



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

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

Gizem Öztürk<sup>1</sup>(ID), Emine Arzu Başkale<sup>1</sup>(ID), Ayşe Nur Yurdcu<sup>1</sup>(ID), Figen Teker<sup>1</sup>(ID), Ayşegül Bülbül<sup>1</sup>(ID), Muhammed Emin Demirkol<sup>2</sup>(ID), Nuriye Ünal Şahin<sup>2</sup>(ID), Selin Nar Otgün<sup>2</sup>(ID), Ateş Kara<sup>3</sup>(ID)

<sup>1</sup> Türkiye Vaccine Institute, Aziz Sancar Research Center, Health Institutes of Türkiye, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Microbiology Reference Laboratories Biological Products Directorate, General Directorate of Public Health, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup> Division of Pediatric Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Türkiye

**Cite this article as:** Öztürk G, Başkale EA, Yurdcu AN, Teker F, Bülbül A, Demirkol ME, et al. Pilot study for cost-effective and rapid serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by FTIR-ATR. J Pediatr Inf 2025;19(4):e233-e242.

### 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

### 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

### Correspondence Address/Yazışma Adresi

#### Gizem Öztürk

Türkiye Vaccine Institute,  
Aziz Sancar Research Center,  
Health Institutes of Türkiye  
Ankara, Türkiye

**E-mail:** ozturk9189@gmail.com

**Received:** 17.02.2024 **Accepted:** 25.07.2025

**Available Online Date:** 25.12.2025

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.

Data Sharing Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

©Copyright 2025 by Pediatric Infectious Diseases and Immunization Society. Available online at www.cocukenfeksiyon.org

using Shimadzu FTIR-ATR device and a method was developed to create a serotype library

**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

## Introduction

*Streptococcus pneumoniae* is a gram-positive, extracellular pathogen. It is primarily spread through droplets (1). *S. pneumoniae* can cause non-invasive pneumococcal infections such as otitis media, sinusitis, and pneumonia without bacteremia, as well as invasive infections with a high risk of mortality. Sepsis, meningitis, and bacteremic pneumonia are among these serious conditions (2). Invasive pneumococcal disease primarily affects children under five years of age, individuals over 65 years of age, and those with comorbidities or compromised immune systems (3,4).

Serotype is the classification of a microorganism based on antigenic structures (usually polysaccharides or proteins) found on its surface. This classification, based on surface antigens that enable different strains within the same species to be recognized differently by the immune system, is particularly important for vaccine development, epidemiological surveillance, and diagnosis (5). The polysaccharide capsule surrounding the bacterial cell is the primary virulence factor of *S. pneumoniae* and determines its serotype. Each serotype has structurally distinct capsular polysaccharides, making them antigenically different. Over 100 distinct pneumococcal serotypes have been identified to date (6). Monitoring the distribution of these serotypes is crucial for understanding local epidemiology, determining vaccination strategies, and tracking serotype distribution. Although the Quellung reaction, one of the traditional serotyping methods, is widely used today, it is labor-intensive and time-consuming, requiring special reagents and expertise (7). Although the Quellung reaction (capsule swelling test) is classically used today, latex agglutination tests, polymerase chain reaction-based methods, DNA sequencing (whole genome sequencing, WGS), and Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflection (FTIR-ATR)-based methods can also be used due to their different advantages. Each method has its advantages and limitations, and the choice depends on the context of application. New techniques, such as FTIR-

analiz edilmiş ve serotip kütüphanesi oluşturmak için bir yöntem geliştirilmiştir.

**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

ATR, in particular, have the potential to make serotyping more accessible and less costly in the future (8).

Although the introduction of conjugate pneumococcal vaccines into clinical use has been shown to be very effective in reducing the burden of pneumococcal disease, the high number of serotypes and changes in serotype distribution mean that new serotypes not covered by the vaccine are still detected at a higher rate as infectious agents, which remains a significant problem (9). Therefore, serotyping plays a vital role in epidemiological studies and the evaluation of vaccine effects. Table 1 shows the serotypes covered by vaccines that have entered clinical use.

FTIR-ATR analysis is based on measuring the absorption of radiation in the infrared (IR) region of the electromagnetic spectrum, which has a longer wavelength (approximately 2.5-25  $\mu\text{m}$ ) and lower frequency (approximately 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) than visible light. In this technique, when the sample is exposed to IR radiation, the covalent bonds at the molecular level vibrate at characteristic frequencies and absorb the radiation (10). Each functional group creates a unique absorption band corresponding to a specific vibration mode. These vibration modes -such as stretching, bending, scissoring, and twisting-differ depending on the type of intramolecular bonds, bond strength, and atomic mass (11). The absorption spectrum obtained by FTIR spectroscopy provides a qualitative profile specific to the chemical structure of a compound, referred to as its "molecular fingerprint (12)."

FTIR analysis of bacterial isolates enables the acquisition of microorganism-specific spectral profiles by covering the specific vibrations of many biomolecules, including cell wall components (e.g., polysaccharides, proteins, lipids, and nucleic acids) (13). Thus, this technique offers rapid, label-free, and reagent-free characterization and classification at the microorganism level. FTIR-ATR spectroscopy is used to distinguish bacterial and yeast species at different taxonomic levels (14). This method is advantageous because it is simple, fast, and does not require special reagents for analysis (15).

**Table 1.** Serotypes covered by pneumococcal vaccines in clinical use

Vaccine	Serotypes Covered
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-valent pneumococcal conjugate vaccine, PCV10: 10-valent pneumococcal conjugate vaccine, PCV13: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, PCV15: 15-valent pneumococcal conjugate vaccine, PCV20: 20-valent pneumococcal conjugate vaccine, PCV21: 21-valent pneumococcal conjugate vaccine.

In bacterial differentiation applications, identification studies have been conducted at the capsular type, serotype, or serogroup level for microorganisms such as *Cryptococcus neoformans* and enterococci (16).

Considering that identification at the serotype or serogroup level is possible, this study was planned to meet the need for serotyping through a reference library created using a low-cost, easy-to-implement method. The potential for widespread use of the serotyping method developed using the FTIR-ATR device, which is fast, low-cost, label-free, and has a wide range of applications, was investigated; the initial findings obtained have also made significant contributions to the literature. In this context, a comparative analysis of isolates containing different serotypes was performed, and the high reproducibility of the obtained spectra was also evaluated.

## Materials and Methods

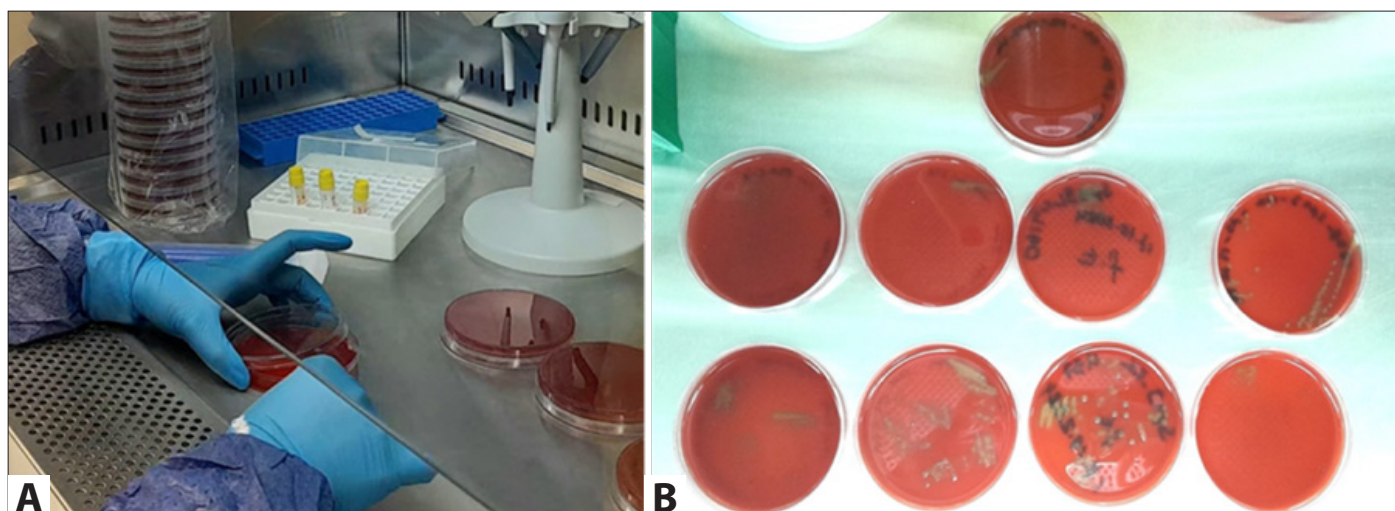
### Isolates Obtained

The *S. pneumoniae* isolates used in this study were obtained from the Microbiology Reference Laboratories Department of the Turkish Public Health Agency. A total of eight isolates belonging to four different serotypes (3, 19A, 23B, and 9L) were selected. Serotype selection was based on the fact that

these strains exhibit different infection characteristics from a microbiological, clinical, and epidemiological perspective. Although included in the current 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, serotype 3 is known to be more resistant to antibody-mediated elimination than other serotypes, likely due to its thicker capsule (17). Serotype 19A, on the other hand, is particularly common in the pediatric age group and is associated with high rates of antibiotic resistance (18). Serotype 23B has been identified as one of the serotypes relatively frequently isolated from pneumococcal infections in Türkiye (19). Serotype 9L, which is not included in the vaccine, has been reported as one of the predominant secondary serotypes associated with multi-serotype pneumonia cases (20).

### Bacterial Culture Preparation

The *S. pneumoniae* serotypes used in the study (3, 19A, 23B, 9L) were stored at -86 °C in skim milk powder. Prior to the study, the isolates were inoculated onto sheep blood agar (medium containing 5% defibrinated sheep blood) under sterile conditions and then incubated at 37 °C for 24 hours under atmospheric conditions containing 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). Figure 1A shows the inoculation of *S. Pneumoniae* serotypes and Figure 1B shows their appearance after incubation.



**Figure 1.** (A) *S. pneumoniae* serotypes culture and (B) appearance after incubation at 37 °C for 24 hours in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### FTIR Spectrum Measurement and Analysis of the Serotype Library

FTIR-ATR provides information about the presence or absence of chemical structures and specific functional groups in the samples. FTIR-ATR spectroscopy has long been used as a technique for identifying microorganisms based on their unique spectral fingerprint profiles. FTIR spectra of microbial cells, including bacteria, produce characteristic peaks indicating the presence of carbohydrates, proteins, lipids, and their functional groups. These spectral patterns enable the identification of microorganisms at the species or serotype level by comparing them with reference spectra in databases. Especially for bacterial identification, the obtained FTIR spectra can be compared with reference spectra to distinguish samples based on their unique spectral characteristics (21). Within the scope of this study, a method was developed to create a spectral library for the isolates used, and the analyses were performed using a Shimadzu FTIR-ATR device.

FTIR-ATR analyses of *Streptococcus* species were performed using two different methods. In the first method, samples taken directly from the blood agar surface using a sterile cotton swab were applied to the ATR crystal, and spectrum measurements were performed. In the second method, samples taken from blood agar were transferred to a bacterial transport medium, and this suspension was dripped directly onto the ATR crystal for measurements. All spectra obtained by both methods were combined, analyzed, and evaluated for the creation of a serotype library.

### Results

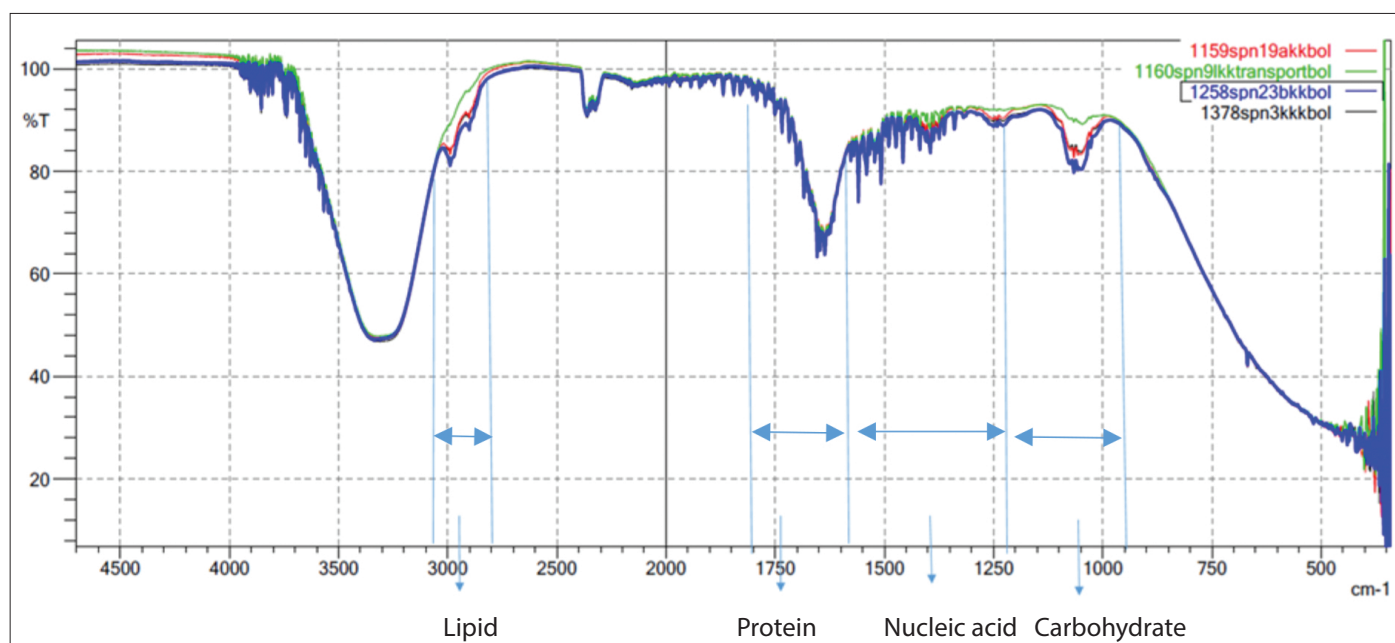
#### Culturing Different *S. pneumoniae* Isolates in an In Vitro Environment

Bacteria belonging to four different *S. pneumoniae* serotypes (3, 19A, 23B, and 9L), comprising a total of eight isolates, were obtained from samples stored at -86 °C. These isolates were inoculated onto sheep blood agar plates and incubated at 37 °C for 24 hours under atmospheric conditions containing 5% CO<sub>2</sub> to allow bacterial colonies to form. At the end of the incubation period, microbial growth was observed on all plates.

#### Analysis of FTIR-ATR Spectra

The lipid, protein, amino acid, and carbohydrate regions in the FTIR-ATR spectra of *S. pneumoniae* serotypes (3, 19A, 23B, and 9L) are shown in Figure 2, respectively. The absorption peaks observed in this spectrum in the range of 3100 to 2700 cm<sup>-1</sup> (wavenumber unit is preferred instead of nanometer) correspond to the symmetric and asymmetric stretching vibration modes of the methyl (-CH<sub>3</sub>) and methylene (-CH<sub>2</sub>) groups present in the lipid components of the isolates. This finding demonstrates that the lipid profiles in bacterial cell membranes and internal structures can be identified spectroscopically.

The peaks observed in the 1800-1400 cm<sup>-1</sup> (wavenumber) range of the spectrum represent the amide I and amide II bands belonging to the protein components of the isolates. These bands provide information about the secondary structures of proteins.



**Figure 2.** Lipid, protein, amino acid, and carbohydrate regions in the FTIR-ATR spectra of *S. pneumoniae* serotypes, respectively.

The 1400-1200  $\text{cm}^{-1}$  range has a more complex structure. In this region, the bending vibrations of  $-\text{CH}_2$  groups, the symmetric stretching vibrations of carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) groups, and the asymmetric stretching vibrations of phosphodiester ( $\text{P}=\text{O}$ ) bonds specific to the nucleic acids of the isolates overlap.

Analyses using two different methods were performed with three technical replications for each isolate belonging to all serotypes, and the obtained FTIR spectra were comparatively evaluated in terms of analytical reproducibility, spectral regional variations that could enable serotyping, and functional group similarities in the capsular polysaccharide regions.

The chemical characterization of *S. pneumoniae* serotypes using FTIR-ATR technique was performed using two different sample preparation methods.

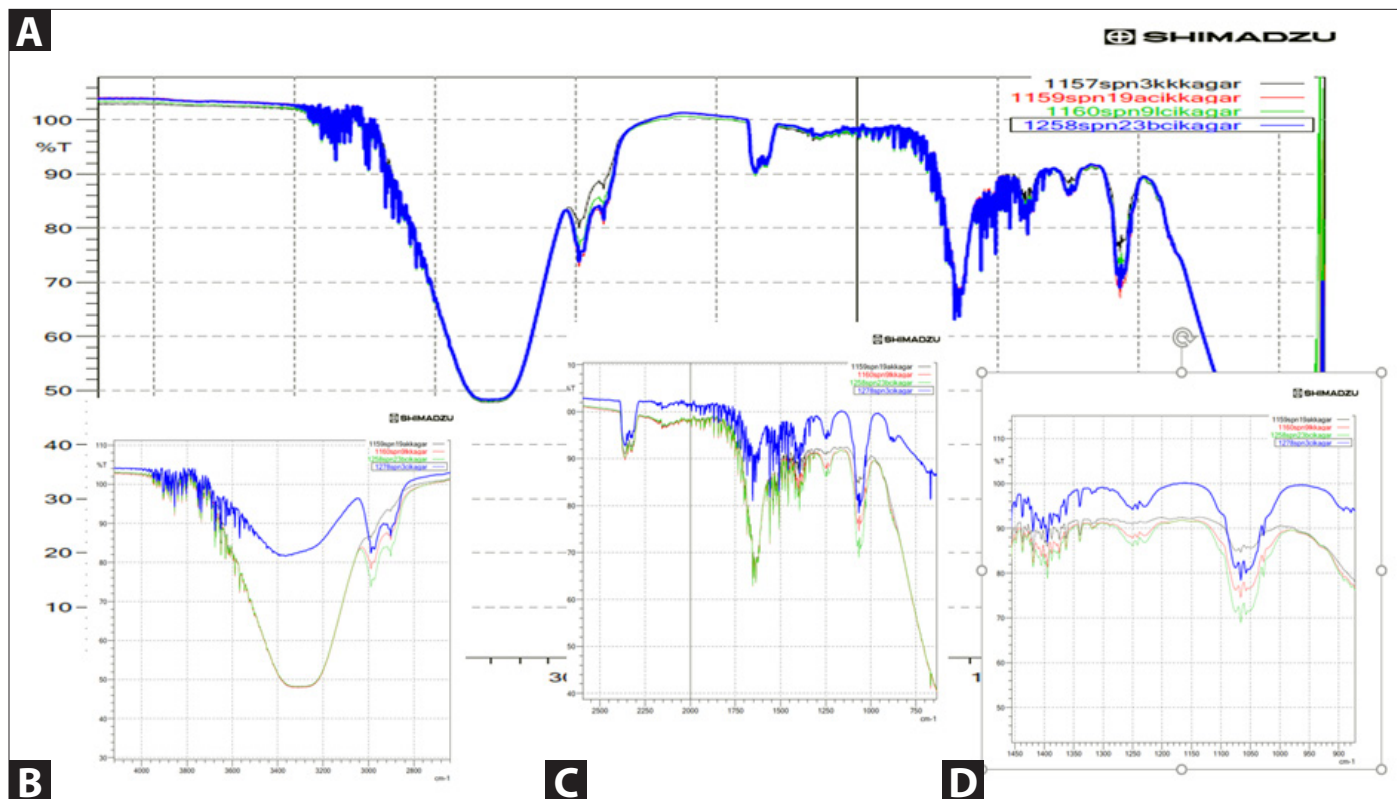
In the first method, colony samples directly isolated from blood agar medium were transferred to the ATR crystal surface for spectral analysis, and the resulting spectra are presented in Figure 3. This spectrum shows the FTIR-ATR spectra of isolates belonging to serotypes 3, 19A, 23B, and 9L, taken directly from blood agar and placed on the ATR crystal, and enlarged versions of the regions where differences between serotypes

were observed. In the second method, colony samples taken from blood agar were suspended in a sterile bacterial transport medium and then transferred to the ATR crystal. The FTIR-ATR spectra obtained with this sampling procedure are shown in Figure 4. Additionally, Figure 5 presents detailed views of the spectral regions where variations between serotypes became apparent. These two different sampling approaches enabled the spectroscopic evaluation of potential changes in bacterial cell wall components and metabolic profiles.

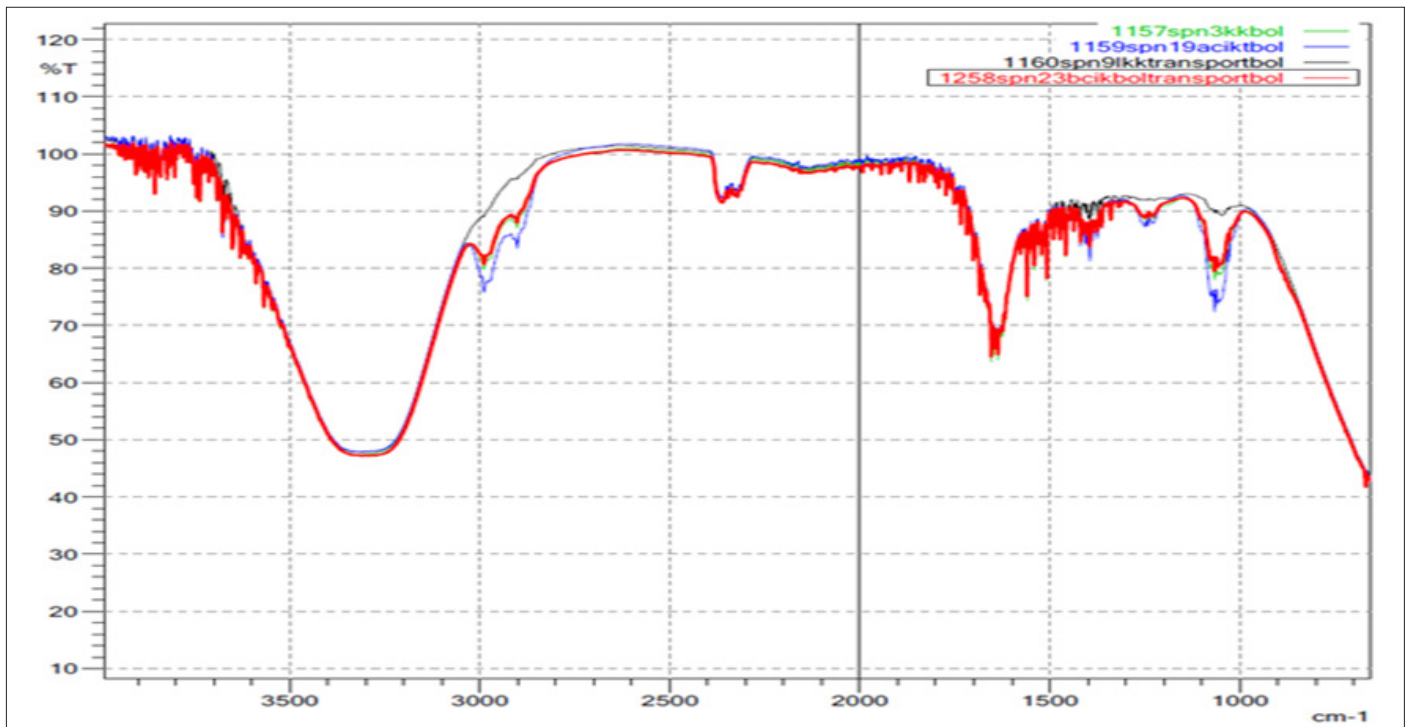
Figure 5 presents close-up views of regions in the FTIR-ATR spectra of spn 3, spn 19A, spn 23B, and spn 9L isolates obtained from the bacterial transport medium that show differences that could enable serotyping. Additionally, FTIR-ATR spectrum images obtained from three consecutive sets of analyses performed on serotype 9L, serotype 23B, and serotype 19A in the bacterial transport medium are shown in Figures 6, 7, and 8, respectively. All these spectra were combined and examined to create a serotyping library.

## Discussion

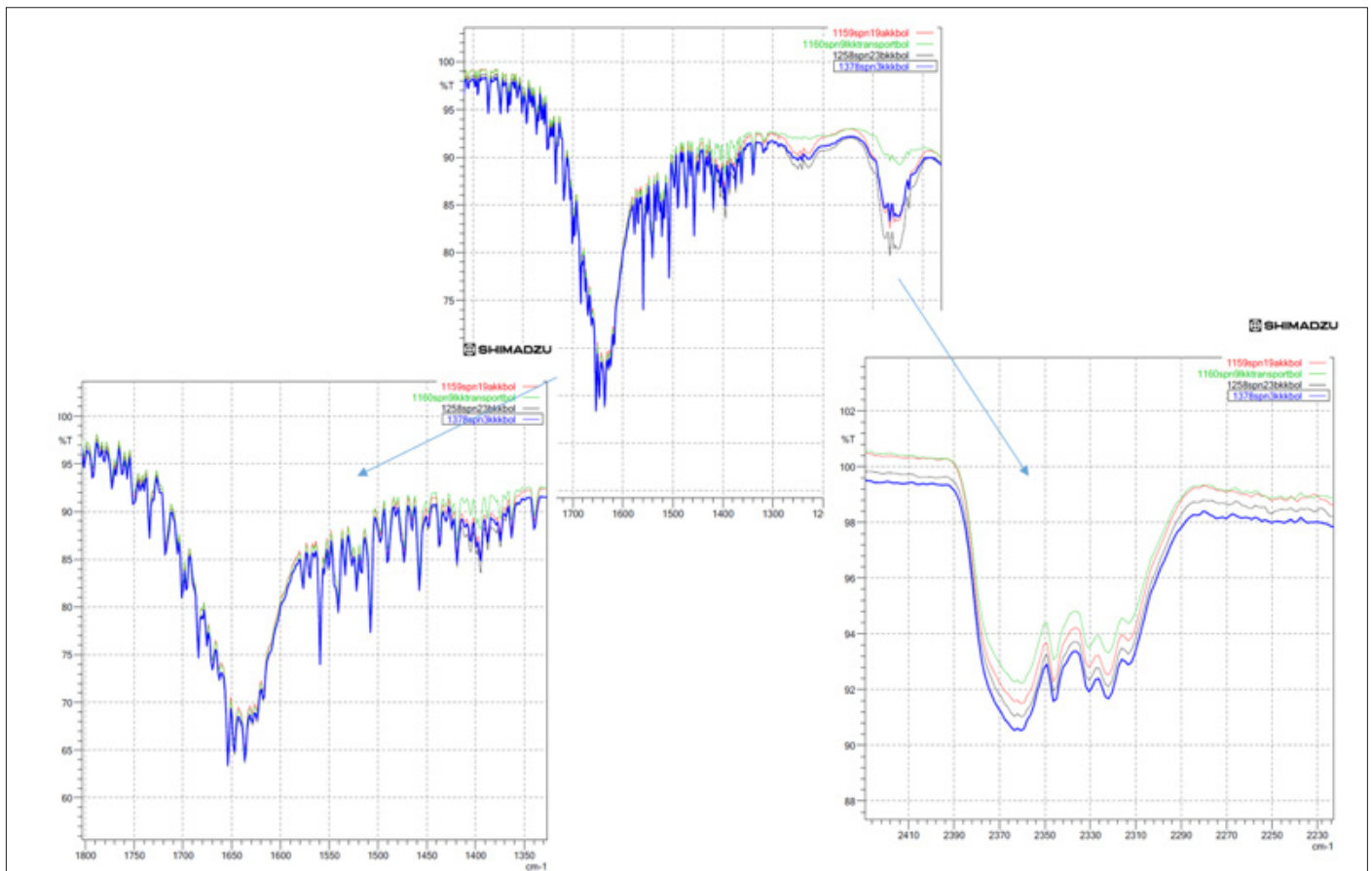
The use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, particularly in ATR mode, has become a powerful tool in microbiological analysis. This technique provides discriminatory analysis at the species and strain level by



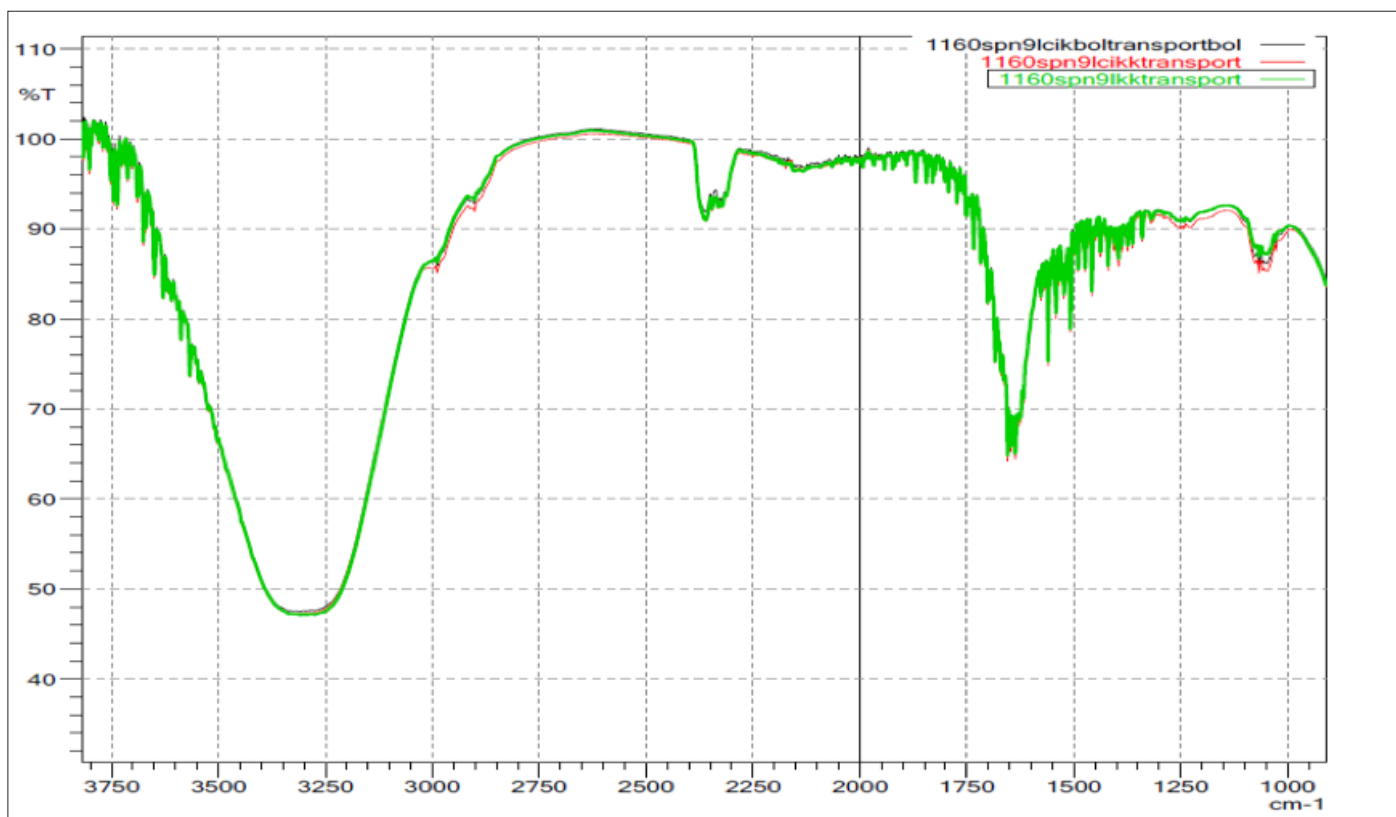
**Figure 3.** Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR-ATR spectra of isolates directly obtained from blood agar: **(A)** Full spectrum of isolates spn 3, spn 19A, spn 23B, spn 9L directly obtained from blood agar. **(B, C, D)** Close-up views of the distinct regions of the FTIR-ATR spectra of spn 3, spn 19A, spn 23B, and spn 9L isolates obtained directly from blood agar.



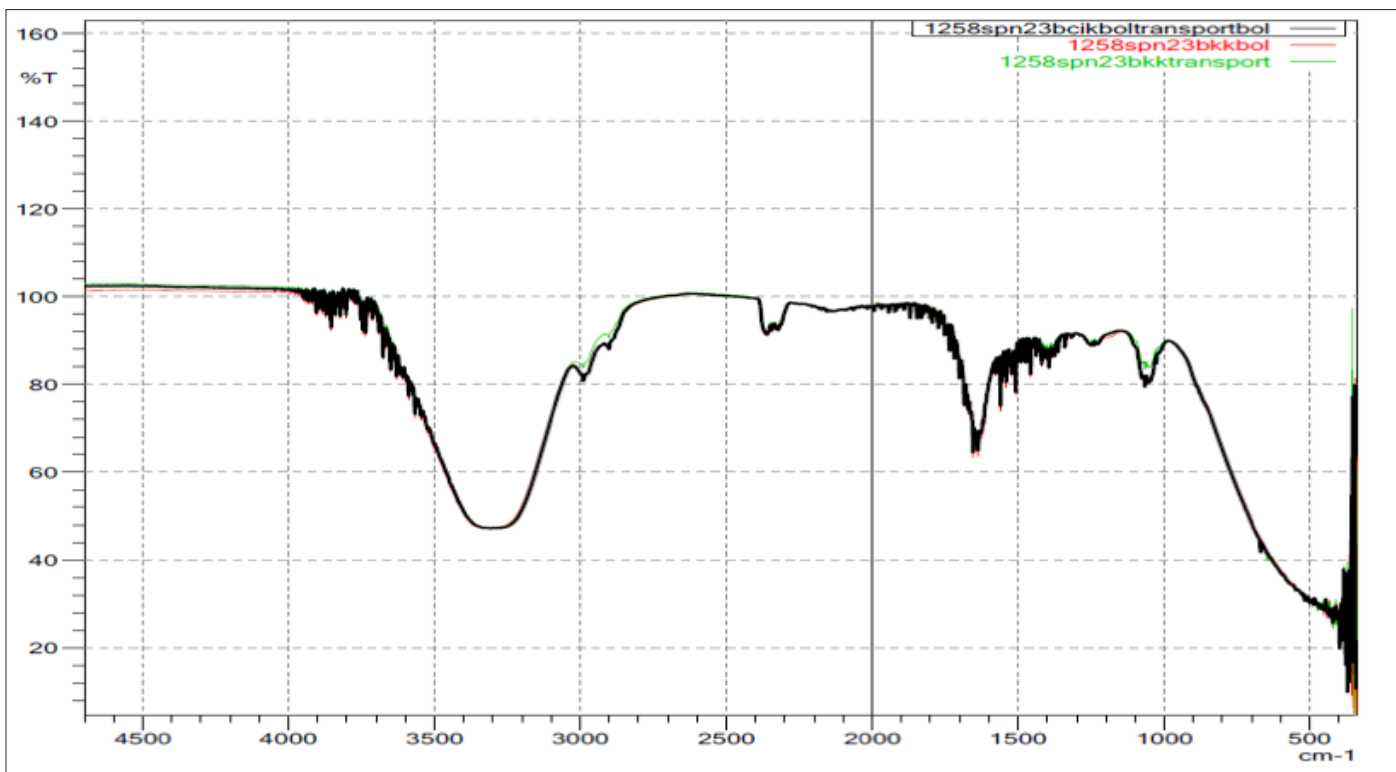
**Figure 4.** Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR-ATR spectra obtained from serotypes 3, 19A, 23B, and 9L suspended in a bacterial transport medium.



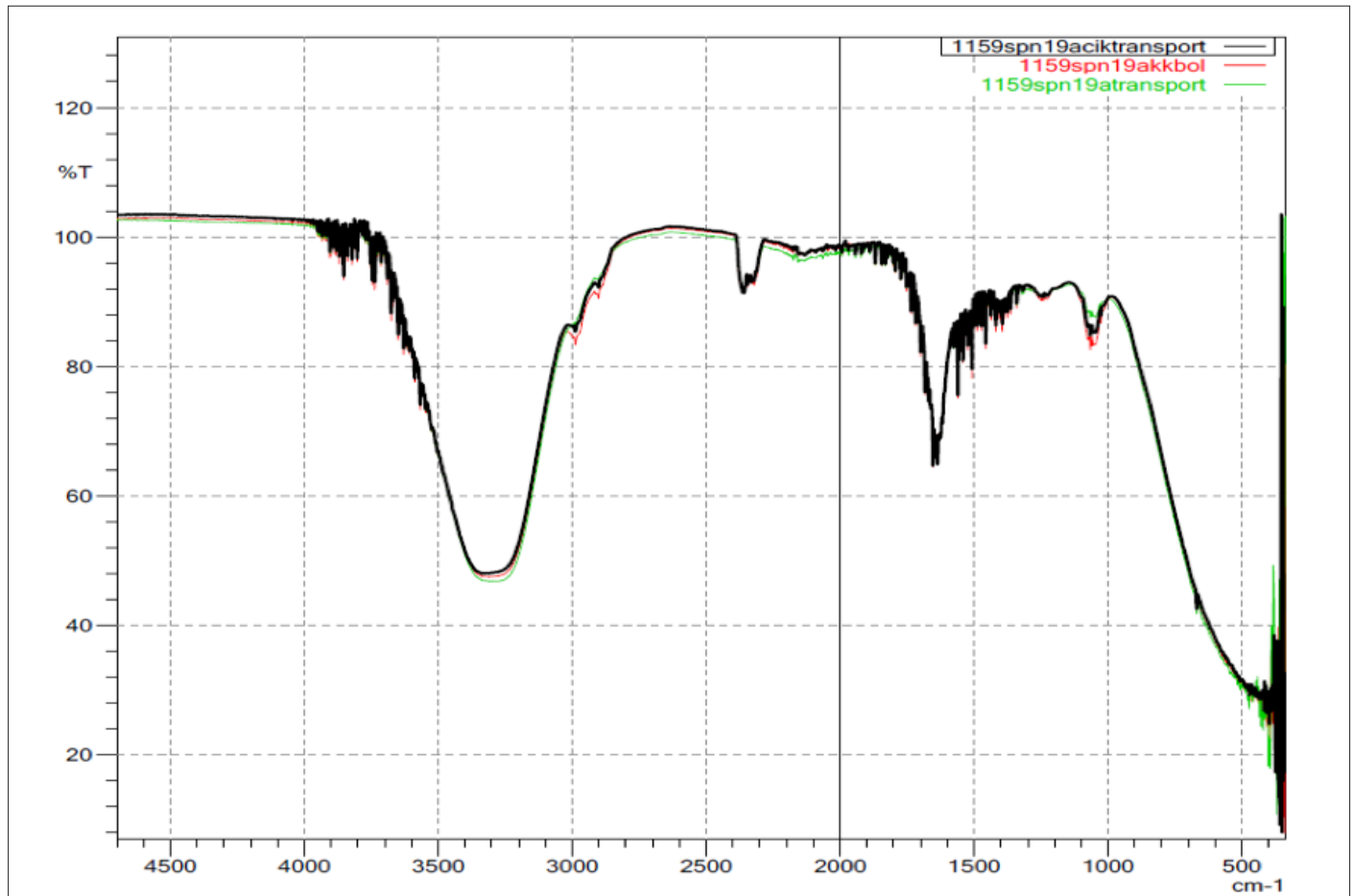
**Figure 5.** Close-up views of the FTIR-ATR spectra of the spn 3, spn 19A, spn 23B, and spn 9L isolates obtained in suspension in the bacterial transport medium.



**Figure 6.** Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR-ATR spectra obtained from serotype 9L suspended in a bacterial transport medium, corresponding to three consecutive sets of analyses.



**Figure 7.** Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR-ATR spectra obtained from serotype 23B suspended in a bacterial transport medium, corresponding to three consecutive sets of analyses.



**Figure 8.** Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR-ATR spectra obtained from serotype 19A suspended in a bacterial transport medium, corresponding to three consecutive sets of analyses.

detecting the unique biochemical “fingerprints” of bacterial cell arrangements and polysaccharide/capsule structures. FTIR-ATR spectroscopy offers the opportunity for direct colony analysis without the need for pretreatment; in this respect, it provides significant advantages over classical methods in terms of time, labor, and cost.

In the data obtained in this study, minimal differences in nucleic acid sequences or concentrations between different serotypes caused limited changes in the 1600-1300 nm range. This suggests that nucleic acid-based differentiation is less pronounced in this wavelength range.

The main structural element that is decisive in the serotyping of *S. pneumoniae* is the capsular polysaccharides on the cell surface. These polysaccharides produce characteristic absorption bands in FTIR spectra, particularly in the 1200-950  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber range. This region is known as the “carbohydrate region,” where C-O-C glycosidic bonds and C-O ring vibrations are dominant. Different serotypes possess capsular polysaccharides composed of structurally distinct numbers and types of monosaccharide units. This structural diversity creates distinct differences in the intensity, position,

and number of peaks observed in the spectrum. In particular, some serotypes carry more branched and complex capsules, while others are simpler in structure; this creates unique “chemical fingerprints” that provide diagnostic discrimination in FTIR analysis. Thus, the unique polysaccharide composition of each serotype produces a distinctive profile in the FTIR spectrum, providing a reliable basis for the serotyping process.

The spectral differences observed in both sample preparation methods used during the study were minimal and did not provide sufficient resolution to create a discriminating spectral library for serotyping purposes. This indicates that the sensitivity of the current FTIR-ATR system is insufficient for serotype distinctions at this level. The components of the FTIR-ATR device that come into direct contact with the sample surface provide spectral information. However, in some *S. pneumoniae* serotypes, the capsule structure may be thin, loose, or excessively thick. This results in insufficient capsular material contacting the ATR crystal, leading to a low signal. Capsular polysaccharides that differ between serotypes can cause overlapping peaks in FTIR spectra when they are based on structurally similar monosaccharide subunits. This can

make spectral discrimination difficult. The heterogeneous nature of bacterial colonies can cause different serotypes to show similarities in their FTIR signals. In particular, insufficient standardization and variation in biomass density can reduce the quality of the spectral signal. For all these reasons, sufficient resolution may not have been achieved to create a spectral library.

Based on all these results, it is evident that future studies should be conducted with more different serotypes and a larger number of samples to overcome the limitations of this study and develop a more sensitive and discriminative method. In this regard, studies should be conducted by adding a pre-treatment step to the samples to enable a more accurate analysis of the polysaccharide structural differences that are indicative of serotype differentiation.

In the study, the spectral data of each isolate was obtained by repeating the measurement three times consecutively. As clearly seen in these spectra, the spectra obtained in three separate analyses for each serotype show overlap. This scientifically confirms that the FTIR-ATR methodology used has a high level of repeatability and that measurement consistency is successfully achieved.

## Conclusion

When all the data obtained were evaluated comparatively, it was seen that although the FTIR-ATR device offers cost-effective and rapid analysis methods, it is not specific enough to develop a serotyping method by creating a *S. pneumoniae* serotype library.

However, the sensitivity of the method can be increased by increasing the capsule density of streptococci. For this purpose, pre-processing techniques (e.g., enzymatic cell wall removal, capsule extraction) can be applied to the sample. This allows capsule-derived signals to become dominant in the spectrum.

Another approach for this purpose could be the use of artificial neural networks, Support Vector Machines (SVM), or deep learning-based classifiers rather than simple statistical approaches. These methods will provide an advantage in terms of serotyping as they will achieve superior success in distinguishing even minimal variations within the spectrum.

Furthermore, datasets containing biological replicates for each serotype will increase the reliability of classification. Therefore, this method shows promise for distinguishing *S. pneumoniae* from other bacterial species by increasing the number of serotypes analyzed.

Various studies in the world literature have also highlighted both the potential and limitations of FTIR-ATR spectroscopy in pneumococcal serotyping. For example, in one study, Sahu et al. aimed to evaluate the potential of FTIR

microscopy to distinguish between the capsular proteins of *S. pneumoniae* and identify different serotypes (22). They suggested that the spectral fingerprints of different serotypes likely stem from differences in capsule composition among *S. pneumoniae* strains. They noted that shifts in absorption peaks indicate differences in carbohydrate content among various serotypes. However, they emphasized the limitations of the method they found at the end of the study and stated that the reproducibility of their work should be demonstrated with more data.

In another study, Vaz et al. evaluated FTIR spectroscopy as an alternative method for serotyping capsulated *S. pneumoniae* strains (14). According to the results of the study, they determined that the spectral region that best revealed serotype differences was between 1185-900  $\text{cm}^{-1}$ . The results showed that it was possible to distinguish serotypes belonging to the same serogroup, even though the spectral differences were not very pronounced. In parallel with the data obtained by Vaz et al., the 1185-900  $\text{cm}^{-1}$  region covered the carbohydrate and nucleic acid region that we identified in our study, yielding results consistent with the literature.

Consistent with this and similar studies in the literature, our findings indicate that although FTIR-ATR is promising, improved statistical approaches (such as multivariate statistical analysis methods like principal component analysis and partial least squares discriminant analysis or machine learning models such as SVM, artificial neural networks & deep learning, random forests etc.) and expanded spectral databases (high-quality representative samples, standardized sample preparation and measurement protocols, data normalization and preprocessing etc.).

**Ethics Committee Approval:** Since no primary biological samples were used in this study, no ethics committee approval is required.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept - GÖ, AK; Design - GÖ, AK; Supervision - SNO, AK; Resource - NUS, SNO, AK; Data Collection and/or Processing - GÖ, EAB, ANY, FT, AB; Analysis and/or Interpretation - GÖ, EAB, ANY, FT, AB; Literature Search - GÖ, EAB, ANY, FT, AB; Writing - GÖ, AK; Critical Review - GÖ, EAB, SNO, AK.

**Conflict of Interest:** All authors declare that they have no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## References

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 3<sup>rd</sup>, Zhanell 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, Oriuela 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. Pinar 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>



# *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 Öztürk<sup>1</sup>(ID), Emine Arzu Başkale<sup>1</sup>(ID), Ayşe Nur Yurdcu<sup>1</sup>(ID), Figen Teker<sup>1</sup>(ID), Ayşegül Bülbül<sup>1</sup>(ID), Muhammed Emin Demirkol<sup>2</sup>(ID), Nuriye Ünal Şahin<sup>2</sup>(ID), Selin Nar Otgün<sup>2</sup>(ID), Ateş Kara<sup>3</sup>(ID)

<sup>1</sup> Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı, Aziz Sanca Araştırma Merkezi, Türkiye Aşı Enstitüsü, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Biyolojik Ürünler Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup> 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

## Abstract

**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.

**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 Sanca 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

**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

**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

## 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 yapıları (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

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 kullanılabilmektedir. 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 aşılarının 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 valanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV10: 10 valanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV13: 13 valanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV15: 15 valanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV20: 20 valanlı konjuge pnömokok aşısı, PCV21: 21 valanlı konjuge pnömokok aşısı.

(yaklaşık  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) sahip ışınımın 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 bileşimin 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, lipitler 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 tipleri, 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.

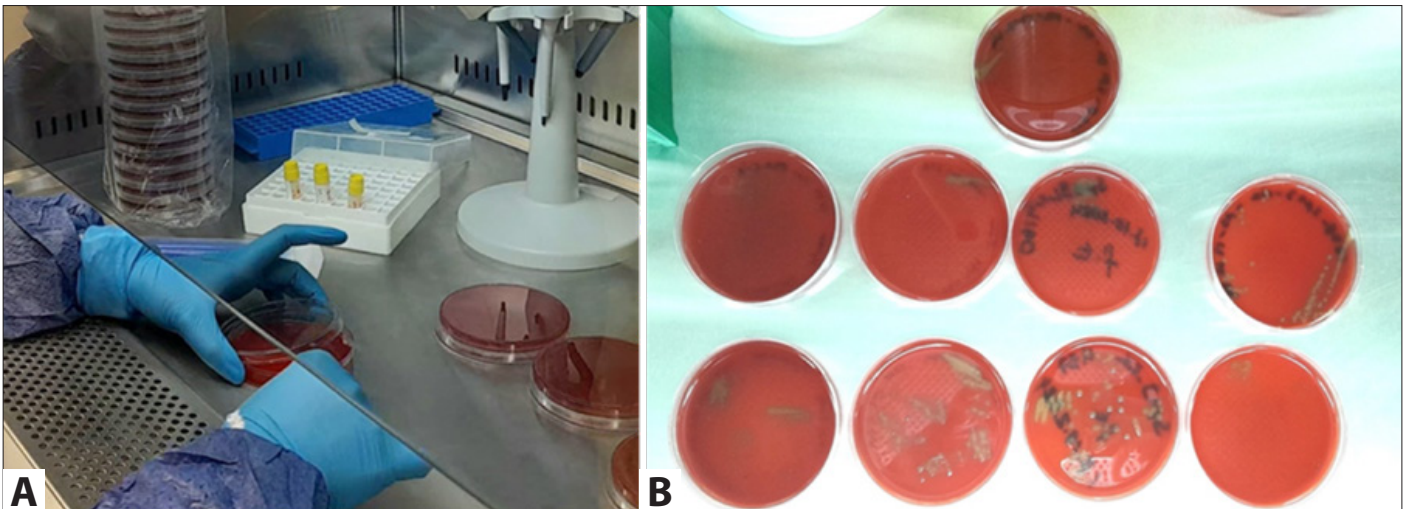
## Gereç ve Yöntemler

### 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 pnömoni vakalarıyla ilişkili basın ikinci 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 ( $\text{CO}_2$ ) 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  $\text{CO}_2$  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; karbonhidratlar, 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 izolatlarla ait 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

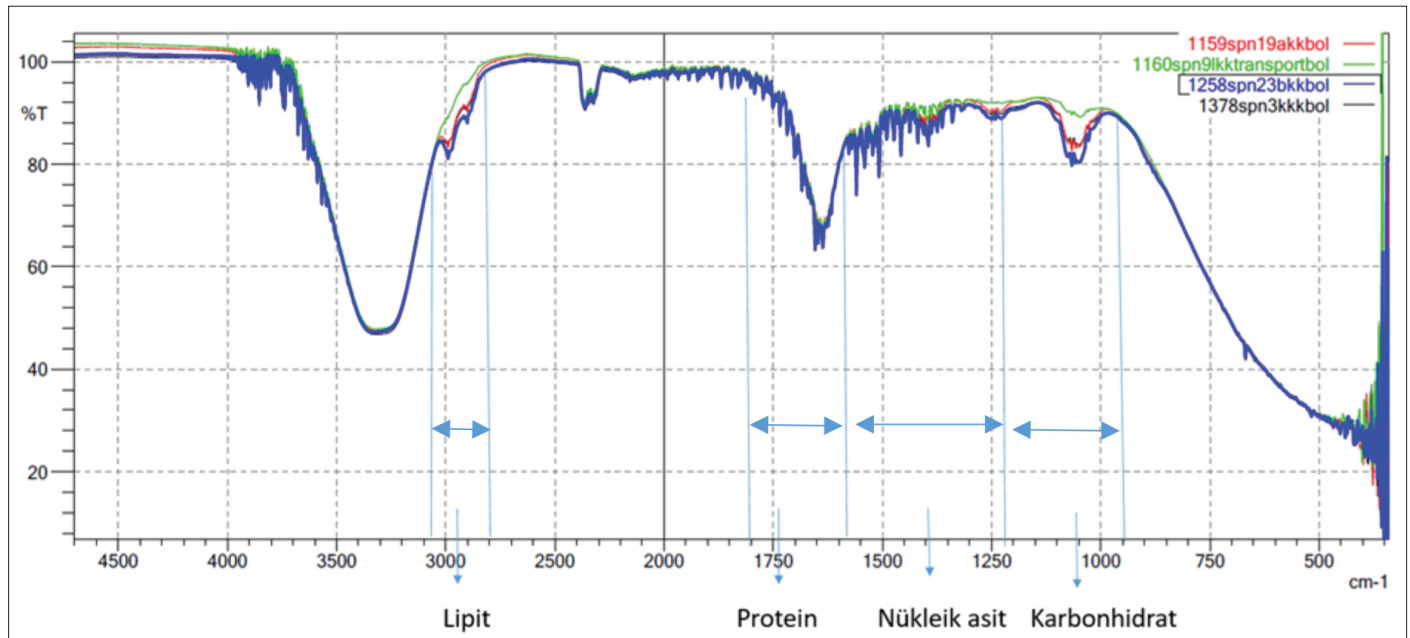
Toplam sekiz izolat içeren dört farklı *S. pneumoniae* serotipine (3, 19A, 23B ve 9L) ait bakteriler, -86 °C'de depolanmış örneklerden elde edilmiştir. Bu izolatlar, koyun kanlı agar plaklarına inoküle edilmiş ve bakteri kolonilerinin oluşumunu sağlamak amacıyla %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosfer koşullarında, 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 karbonhidrat bölgeleri sırasıyla Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu spektrumda 3100 ile 2700 cm<sup>-1</sup> (nanometre yerine dalga sayısı birimi tercih edilir) aralığında gözlenen absorpsiyon pikleri, söz konusu izolatların lipid bileşenlerinde mevcut olan metil (-CH<sub>3</sub>) ve metilen (-CH<sub>2</sub>) gruplarının simetrik ve asimetric germe titreşim modlarına karşılık gelmektedir. Bu bulgu, bakteriyel hücre zarı ve iç yapılarındaki lipid profillerinin spektroskopik yolla tanımlandığını ortaya koymaktadır.

Spektrumun 1800-1400 cm<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup> aralığı ise daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu bölgede, -CH<sub>2</sub> gruplarının eğilme titreşimleri, karboksilat (COO<sup>-</sup>) gruplarının simetrik germe titreşimleri ve izolatların



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

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

İki farklı yonteme 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 kapsüler polisakkarit bölgelerindeki fonksiyonel grup benzerlikleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

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

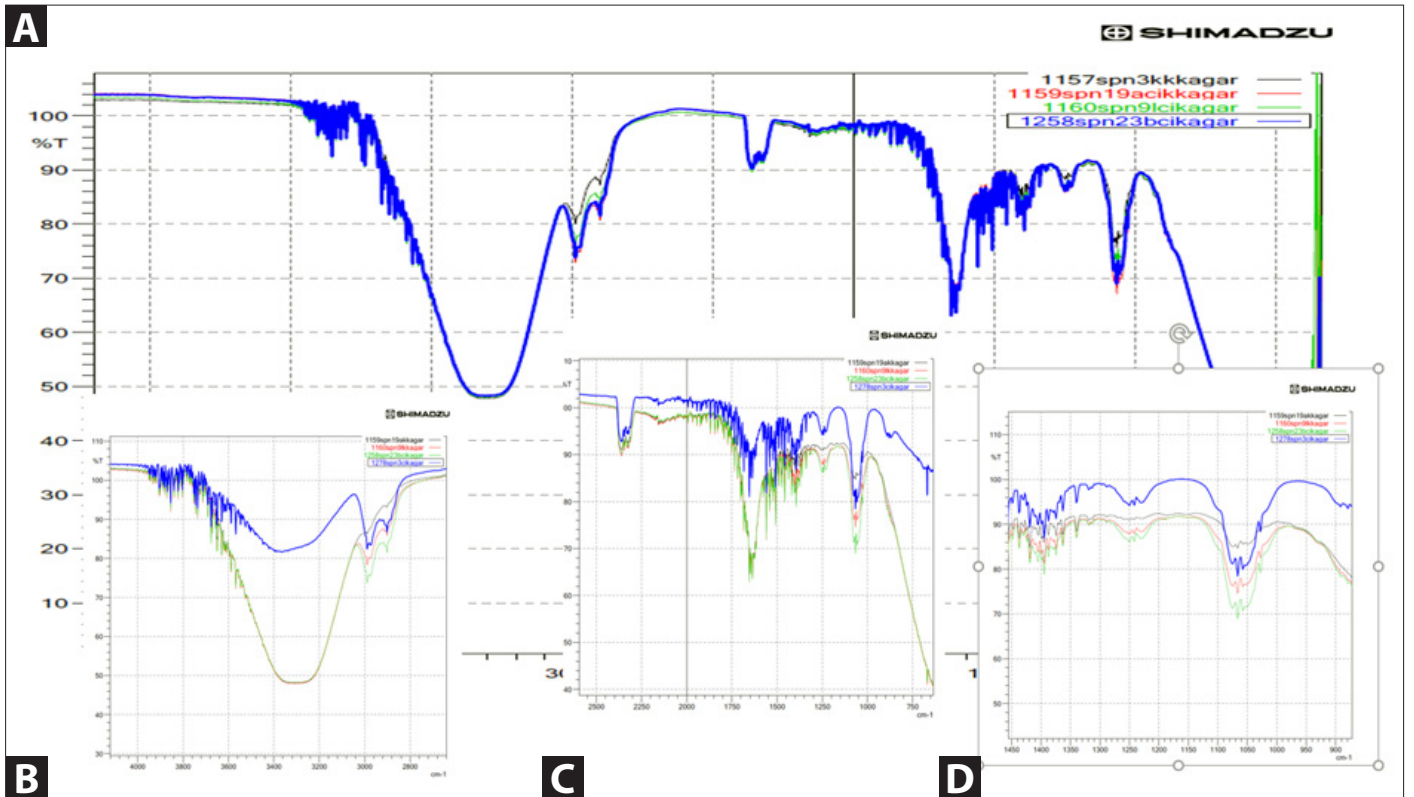
İlk yöntemde, kanlı agar besiyerinden doğrudan izole edilen koloni örnekleri, ATR kristal yüzeyine transfer edilerek spektral analizler yapılmış ve elde edilen spektrumlar Şekil 3'te sunulmuştur. Bu spektrum serotip 3, 19A, 23B ve 9L'ye ait, doğrudan kanlı agardan alınıp ATR kristaline yerleştirilen 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.

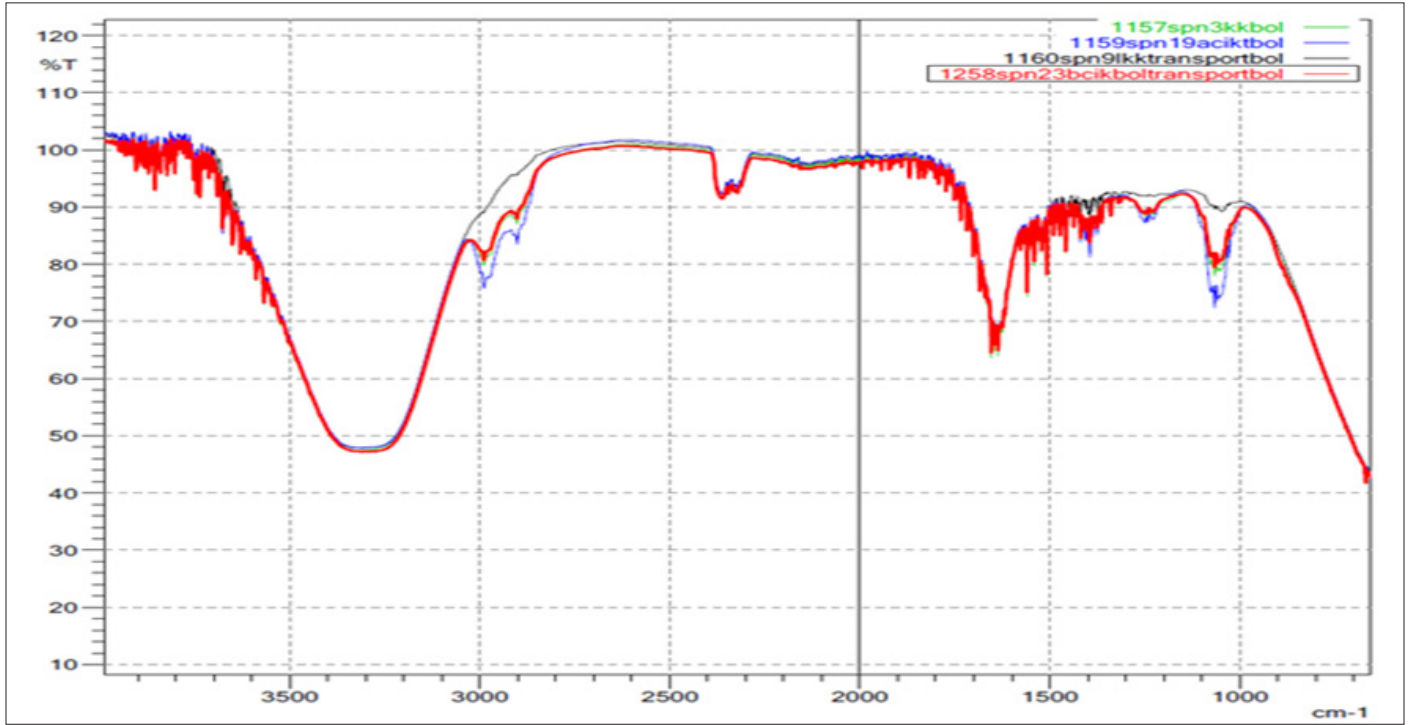
Şekil 5'te, bakteri taşıma ortamından elde edilen spn3, spn 19A, spn 23B ve spn 9L izolatlarına ait FTIR-ATR spektrumlarının serotiplemeye olanak sağlayabilecek farklılıklar gösteren bölgelerinin yakın görünümü sunulmuştur. Ayrıca, serotip 9L, serotip 23B ve serotip 19A'nın bakteri taşıma ortamında gerçekleştirilen 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

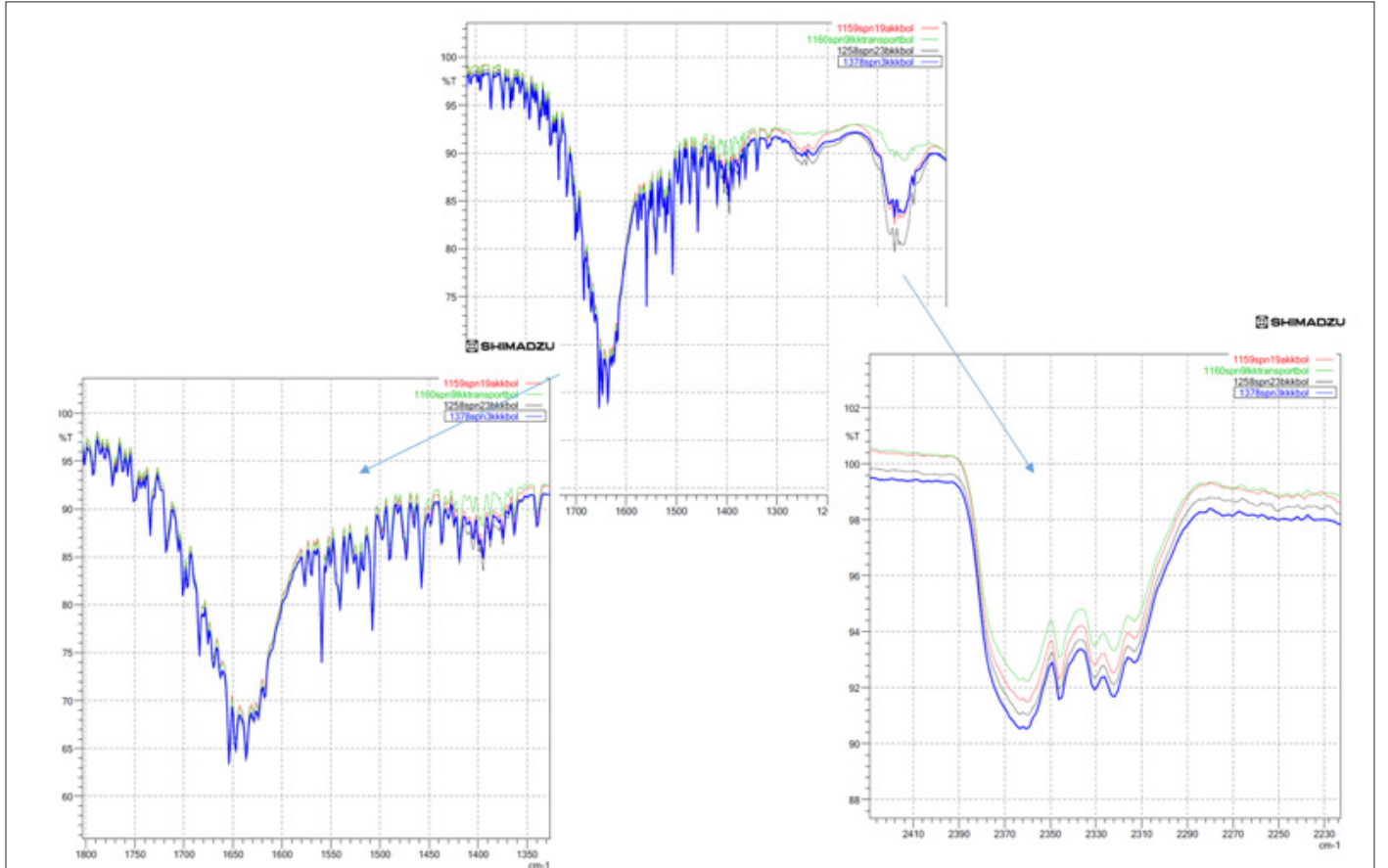
FTIR-ATR modunda kullanımı, mikrobiyolojik analizlerde güçlü bir araç haline gelmiştir. Bu teknik, bakteriyel hücre dizilimlerinin ve polisakkarit/kapsül yapılarının özgün biyokimyasal "parmak izlerini" tespit ederek, tür ve suş düzeyinde ayırt edici analizler sağlar. FTIR-ATR spektroskopisi, ön hazırlık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



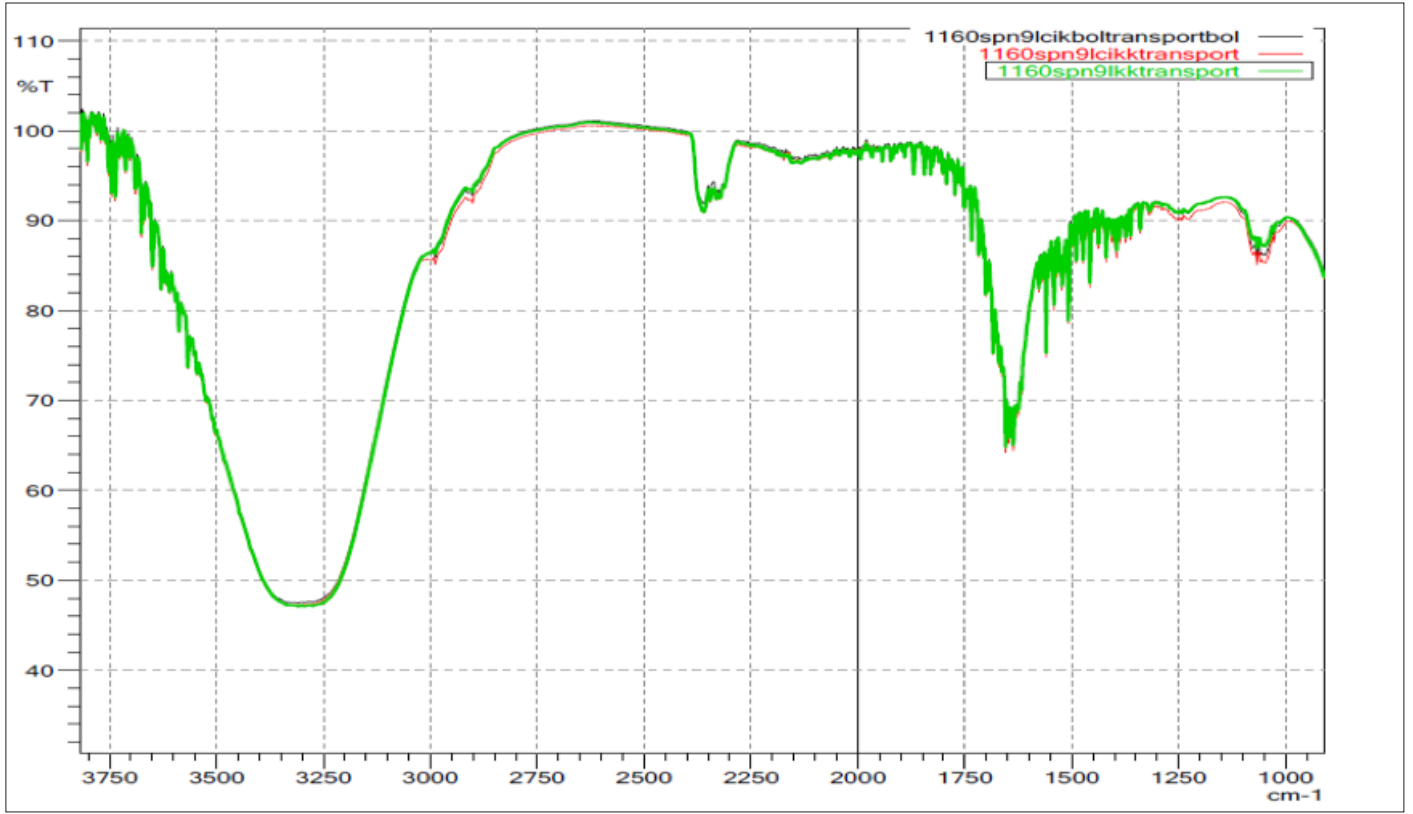
**Şekil 3.** Doğrudan kanlı agardan alınan izolatların Fourier transform kızılötesi spektroskopisi –FTIR-ATR spektrumları: **(A)** Doğrudan kanlı agardan alınan spn 3, spn 19A, spn 23B, spn 9L izolatlarının full spektrumu. **(B, C, D)** Doğrudan kanlı agardan alınan spn 3, spn 19A, spn 23B, spn 9L izolatlarının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



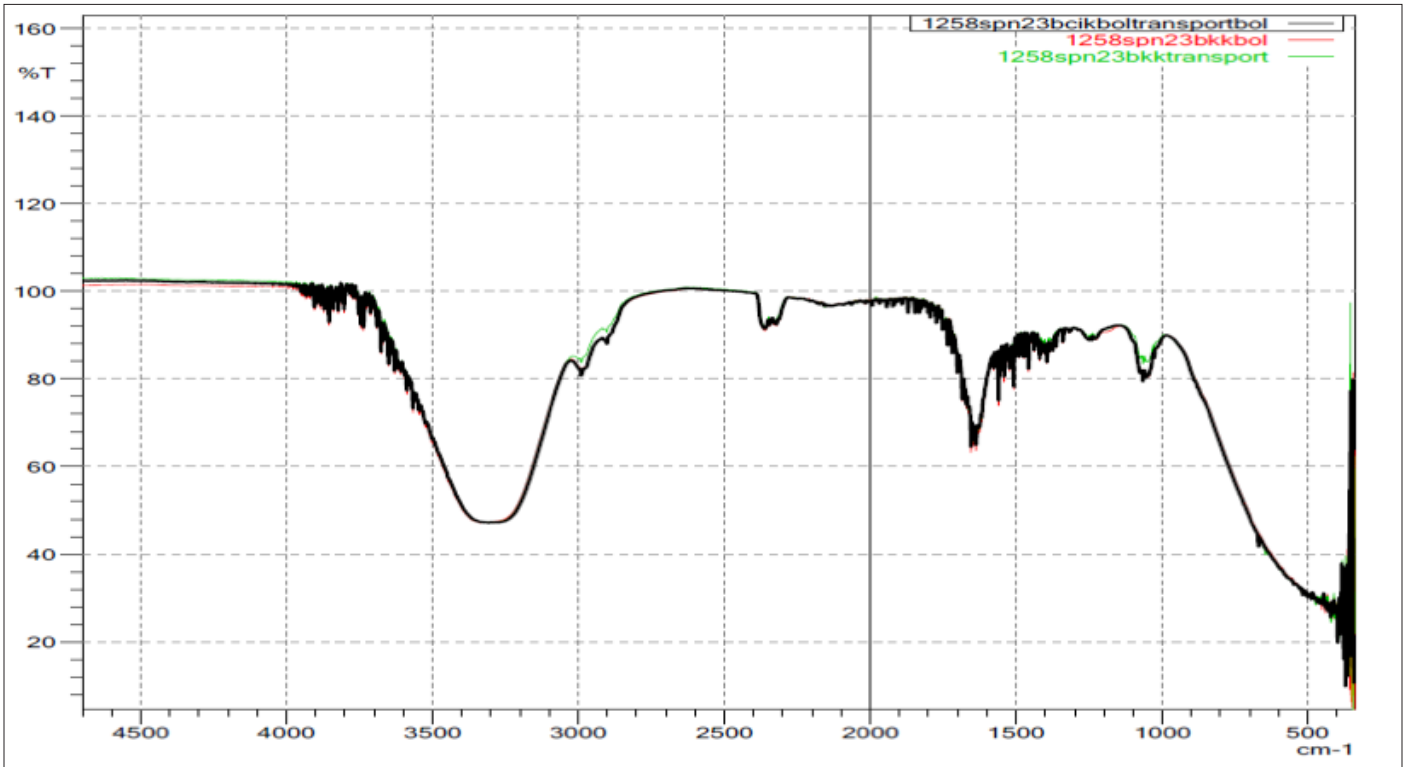
Şekil 4. Bakteri taşıma ortamında süspanselde elde edilen serotip 3, 19A, 23B ve 9L'ye ait Fourier transform kızılötesi spektroskopisi – FTIR-ATR spektrumları.



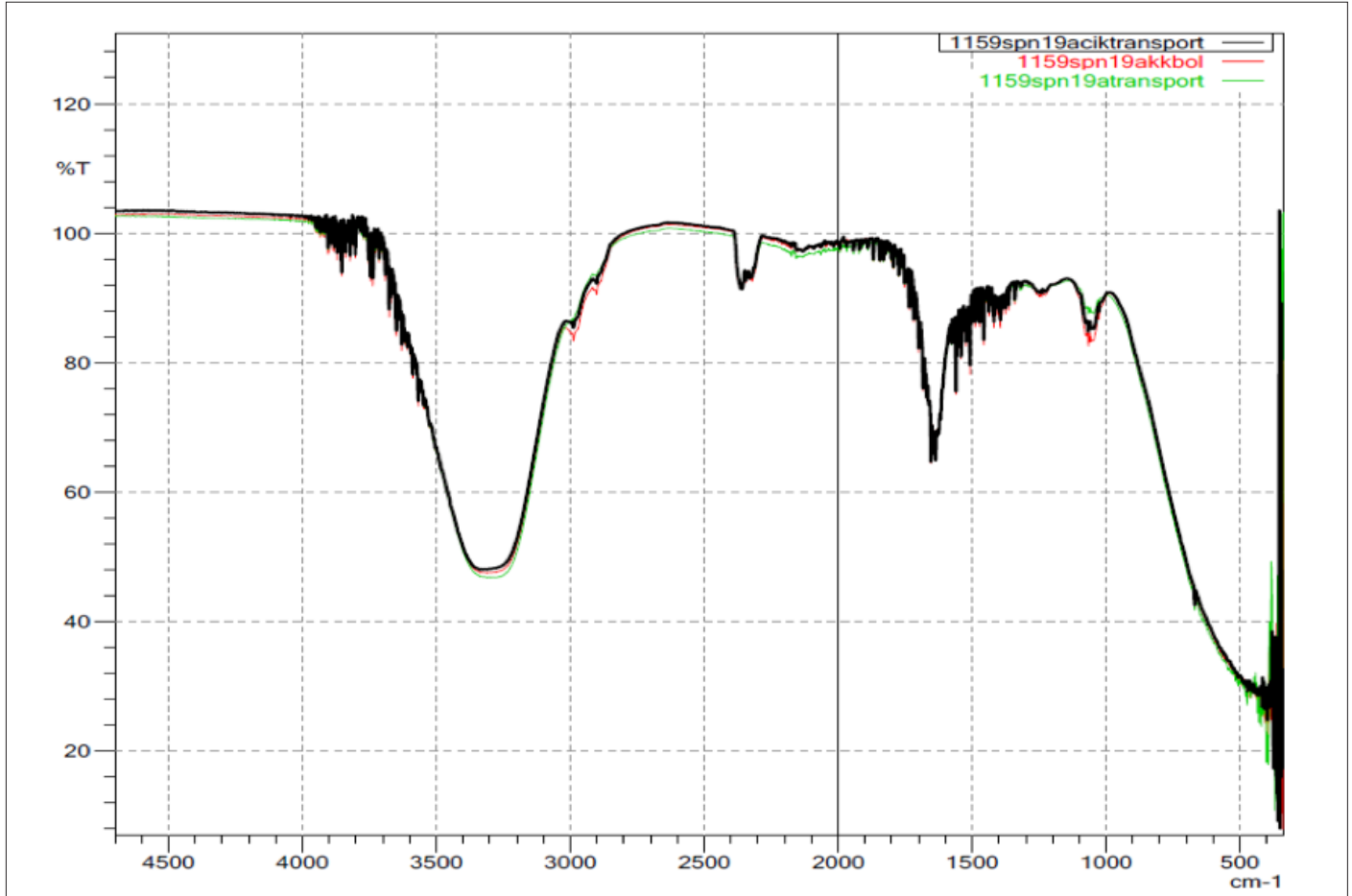
Şekil 5. Bakteri taşıma ortamında süspanselde elde edilen spn 3, spn 19A, spn 23B ve spn 9L izolatlarına ait FTIR-ATR spektrumlarının yakın görünümü.



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



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



**Şekil 8.** Bakteri taşıma ortamında süspansiyon edilen 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 ayırmanın bu dalga sayısı aralığında daha az belirgin olduğunu düşündürmektedir.

*S. pneumoniae*'nin serotiplendirilmesinde belirleyici olan başlıca yapısal unsur, hücre yüzeyindeki kapsül polisakkaritlerdir. Bu polisakkaritler, FTIR spektrumlarında özellikle 1200-950  $\text{cm}^{-1}$  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 yapısall 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 çıkışma 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  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunduğunu belirlemişlerdir. Sonuçları, spektral farklılıklar çok belirgin olmasa da aynı serogruba ait serotipleri ayırt etmenin mümkün olduğunu göstermiştir. Vaz ve arkadaşlarının elde ettikleri verilerle paralel olarak 1185-900  $\text{cm}^{-1}$  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 El. *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. Pinar 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>

Copyright of Journal of Pediatric Infection / Cocuk Enfeksiyon Dergisi is the property of Journal of Pediatric Infection / Cocuk Enfeksiyon Dergisi and its content may not be copied or emailed to multiple sites without the copyright holder's express written permission. Additionally, content may not be used with any artificial intelligence tools or machine learning technologies. However, users may print, download, or email articles for individual use.