

TAXOMETRI AND COMPUTERIZATION IN BACTERIAL IDENTIFICATION



Murat Aydın

Serbest dış hekim, mikrobiyoloji doktoru

Reşatbey mah. Gazipaşa Bulvarı, Emre apt d:5 Seyhan Adana Türkiye

<mailto:draydinmurat@gmail.com> 03224536262

<https://www.drmurataydin.com> <http://orcid.org/0000-0003-0030-8999>

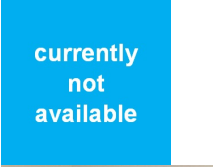
Corresponding author



İsmail GÜNAY

Professor, MD. Dept of Biophysics, Medical faculty, ISTUN University,

Istanbul, Türkiye e-mail: ismail.gunay@istun.edu.tr



Fatih KÖKSAL

Emeritus Professor medical Faculty Çukurova Univ. Adana Türkiye



Mehmet Sami SERİN

Professor Pharmacy faculty, Mersin University Mersin Türkiye

Özet: Bakterilerin rutin identifikasyonunda, çoğunlukla, fenotipik özelliklerini esas alan biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Bu testlerin bir veya birkaçının yanlış sonuç erebileceği gözönüne alınırsa hatalı identifikasyon kaçınılmaz olur. Bu çalışmada, nümerik taksonomiye esas alan bir bilgisayar yazılımı gerçekleştirildi. Şüpheli bakteriye yapılan biyokimyasal test sonuçlarına sayısal olarak en çok benzeyen bakteri listesi elde edilerek doğru identifikasyona katkıda bulunmaya çalışıldı.

Anahtar kelimeler: Bakteri identifikasyonunda bilgisayar

Summary: Biochemical tests, which are based on phenotypical features of the suspected bacterial specimen, are often used for routine bacterial identification. Misidentification seem unavoidable when we assume that some of these tests may give wrong results.

In this study, a software that is based on numeric taxonomy was written. A list was generated to allow numerical comparisons of biochemical test responses of the suspected bacterial strain and to contribute to correct identification.

Key words: Computerization in bacterial identification

Şöyle refere edilir:

Cite as following:

Aydın M*, Günay İ*, Köksal F*, Serin SM*. Taxometry and computerization in bacterial identification. Mikrobiyol Bült 1996; 30:281-287.

GİRİŞ

Bakterilerin fenotiplerine göre sınıflandırılmaları monothetic genuslar için yeterli olsa bile, polythetic genuslar için yetersizdir. Bugün, ortak atayı paylaşanları kesin olarak isimlendirebilmek için DNA homolojisi ve rRNA oligonükleotid kataloğundan faydalanılmaya başlanmıştır. DNA homolojik sınıflama, serotaksonomi ve kemotaksonomiye sınırlanmasına rağmen bir bakterinin biyovar, patovar, serovar, fagovar, morfovar gibi varyasyonlarını belirlemek için yetersiz kalmıştır, çünkü bu tip varyasyonlar fenotipiktir ve yeterince özgül değildir.

Bakteriyel identifikasyonda doğru sonuç elde edebilmek için taksometri geliştirilmiştir. Bu bir identifikasyon metodudur ve son yıllarda giderek artan biçimde kabul görmektedir. Buna göre, bir bakteri, bir diğer bakteriye, 0 ile 100 arasında değişen bir t sayısı kadar benzer, bir benzeme parametresidir ve birimi OTU (Operational Taxonomic Unit) dur.

İdentifikasyonu arzulanan bakteri örneğine yapılan testlerin sonuçları bilgisayara verilmekte ve daha önce standart test sonuçları verilmiş bulunan yüzlerce bakteri ile karşılaştırılması istenmektedir. Bu karşılaştırma sonucunda, aranan bakteriye 100 OTU benzeyenden, 0 OTU benzeyene doğru bir şüpheli bakteri listesi oluşturulmaktadır. Bu listenin ilk sıralarında yer alan bakteri isimlerinden bir tanesi identifikasyonu arzulanan bakterinin ismidir. Bu çalışmada gerek akademik ve gerekse rutin bakteriyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi amacı ile taksometrik analiz yapabilen bir bilgisayar programı hazırlandı.

GEREÇ, YÖNTEM ve BULGULAR

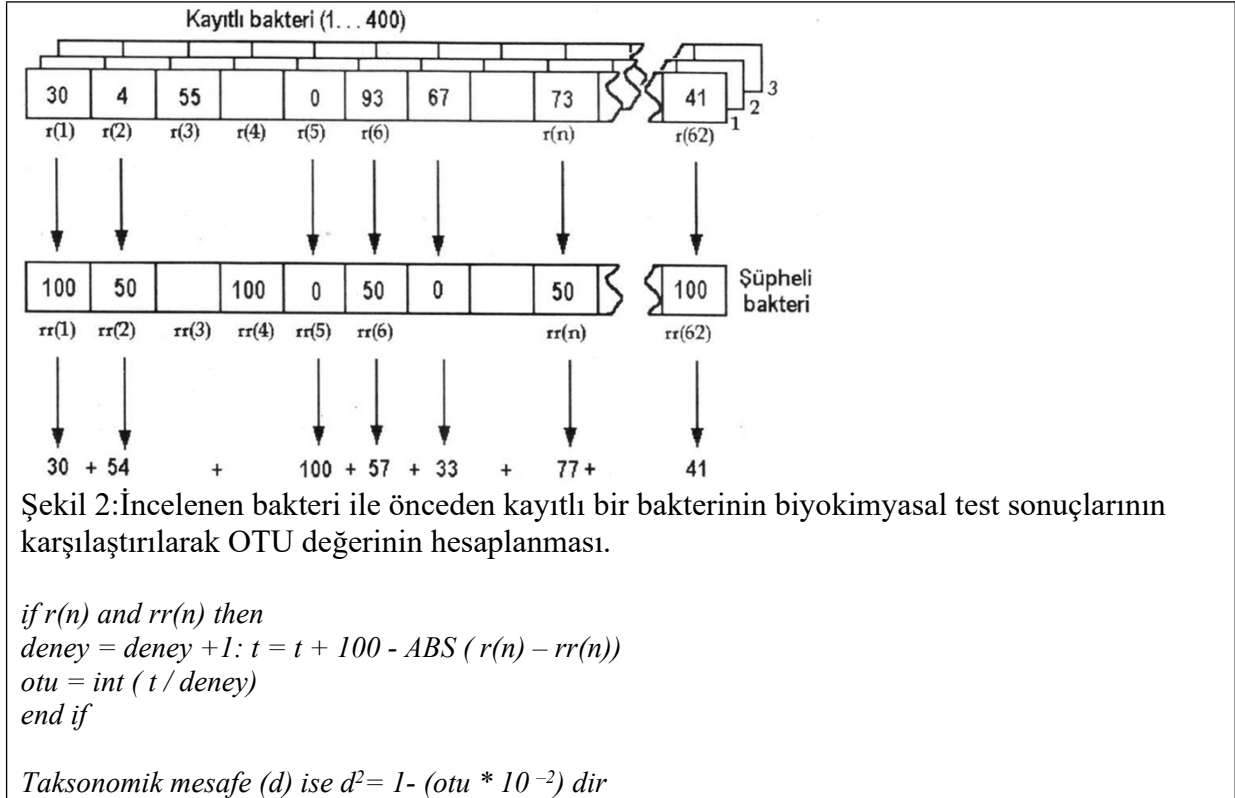
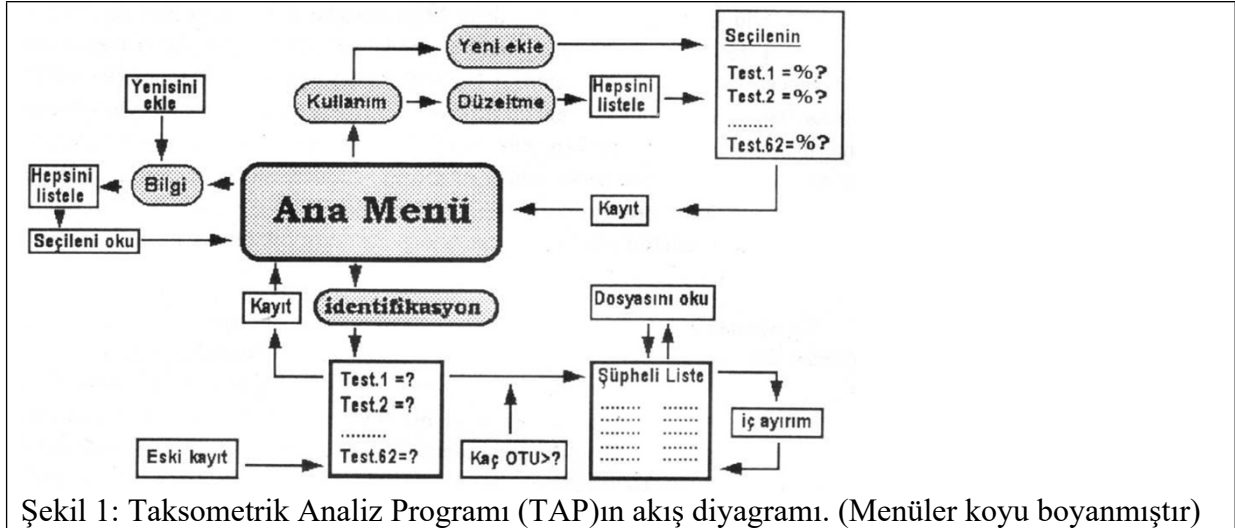
Tasometrik Analiz Programı (TAP), Microsoft QuickBASIC 4.00 ile gerçekleştirildi. Basit konfigürasyonlu herhangi bir PC bilgisayarda çalışılabilir

olmasına önem verildi. Klinik önemli olan 400 adet olan bakterinin, 62 adet standart biyokimyasal test sonuçları önceden bilgisayara nümerik olarak yüklendi. Böylece bir karşılaştırma paterni oluşturuldu. Laboratuvarda bu testlerin tamamının veya bir kısmının şüpheli bakteri örneğine uygulanarak sonuçların TAP'na iletilebilmesi için girişler hazırlandı. (Bu testler şunlardır: Gram boyama, kok-basil, hareket, spor, kapsül, hemoliz, anaerop-aerop, katalaz, oksidaz, koagülaz, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat, H₂S yapımı, üreaz, jelatinaz, DNAz, galaktosidaz, ornitin ve lizin dekarboksilaz lipaz, nitrat redüksiyonu, KCN ve safraya tolerans, alfa metil glikozit, tirozin saydamlaştırma, fenilalanin deaminasyonu, arjinin ve eskulin hidrolizi, mukat, malonat, 15 tane şekerden asit oluşturma, 5 tane şekerden asit gaz oluşturma, 42 oC, 22 oC, 5 oC'de üreme). TAP, ana menüye bağlı 3 alt menüden oluşur (Şekil 1).

Bilgi: Bu menüde, kayıtlı bakterilerin tamamı alfabetik olarak listelenerek, kullanıcının seçtiği bakterinin metin dosyası açılır. O bakteriye ait selektif besiyerleri, klinik patolojisi ve antijen yapısı incelenebilir. Bu bilgiler durağan olmayıp, yeniden yazılabilir veya değiştirilebilir.

Kullanım: Bu menüde yeni bir bakteri listeye eklenebilir veya daha önce mevcut bulunan bir bakterinin biyokimyasal özelliklerinden bir veya birkaçı değiştirilebilir. Böylece, TAP şeffaf ve dinamik bir yapı kazanır.

İdentifikasyon: İdentifikasyonu arzulanan bakteriye laboratuvarda uygulanan 62 adet test sonucu bilgisayara + (olumlu), - (olumsuz), ± (şüpheli) ifadeleri kullanılarak girilir.



Bütün testlerin yapılması ve girilmesi daha doğru sonuçlar verir, ancak zorunlu değildir. Yapılmayan testler boş bırakılır. Sonraki aşamada, kaç OTU'dan fazla benzeyenlerin listelenmesi istendiği TAP'na bildirilir (%0-99). TAP, Şüpheli Bakteri Listesi (ŞBL) hazırlar. Her deneyin sonucu karşılaştırılan bakteriye ait olan aynı deneyin standart sonucuna yakınlığı

oranında benzerlik, parametresini artırır veya azaltır (Şekil 2). ŞBL içerisindeki bakteriler çok benzeyene doğru sıraya dizilerek, ekran ve/veya yazıcıdan kullanıcıya iletilir. Genellikle, identifikasyonu arzulanan bakteri ismi en yukarıda veya yapılan testlerin sayısı ve doğruluğu ile değişecek şekilde daha alt sıralarda yer alır.

Bu aşamada, mikrobiyolog, listelenen bakterilerden bir tanesini işaretleyip, bu bakteriyi ŞBL içerisindeki diğer bakterilerden ayrılabilmesi için, başka hangi biyokimyasal testlerin yapılmasının uygun olacağını sorabilir. Bu durumda TAP' işaretli bakteri ile diğerleri arasındaki ayırıcı testleri bulur ve bir rapor halinde ekran ve/veya yazıcıdan bildirir. Bu testlerin yapılarak TAP'na girilmesi ile ŞBL'nin sınırları, tek bakteriye doğru hızla daralır ve doğru bir identifikasyon için doğru bir laboratuvar stratejisi elde edilir.

TAP'nın güvenilirliğini tespit edebilmek amacı ile, önceden *Pseudomonas aeruginosa* olarak identifiye edilen bir bakteri örneğinin, kültür kokusuna, pigmentasyonuna ve arka arkaya üç defa 42 C'de ürediğine bakıldı ve tanı doğrulandı. Bu bakteri örneğine laboratuvar koşullarında kolayca uygulanabilecek 7 tane standart fizyolojik ve biyokimyasal test yapıldı. Gram olumsuz, hareketli, laktoz, maltoz, mannoz, mannitol ve sukroz fermentasyonu olumsuz bulunarak bu sonuçlar TAP'na girildi. Bu test sonuçlarına %90'dan fazla benzeyen bakterilerin listelenmesi istendi. TAP'nın hazırladığı ŞBL içerisinde yer alan bakteriler ve benzerlik yüzdeleri şöyle bulundu: *Pseudomonas aeruginosa* (99), *Pragia tontium* (99), *Fusobacterium bullosum* (99), *Campylobacter jejuni* (99), *Wolinella (Bacteroides) recta* (99), *Alcaligenes faecalis* (97), *Alcaligenes dinitrificans* (97), *Proteus mirabilis* (96), *Brucella melitensis* (92), *Alcaligenes xylosoxydans* (92), *Bacteroides ureolyticus* (91), *Tsieraella (Bacteroides) preacutus* (90). Hangi özgül test(ler) ile *P.aeruginosa*'nın ayırd edilebileceği TAP'na soruldu. TAP, aerop-anaerop, jelatinaz ve glukoz fermentasyon testlerinin dahil olduğu bir liste rapor etti. Glukoz fermentasyonu ve jelatinaz testleri yapıldı. Sonuçları sırası ile olumsuz ve olumlu bulunarak programa tekrar girildi.

ŞBL'nin içerisinde sadece *P.aeruginosa* bulunduğu görüldü.

Yukarıda listelenen bakterilerden beş tanesi anaeroptur, fakültatif olanlardan *P.tontium*'u eskulin hidroliz testi ile ayırt etmek mümkündür, ancak bu test *Alcaligenes* genusunun iki üyesini birden uzaklaştırılmaz. TAP, *Alcaligenes* üyelerini uzaklaştırmak için jelatinaz, *P.mirabilis*'i uzaklaştırmak için glukoz fermentasyon testini hesaplamıştır. Güvenli kaynaklar incelendiğinde *P.aeruginosa*'yı bu oniki mikroorganizmadan ayırabilecek tek bir test olmadığı ve ancak iki testin birlikte yapılması durumunda ayırt edici tanı koymanın mümkün olabileceği tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Biyokimyasal olarak yapılan bakteriyel identifikasyon şu nedenlerle zor olabilir:

1. Bakteriler, familyaya uyan özellikleri ağır bastığı için, türe ait özelliklerinin bir kısmı gözardı edilerek yakın bir familya içerisine yerleştirilmiş olabilir. Bu durum türler hatta genuslar arasında kesin sınırları ortadan kaldırır. Böylece genus içerisinde ortak kuralları bozan türler yer alır. Örneğin *N.elongata* hareketlidir ve bir basildir; binlerce *Salmonella* içerisinde yaklaşık yüz civarında tür laktoz pozitifdir. Benzer şekilde *S. sonnei*, *B. bronchiseptica* ve daha pek çok tür kendi genuslarına göre kural dışı sayılır.

2. Biyokimyasal testlerde metodoloji ve kantitatif değerler sonucu etkileyebilir. Örneğin, %11'lik safrada pnömokoların ancak %86'sı lizis olurken, başka gruptan koklarda lizis olabilmektedir. Karbonhidrat içeren besiyerinde üretilmiş bakteriler, gerçekte oksidaz negatif olsalar bile oksidaz pozitif bulunabilir. Bu ise mikrobiyoloğu kararsızlığa itebilir.

3. Mikrobiyoloğun subjektif yorumları da sonucu etkileyebilir.

4. Bir bakterinin birden fazla fenomen'u bulunabilir.

5. Bakteri örneğinin özelliklerinde uyumsal değişimler olabilir. Biyokimyasal testler için ekimi yapılan bakteri, inkübasyon dönemi boyunca ait olduğu genusun ortak özelliklerine ters düşse bile bazı karbonhidrat veya aminoasitleri kullanmaya başlayabilir veya kullanmakta olduğu kaynağı ortamda daha kolay kullanabileceği başka kaynaklar bulunduğu için kullanmaya bilir. Örneğin ortamda karbonhidrat varken triptofandan indol oluşumu baskılanır.

Bugün aynı bakteri suşuna aynı standartlarda aynı laboratuvar şartlarında ve aynı metodoloji ile yapılan aynı deneyin her 100 tanesinden 5'nin farklı sonuç verdiği kabul edilmektedir. Bu ise laboratuvar şartlarında her bakterinin kendisine bile en çok % 95 kadar benzeyebileceğini gösterir.

6. Türler arası transformasyon, konjugasyon ve transdüksiyon daima mümkündür. Buna en sık verilen örnek: *C. diphteriae*'nin ekzotoksin üretimini kodlayan geninin *Corynophage* aracılığı ile bir başka türe taşınmasıdır. Ekstrakromozomal ileti yanında transpozonlar da delesyon adisyon ve translasyonu öncülük edebilirler. Hangi yol ile olursa olsun ortaya başka bir kimlik çıkmaktadır ve bu kimliğin yeni mi kazanıldığını yoksa önceden mi var olduğunu anlamak zordur.

7. Spontan mutasyonları da olabilmektedir. Ravin 1963'de bir türün genetik değişikliklere maruz kalarak yakın bir türe kendiliğinden dönüşebileceğini göstermiştir. Centrotipe bakteriler değil ama hypothetic bakteriler komşu genus veya komşu türü kolayca taklit edebilirler. *F. tularensis*, hipotetik bir üyedir, spontan olarak veya çevre şartlarının değişmesi ile kolayca, avirulan olan *F. novicida*'ya benzeyebilmektedir. Ayrıca *Neisseria* genusu da birçok hypothetic üye barındırır ve bunlar beklenmeyen fenotipler oluşturabilirler.

Bu karakter değişimlerinin, tahminlerin çok üzerinde olduğu bilinmesine rağmen identifikasyon

sırasında genellikle gözardı edilirler. Oysa ki aktarılan veya değişen bir özellik eğer yeterince özgül ise identifikasyon kusurlarına kaynak teşkil edecektir. Çünkü proteaz bakteriosin hemolizin koagülaz üreaz H₂S yapımı laktoz, sukroz, rafinoz, galaktoz, ksiloz ve sitrat kullanımı aktarılabılır özelliklerdir.

Prokaryotlara bu açıdan bakınca familya ve takım seviyesinde bakterilerin birbirlerinden kesin çizgilerle ayrılmadığı görülür. Özellikle genus ve tür seviyesinde daha bulanık sınırlar vardır. Böylece taksonomik cetvel yukarıdan aşağıya doğru bulanıklaşır. Dendrogram (ya da fenogram) adı ile az benzemeden çok benzemeze doğru inen bir üçgen oluşturur, fenogramın alt kısımlarında yani tür ve genus seviyesinde varsayılan sınırlar DNA homoloji deneyleriyle bile kesin bir şekilde ayrılamazlar. Üstelik DNA homoloji testleri, her laboratuvarda kolayca yapılabilecek kadar pratik ve ucuz değildir.

Taksometrik identifikasyon prensip olarak yapılabilecek en çok sayıda testi yapmayı, en çok sayıda bakteriyle karşılaştırmayı, benzerlikleri sayılara dönüştürmeyi, en çok benzeyen bakterilerin bir listesini elde etmeyi, sonuç olarak, benzerlik parametresi en yüksek bulunan bakteriyi değil, bu liste içerisinde benzerlik parametresi yeterince yüksek olan ve en makul olanı kabul etmeyi esas alır. Taksometride, şüpheli bir bakteriye yaklaşım global olmak zorundadır. Bu esaslar doğrultusunda hazırlanan ŞBL içerisinde seçim mikrobiyoloğa bırakılır. Taksometrik analiz ile biyokimyasal testlerin kısmen yanlış yapıldığı durumlarda bile şüpheli bakteriyi tespit etmek mümkündür.

Bu durumda, aranan bakterinin ismi, listede ilk değil, ikinci ya da üçüncü sıraya düşer ama yanlış yapılan test sayısı artmadıkça kaybolmaz. Bu nedenle, hiçbir test, bir genus veya bir tür için belirleyici sayılmaz. *S. aureus* için plazma koagülaz testi ne kadar seçici ise *P. aeruginosa* için de aynı derecede seçici olduğu kabul edilir. Benzer şekilde, enterobakteriler için

laktozdan asit üretimi ile hemoliz testi aynı seçicilikte sayılır. Bu testlerden birisi, o bakteri için gerçekten özgül değilse TAP'na girilmeyebilir. Ayrıca, koloni morfolojisi, varsa besiyerindeki koku ve pigmentasyon, materyalin kaynağı, hangi besiyerinde üretildiği, üreme hızı, kaçınıcı pasajı olduğu, hastanın kliniği gibi bilgiler, şüpheli bakteriye ait olmasına rağmen, TAP'na girilmesi zordur. Bu nedenle vurgulamak gerekir ki, TAP sonuçları, ancak mikrobiyoloğun sağduyusu ile birleştirilince en doğru identifikasyon elde edilebilir.

Bazı yazarlara göre, yapılan deney sayısında bir parametre olmalıdır. Örneğin; 40 deney yapılarak 87 OTU alan bir bakteri, 20 deney yapılarak aynı benzerliği alan diğer bir bakteriden daha önde gelmelidir. Ancak böyle bir parametre ilavesi, yanlış negatif sonuçları azalttığı oranda, yanlış pozitif sonuçları arttıracaktır. İstatiksel olarak anlamlı bile olsa, bütün karşılaştırmalar bir bakteri için yapıldığından, yani identifikasyonu yapılan bir bakteri, identifikasyonu yapılan diğer bir bakteri ile karşılaştırılmayacağından, bu parametre TAP'na eklenmemiştir.

Sonuç olarak, TAP, akademik çalışmalar yanında rutin laboratuvar kullanımına da uygundur. Elde edilen bütün bilgiler, tarih ve hastanın protokol numarası ile birlikte kayıtedilmekte ve gerekirse ilerideki tarihlerde, retrospektif analizi mümkün olmaktadır. TAP'na yapılabilecek ilaveler ile hastanın klinik bilgilerinin, yapılmışsa antibiyotik duyarlık test sonuçlarının hastanın dosyasına dahil edilmesi ve rapor yazdırılması da mümkün olabilir. TAP içerisinde virus, mantar ve parazitler için uygun girişler mevcut olup genişletilmeye uygundur.

Not: Bu program, Uvaasa Üniversitesi Garbo-arrşivlerine 108013 sayı ile kabul edilmiş ve BIP 10.ZIP adı ile sergilenmektedir. Program,yazarından <https://www.draydinmurat.com/marifet.html> veya

ftp://grabo.uwasa.fi/pc/science/bip_10.zip adresinden temin edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Noel RK,John GK:Bergey's Manual of Systematic Bacteriolog,1984,Barbara tansill(ed), Vol.1,2,3,4,77th ed,Williams & Wilkins,Baltimore.
2. Microsoft QuickBASIC 4.00 User Guide,1985,2nd ed,Microsoft Corporation, Canada
- 3.Edwin HL,Albert B,William JH:Manual of Clinical Mikrobiyoloji,1985,4th ed,American Society of Mikrobiyoloji, Washington D.C.
- 4.Akan E:Bakteri genetiği,s.81-103.Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji.1992 Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları,Güney Matbaası,Adana.
- 5.David TK,Greald EW:Bakteri Genetiği,p.19-28.Serter D.(ed), Mikrobiyoloji 1992,2.baskı,Saray Tıp Kitabevi,İzmir.
- 6.Thomas AW:Memory Resident Programming on the IBM PC,1987,Ist ed,Addison-Wesley Inc,Massachusetts.