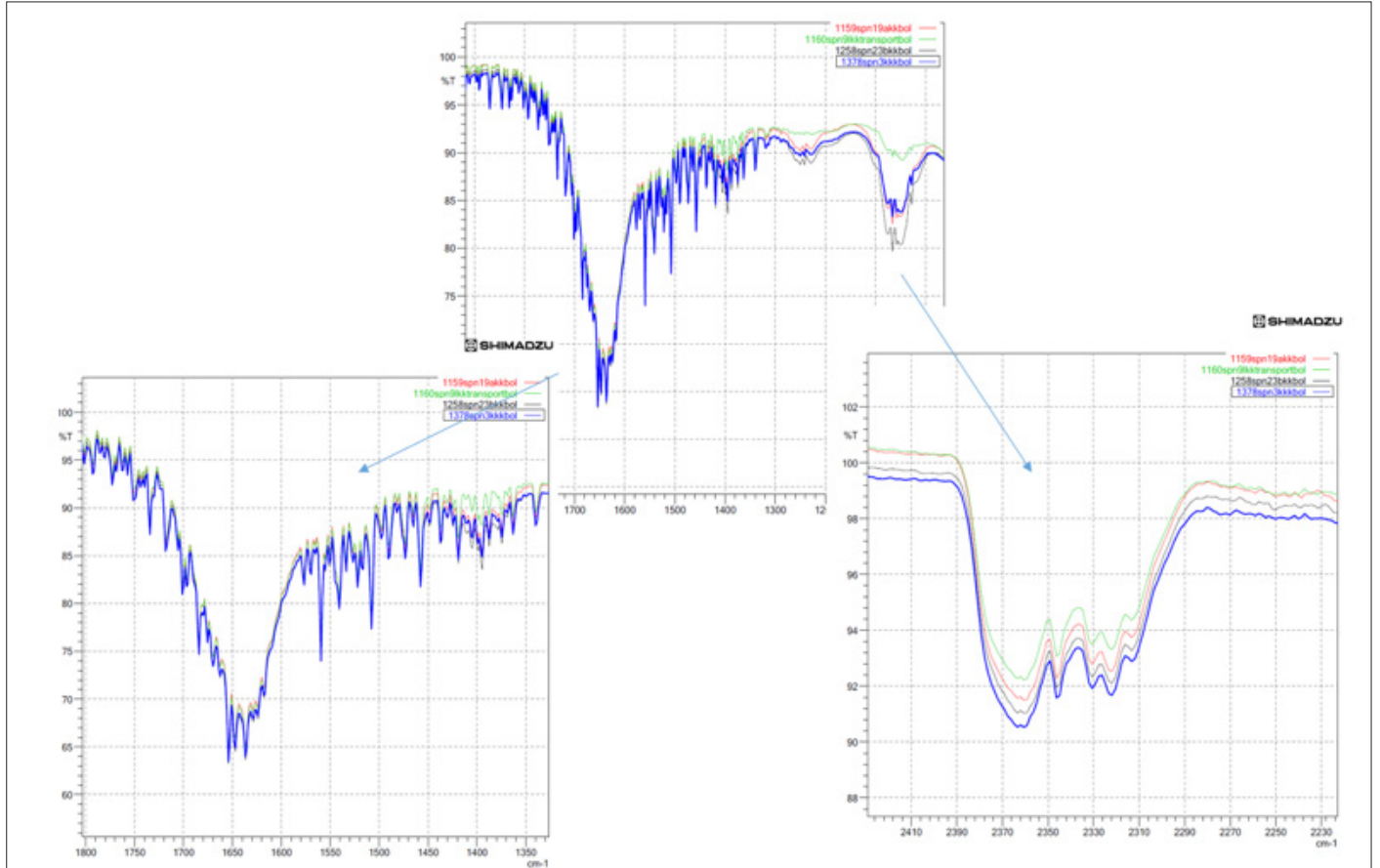
FTIR-ATR modunda kullanımı, mikrobiyolojik analizlerde güçlü bir araç haline gelmiştir. Bu teknik, bakteriyel hücre dizilimlerinin ve polisakkarit/kapsül yapılarının özgün biyokimyasal "parmak izlerini" tespit ederek, tür ve suş düzeyinde ayırt edici analizler sağlar. FTIR-ATR spektroskopisi, ön hazırlık gerektirmeden doğrudan koloni analizi fırsatı sunar; bu yönüyle zaman, iş gücü ve maliyet açısından klasik yöntemlere göre büyük avantaj sağlar.



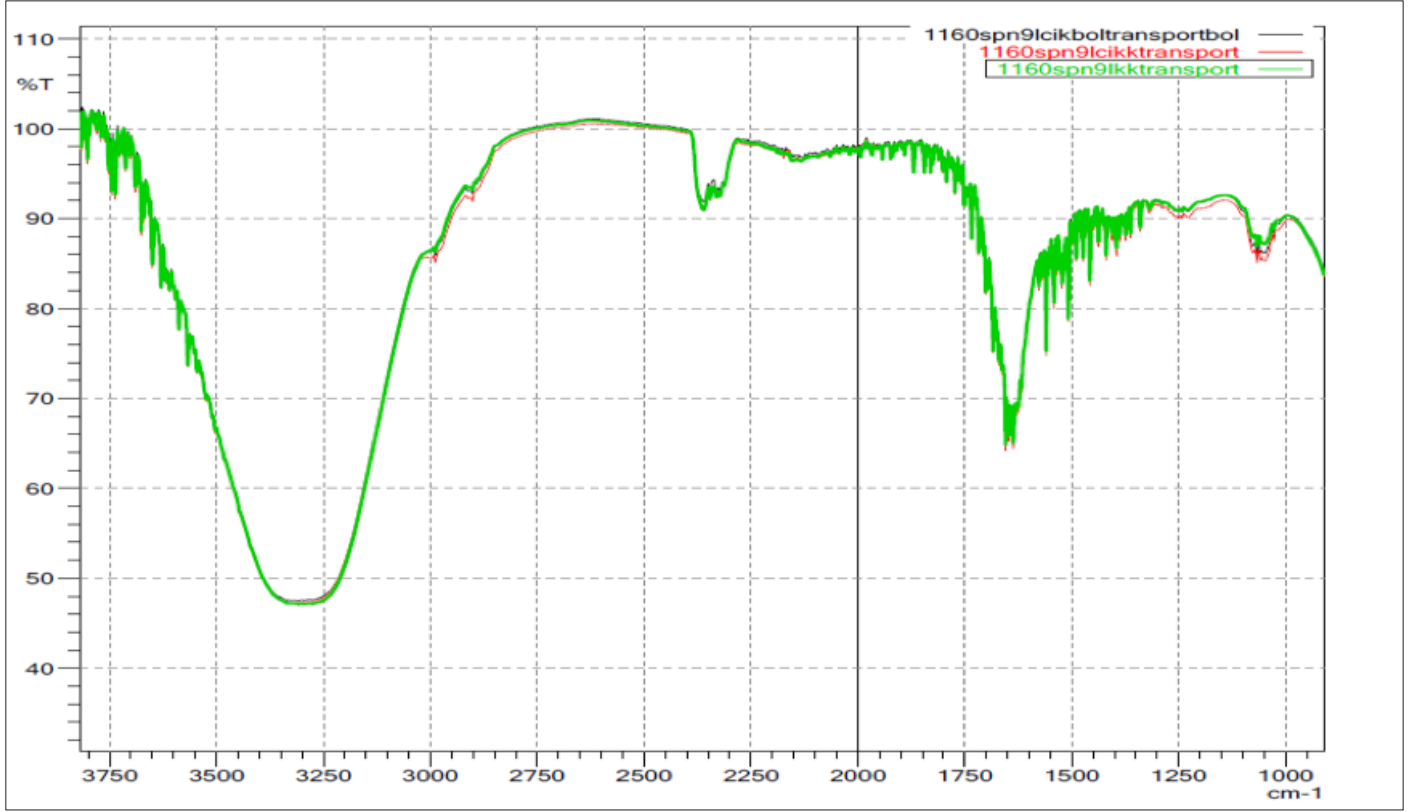
Şekil 3. Doğrudan kanlı agardan alınan izolatların Fourier transform kızılötesi spektroskopisi –FTIR-ATR spektrumları: **(A)** Doğrudan kanlı agardan alınan spn 3, spn 19A, spn 23B, spn 9L izolatlarının full spektrumu. **(B, C, D)** Doğrudan kanlı agardan alınan spn 3, spn 19A, spn 23B, spn 9L izolatlarının FTIR-ATR spektrumlarının farklılık gösteren bölgelerinin yakın görünümü.



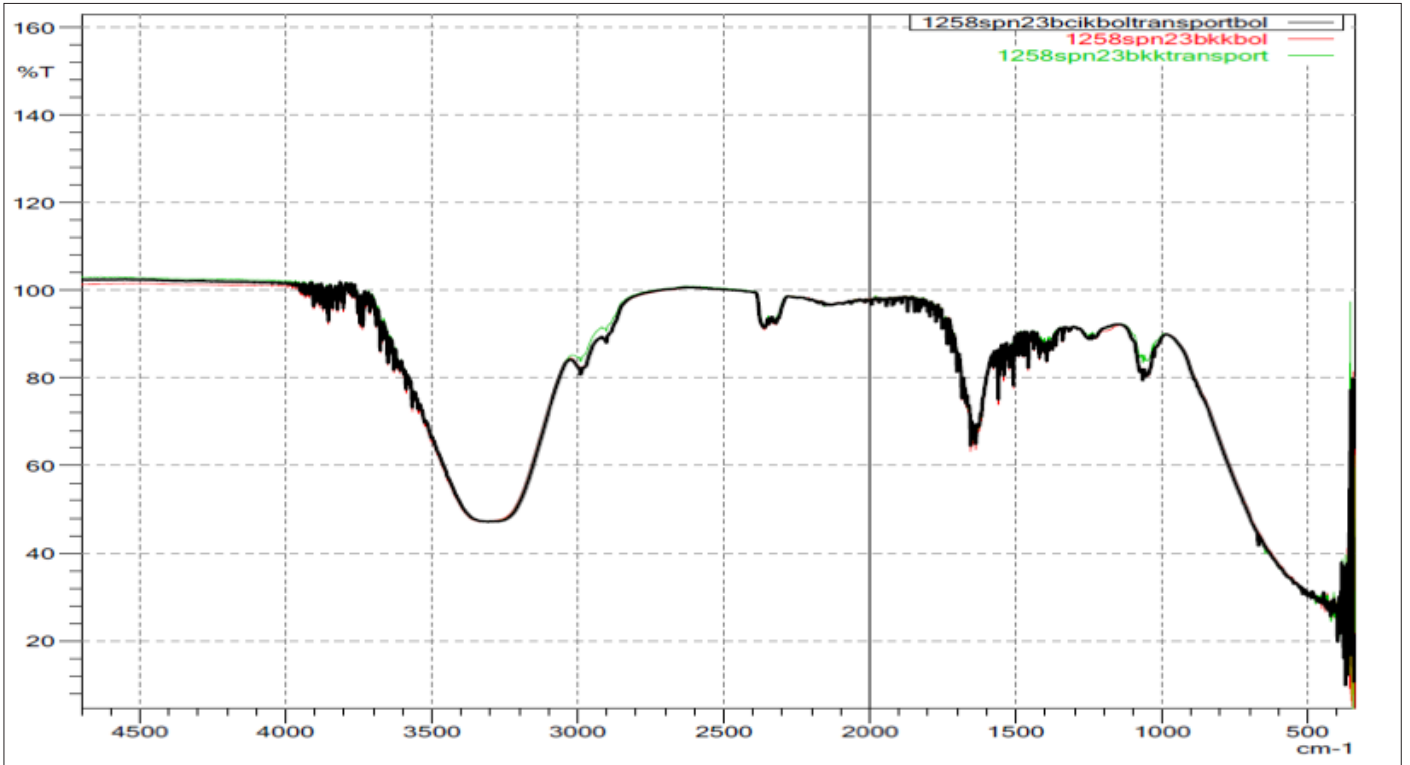
Şekil 4. Bakteri taşıma ortamında süspanselde edilen serotip 3, 19A, 23B ve 9L'ye ait Fourier transform kızılötesi spektroskopisi – FTIR-ATR spektrumları.



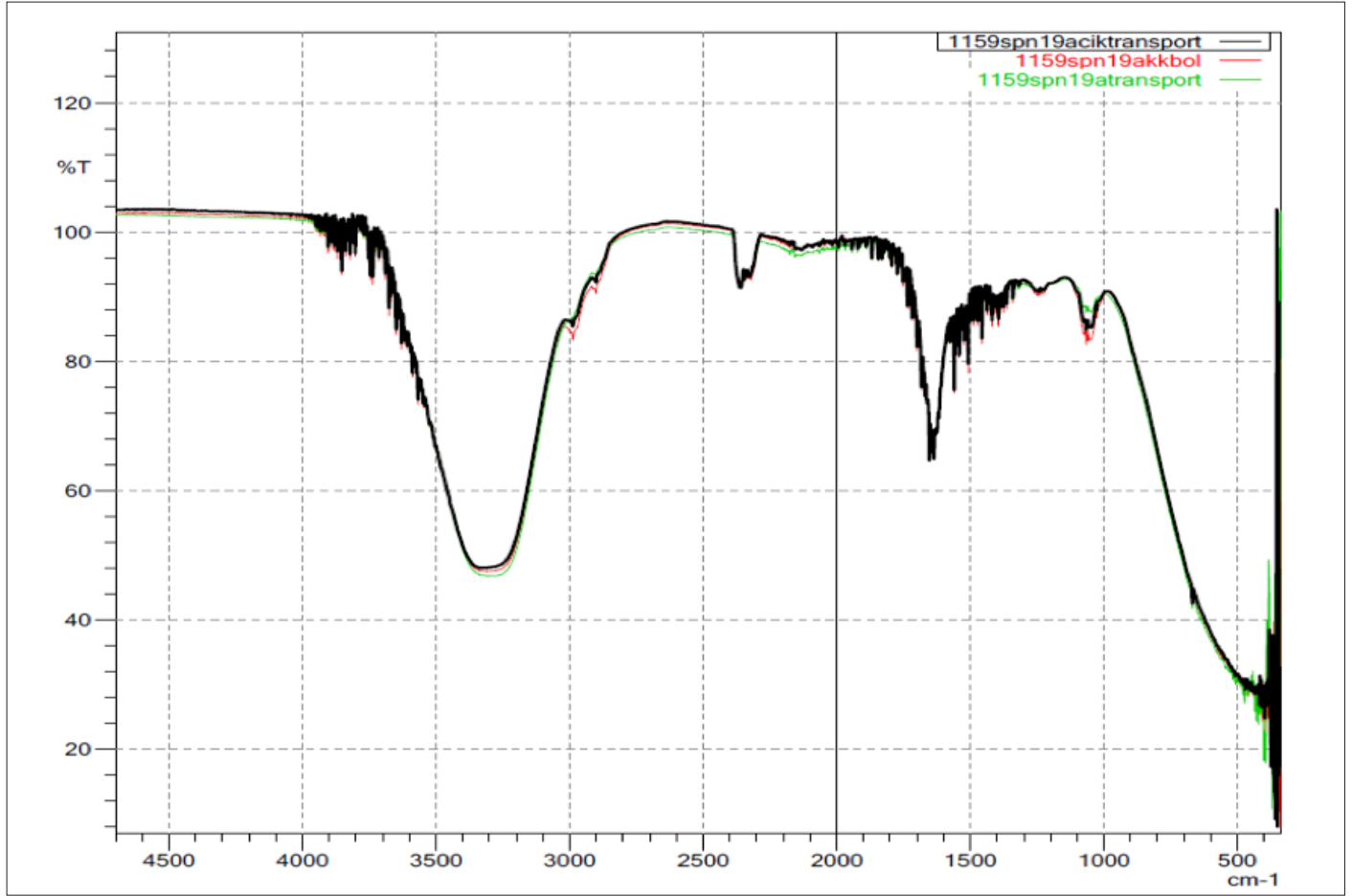
Şekil 5. Bakteri taşıma ortamında süspanselde edilen spn 3, spn 19A, spn 23B ve spn 9L izolatlarına ait FTIR-ATR spektrumlarının yakın görünüşleri.



Şekil 6. Bakteri taşıma ortamında süspansede edilen serotip 9L'den elde edilen, ardışık üç analiz setine ait Fourier transform kızılıtesi spektroskopisi – FTIR-ATR spektrumları.



Şekil 7. Bakteri taşıma ortamında süspansede edilen serotip 23B'den elde edilen, ardışık üç analiz setine ait Fourier transform kızılıtesi spektroskopisi – FTIR-ATR spektrumları.



Şekil 8. Bakteri taşıma ortamında süspansiyon edilmiş serotip 19A'dan elde edilen, ardışık üç analiz setine ait Fourier transform kızılötesi spektroskopisi – FTIR-ATR spektrumları.

Bu çalışmada alınan verilerde farklı serotipler arasındaki nükleik asit dizilimlerdeki veya konsantrasyonlarındaki minimal farklılıklar, yaklaşık 1600-1300 nm aralığında sınırlı düzeyde değişikliklere yol açmıştır. Bu durum, nükleik asit temelli ayrımın bu dalga sayısı aralığında daha az belirgin olduğunu düşündürmektedir.

S. pneumoniae'nin serotiplendirilmesinde belirleyici olan başlıca yapısal unsur, hücre yüzeyindeki kapsül polisakkaritleridir. Bu polisakkaritler, FTIR spektrumlarında özellikle 1200-950 cm^{-1} dalga sayısı aralığında karakteristik absorpsiyon bantları üretir. Bu bölge, C-O-C glikozidik bağları ve C-O halkasal titreşimlerinin baskın olduğu "karbonhidrat bölgesi" olarak bilinir. Farklı serotipler, yapısal olarak birbirinden farklı sayıda ve türde monosakkarit birimlerinden oluşan kapsül polisakkaritlere sahiptir. Bu yapısal çeşitlilik, spektrumda gözlenen piklerin yoğunluğu, konumu ve sayısında belirgin farklılıklar yaratır. Özellikle bazı serotipler daha dallı ve kompleks yapıda kapsüller taşıırken, diğerleri daha basit yapıdadır; bu durum, FTIR analizinde tanısal ayırt edicilik sağlayan özgün "kimyasal parmak izlerini" oluşturur. Böylece her serotipin benzersiz polisakkarit kompozisyonu, FTIR spektrumunda kendine özgü bir

profil üretir ve bu da serotiplendirme sürecinde güvenilir bir temel sunar.

Çalışma süresince kullanılan her iki örnek hazırlama metodunda da gözlenen spektral farklılıklar minimal düzeyde olup, serotiplendirme amacıyla ayrıştırıcı bir spektral kütüphane oluşturmak için yeterli çözünürlüğü sağlayamamıştır. Bu durum, mevcut FTIR-ATR sisteminin bu düzeydeki serotip ayrımları için hassasiyetinin yetersiz kaldığını göstermektedir. FTIR-ATR cihazının örnek yüzeyiyle doğrudan temas eden bileşenleri spektral bilgileri sağlar. Ancak bazı *S. pneumoniae* serotiplerinde kapsül yapısı ince, gevşek veya fazla kalın olabilir. Bu durum, ATR kristaline yeterli kapsül malzemesinin temas etmemesiyle sonuçlanarak düşük sinyal alınmasına neden olur. Serotipler arasında farklılık gösteren kapsül polisakkaritler, yapısal olarak benzer monosakkarit alt birimlerine dayandıklarında FTIR spektrumlarında örtüşen piklere neden olabilir. Bu da spektral ayrışmayı zorlaştırabilir. Bakteriyel kolonilerin heterojen yapıda olması, farklı serotiplerin FTIR sinyalinde benzerlik göstermesine yol açabilir. Özellikle yetersiz standardizasyon ve varyasyon gösteren biyokütle yoğunluğu, spektral sinyalin kalitesini düşürebilir. Tüm bu sebeplerden

dolayı spektral kütüphane oluşturmak için yeterli çözünürlük sağlanamamış olabilir.

Elde edilen tüm bu sonuçlara göre çalışma sınırlılıklarının aşılarda daha hassas ve ayırt edici bir yöntem oluşturulabilmesi için gelecekte daha farklı serotiplerle ve fazla sayıdaki örnekte çalışmalar yapılması gerektiği görülmektedir. Bu doğrultuda özellikle serotip ayırımının belirteci olan polisakarit yapısal farklılıklarının daha doğru halde analizini sağlayabilmek için numunelere ön işlem basamağı eklenerek çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çalışmada her izolatin spektral verisi 3 teknik tekrar ile çalışılmış ve sunulmuştur. Bu spektrallarda açıkça görüldüğü üzere, her bir serotip için üç ayrı analizde elde edilen spektrumlar üst üste çakışma göstermektedir. Bu durum, kullanılan FTIR-ATR metodolojisinin yüksek düzeyde tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu ve ölçüm tutarlılığının başarılı bir şekilde sağlandığını bilimsel olarak doğrulamaktadır.

Sonuç

Elde edilen tüm veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, FTIR-ATR cihazının uygun maliyetli ve hızlı analiz yöntemleri sunmasına rağmen, bir *S. pneumoniae* serotip kütüphanesi oluşturarak serotiplendirme yöntemi geliştirmek için yeterince spesifik olmadığı görülmüştür.

Fakat streptokokların kapsül yoğunluğunu artırarak yöntemin hassasiyetini artırılabilir. Bu amaçla örneğe ön işleme teknikleri (örneğin enzimatik hücre duvarı uzaklaştırma, kapsül ekstraksiyonu gibi) uygulanabilir. Bu sayede spektrumda kapsül kaynaklı sinyaller baskın hale getirilebilir.

Bu amaçla bir başka yaklaşım ise basit istatistiksel yaklaşımlardan ziyade, yapay sinir ağları, destek vektör makineleri (SVM) veya derin öğrenme tabanlı sınıflandırıcıların kullanılması olabilir. Bu yöntemler, spektrum içindeki minimal varyasyonları dahi ayırt etme konusunda üstün başarı sağlayacağından serotiplendirme açısından avantaj sağlayacaktır.

Ayrıca, her serotip için biyolojik replikalar içeren veri setleri, sınıflandırmanın güvenilirliğini artıracığından analiz edilen serotip sayısının artırılmasıyla bu yöntem, *S. pneumoniae*'yi farklı bakteri türlerinden ayırt etmek için umut vaat etmektedir.

Dünya literatüründe de çeşitli çalışmalar, pnömokok serotiplendirmesinde FTIR-ATR spektroskopisinin hem potansiyelini hem de sınırlılıklarını vurgulamıştır. Örneğin, bir çalışmada Sahu ve arkadaşları, *S. pneumoniae*'nin kapsül proteinleri arasında ayırım yapmak ve farklı serotipleri tanımlamak amacıyla FTIR mikroskopisinin potansiyelini değerlendirmeyi hedeflemişlerdir (22). Farklı serotiplerin spektral parmak izlerinin büyük olasılıkla *S. pneumoniae* suşları arasındaki kapsül bileşimi farklılıklarından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Absorpsiyon piklerindeki kaymaların, çeşitli serotipler arasındaki

karbonhidrat içeriği farklılıklarını gösterdiğini belirtmişlerdir. Ancak, çalışma sonunda buldukları yöntemin sınırlılıklarını vurgulayarak, çalışmalarının tekrarlanabilirliğinin daha fazla veri ile gösterilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise Vaz ve arkadaşları, kapsüllü *S. pneumoniae* suşlarının serotiplendirilmesi için alternatif bir yöntem olarak FTIR spektroskopisini değerlendirmişlerdir (14). Çalışma sonuçlarına göre, serotip farklılıklarını en iyi ortaya koyan spektral bölgenin 1185-900 cm^{-1} 'de bulunduğunu belirlemişlerdir. Sonuçları, spektral farklılıklar çok belirgin olmasa da aynı serogrupa ait serotipleri ayırt etmenin mümkün olduğunu göstermiştir. Vaz ve arkadaşlarının elde ettikleri verilerle paralel olarak 1185-900 cm^{-1} bölgesi yaptığımız çalışmada ortaya koyduğumuz karbonhidrat ve nükleik asit bölgesini kapsadığından literatürdeki çalışma ile örtüşen sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürdeki bu ve bunun gibi çalışmalarla tutarlı olarak, bulgularımız FTIR-ATR'nin umut vadeci olmasına rağmen, serotiplendirmede doğruluk ve güvenilirliği artırmak için iyileştirilmiş istatistiksel yaklaşımlara [Temel Bileşen Analizi (TBA) ve *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) gibi çok değişkenli istatistiksel analiz metodları veya SVM, Yapay Sinir Ağları (ANN) & Derin Öğrenme, Rastgele Ormanlar (Random Forest) gibi makine öğrenimi modelleri vb.] ve genişletilmiş spektral veri tabanlarına (yüksek kalitede temsilci örnekler, standardize numune hazırlığı ve ölçüm protokolleri, veri normalizasyonu ve ön işleme vb.) ihtiyaç duyulduğunu düşündürmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışmada hiçbir primer biyolojik numune kullanılmadığı için etik kurul onayına ihtiyaç yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dışarıdan hakem değerlendirmesi yapılmıştır.

Yazar Katkıları: Fikir - GÖ, AK; Tasarım - GÖ, AK; Denetleme - SNO, AK; Kaynaklar - NUS, SNO, AK; Veri Toplama ve/veya işleme - GÖ, EAB, ANY, FT, AB; Analiz ve/veya yorumlama - GÖ, EAB, ANY, FT, AB; Literatür taraması - GÖ, EAB, ANY, FT, AB; Yazıyı yazan - GÖ, AK; Eleştirel inceleme - GÖ, EAB, SNO, AK.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Zhou ML, Wang ZR, Li YB, Kudinha T, Wang J, Wang Y, et al. Rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* serotypes by *cpsB* gene-based sequencing combined with multiplex PCR. *J Microbiol Immunol Infect* 2022;55(5):870-9. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.11.004>
2. Lynch JP 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae: Epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. Semin Respir Crit Care Med* 2009;30(2):189-209. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202938>

3. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(7):a010215. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010215>
4. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009;374(9693):893-902. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61204-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61204-6)
5. Manna S, Werren JP, Ortika BD, Bellich B, Pell CL, Nikolaou E, et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 33G: genetic, serological, and structural analysis of a new capsule type. *Microbiol Spectr* 2024;12(1):e0357923. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03579-23>
6. Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A new pneumococcal capsule type, 36, and revision of the capsule nomenclature system to include recently discovered types and subtypes. *Clin Infect Dis* 2020;70(5):798-805.
7. Burckhardt I, Zimmermann S. Susceptibility testing of bacteria using maldi-tof mass spectrometry. *Front Microbiol* 2018;9:1744. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01744>
8. Vasconcelos TM, Rodrigues LS, Krul D, Barbosa SDC, Siqueira AC, Almeida SCG, et al. Fourier transform infrared spectroscopy for *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype classification in pediatric patients with invasive infections. *Front Microbiol* 2024;15:1497377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1497377>
9. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 2011;378(9807):1962-73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62225-8)
10. Burckhardt I, Sebastian K, Mauder N, Kostrzewa M, Burckhardt F, Zimmermann S. Analysis of *Streptococcus pneumoniae* using Fourier-transformed infrared spectroscopy allows prediction of capsular serotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38(10):1883-90. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03622-y>
11. Jürgen Schmitt, Hans-Curt Flemming. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1998;41(1). [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)80002-4)
12. Passaris I, Mauder N, Kostrzewa M, Burckhardt I, Zimmermann S, van Sorge NM, et al. Validation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Serotyping of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2022;60(7):e0032522. <https://doi.org/10.1128/jcm.00325-22>
13. Romero CT, Moreira NK, da Cunha GR, Mott MP, Dias C, Barth AL, et al. Evaluation of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy with IR Biotyper® system for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2025;44(8):1967-76. <https://doi.org/10.1007/s10096-025-05162-0>
14. Vaz M, Meirinhos-Soares L, Sousa CC, Ramirez M, Melo-Cristino J, Lopes JA. Serotype discrimination of encapsulated *Streptococcus pneumoniae* strains by Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics. *J Microbiol Methods* 2013;93(2):102-7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.02.008>
15. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 1991;351(6321):81-2. <https://doi.org/10.1038/351081a0>
16. Lemmer K, Naumann D, Raddatz B, Tintelnot K. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* by PCR fingerprinting, in comparison with serotyping and Fourier transform infrared-spectroscopy-based phenotyping. *Med Mycol* 2004;42(2):135-47. <https://doi.org/10.1080/13693780310001624565>
17. Luck JN, Tettelin H, Orihuela CJ. Sugar-coated killer: Serotype 3 pneumococcal disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:613287. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.613287>
18. Ricketson LJ, Vanderkooi OG, Wood ML, Leal J, Kellner JD. Clinical features and outcomes of serotype 19A invasive pneumococcal disease in Calgary, Alberta. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2014;25(2):e71-5. <https://doi.org/10.1155/2014/196748>
19. Pınar A, Şener B, Ustaçelebi Ş. Serotype prediction for frequently isolated serotypes of *streptococcus pneumoniae* by heteroduplex analysis and modification of this technique to real-time fluorometric nucleic acid detection system. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2010;30(5):1487-92. <https://doi.org/10.5336/medsci.2009-15243>
20. Dhoubhadel BG, Suzuki M, Ishifuji T, Yaegashi M, Asoh N, Ishida M, et al. High prevalence of multiple serotypes of pneumococci in patients with pneumonia and their associated risk factors. *Thorax* 2022;77(11):1121-30. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217979>
21. Kassem A, Abbas L, Coutinho O, Opara S, Najaf H, Kasperek D, et al. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. *Front Microbiol* 2023;14:1304081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304081>
22. Sahu RK, Mordechai S, Pesakhov S, Dagan R, Porat N. Use of FTIR spectroscopy to distinguish between capsular types and capsular quantities in *Streptococcus pneumoniae*. *Biopolymers* 2006;83(4):434-42. <https://doi.org/10.1002/bip.20576>