

Tükürük Mikrobiyomunun Adli Amaçlı Kullanımı: Metagenomik Analiz Yöntemleri: Geleneksel Derleme

Forensic Use of the Saliva Microbiome: Metagenomic Analysis Methods: Traditional Review

 Şükriye KARADAYI^a,  Beytullah KARADAYI^b

^aAltınbaş Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul, TÜRKİYE

^bİstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Adli Tıp ABD, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Son yıllardaki metagenomik çalışmalar, adli vaka çözümlerinde etkili olabilen mikrobiyal genetik araştırmaları, adli bilimlerin kullanımına sunmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde, insanların vücut alanını paylaşan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların ekolojik topluluğu olarak belirtilen mikrobiyomların DNA araştırmaları büyük bir yer tutmaktadır. Adli soruşturmalarda tükürük, bulunabilirlik kolaylığı ve noninvaziv olması nedeniyle tüm vücut sıvıları arasında sıklıkla tercih edilir. DNA teknolojisindeki ilerlemeler, şüphesiz ki insan DNA'sının, ısırk izlerinden ve dudak izlerinden elde edilen tükürük lekelerinden bile izolasyonunu sağlamaktadır. Fakat toplanan örneklerin degrade olması veya az miktarda DNA bulunması gibi sebeplerle her zaman kalitesi uygun bir tükürük DNA'sı elde edilemez. Oysa tükürüğün adli araştırmalarında, tükürük salgısındaki mikrobiyomların (bakteriler, mantarlar, arkeler, mikrobiyal ökaryotlar ve virüsler) analizinden elde edilen bilgiler, olayın failini suçla ilişkilendirebilir. Nitekim insan DNA'sı, şüphelinin gündelik temasından tespit edilemese de mikrobiyom profili tespit edilebilir ve bu da şüphelinin spesifik mikrobiyom profili aracılığıyla tanımlanması olasılığını artırır. Ayrıca şüphelinin yaşam tarzı, birlikte yaşadığı kişiler ve tıbbi durum bilgileri, adli soruşturmalara yardımcı olabilir. Mikrobiyom verilerinin, adli amaçlı kanıt olarak kullanımı ve rutin prosedür hâline gelebilmesi için insan mikrobiyom araştırmalarının adli bakış açısı ile ele alınması gerekir. Bu yazıda, adli alandaki yeni tükürük mikrobiyomu araştırmalarının mevcut durumu, geliştirilen analiz metotları, değerlendirmelerde kullanılan biyoinformatik çözümler ve oral mikrobiyotanın, adli bilimlerde kullanımındaki olası sınırlandırmalar ve uygulamadaki zorluklar hakkında bilgi paylaşımı amaçlanmıştır.

ABSTRACT Metagenomic studies in recent years offer microbial genetic studies that can be effective in forensic case solutions to the use of forensic sciences. Among these studies, DNA research of microbiomes, which is defined as an ecological community of commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms that share human body space, has a great place. In forensic investigations, saliva is often preferred among all body fluids due to its ease of availability and non-invasiveness. Advances in DNA technology enable the isolation of human DNA, even from saliva stains obtained from bite and lip prints. However, it is not always possible to obtain a salivary DNA of appropriate quality due to the degradability of the samples or the small DNA amount. Whereas, in saliva forensic studies, information obtained from the analysis of salivary microbiomes (bacteria, fungi, archaea, microbial eukaryotes, and viruses) may associate the perpetrator with crime. Indeed, although human DNA cannot be detected from daily contact with the suspect, the microbiome profile can be detected, increasing the likelihood that the suspect will be identified through the specific microbiome profile. Also, information such as the suspect's lifestyle, cohabitants, and medical condition can assist with forensic investigations. In order for microbiome data to be used as forensic evidence and become a routine procedure, human microbiome studies should be handled with a forensic perspective. In this article, it is aimed to share information about the current status of new salivary microbiome research in the forensic field, developed analysis methods, bioinformatics solutions used in evaluations, possible limitations in the use of oral microbiota in forensic sciences and difficulties in application.

Anahtar Kelimeler: Adli mikrobiyom; tükürük mikrobiyomu; metagenomik analiz; biyoinformatik

Keywords: Forensic microbiome; salivary microbiome; metagenomic analysis; bioinformatic

Correspondence: Şükriye KARADAYI

İstanbul Altınbaş Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY
E-mail: sukriye.karadayi@altinbas.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences.

Received: 04 Apr 2021

Received in revised form: 12 Aug 2021

Accepted: 19 Aug 2021

Available online: 25 Aug 2021

2619-9459 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Son 10 yılda adli bilimlerde, mikrobiyal araştırmalar alanında çok büyük ilerlemeler kaydedilmektedir. Bu çalışmaların çoğu, adli alanda önemli etkileri olan bir nesneye veya yere, insanları bağlamak için cilt ve tükürük mikrobiyomunun analizine odaklanmış ve bir suçun failini tanımlamak için mikrobiyal bir adli soruşturma yürütme olasılığına dikkat çekmiştir.¹⁻³ İnsan DNA'sının, şüphelinin gündelik temasından tespit edilemediği durumlarda, mikrobiyom profili tespit edilebilir ve bu da şüphelinin spesifik mikrobiyom profili aracılığıyla tanımlanması olasılığını artırır.² Adli tıp tarafından cevaplanması gereken en önemli sorular genellikle "Suçu kim işledi?" ve "Suçu kim işlememiştir?" sorularıdır. Olay yerinde tespit edilen biyolojik örneklerin çok yönlü analizleri, bu soruları cevaplamada oldukça önemli bir rol oynar ve suçlu veya suçluların identifikasyonunda en güçlü kanıtları oluşturur.⁴

Tükürük, bir suç mahallinden sıklıkla kanıt olarak toplanabilen bir vücut sıvısı olduğundan, tükürük mikrobiyal analizinden elde edilen bilgiler kullanılarak bireylerin, mağdurların ve/veya şüphelilerin bir suçla nasıl ilişkilendirilebileceğine veya dışlanabileceğine yönelik çalışmalara olan ilgi son zamanlarda artmıştır. Adli kimliklendirme için tükürük mikrobiyomunun, yeni nesil dizileme (YND) analizinin sonucu olarak tükürüğün mikrobiyom profili, cinsel saldırı vakalarında olduğu gibi saldırganın DNA'sının, mağdurun DNA'sı ile karıştırıldığı durumlarda, özellikle failin DNA izleri tam ve güvenilir bir genetik profili belirlemek için yetersiz ise yararlı olabilir.⁵ Mevcut adli DNA profillemeye, daha önce işlenmiş suçlar nedeniyle adli DNA veri tabanlarında bulunan profillerin, olay yeri izlerindeki şüphelilerin DNA profilleri ile eşleştirilmesiyle gerçekleştirilen tamamen karşılaştırmalı bir analizdir.⁶ Bu tür bir analizin temel sınırlaması, araştırmacılar tarafından DNA profilleri bilinmeyen faillerin hem muhtemel suçlular olarak listelenmemeleri hem de profilleri bu tür veri tabanlarında yer almadığı için tespit edilememesidir. Bu nedenlerden dolayı oral mikrobiyom analizinin gerçek adli yararlılığının, ceza soruşturmalarına yeni bir niteliksel boyut ekleyebileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bazı durumlarda mikrobiyom analizi, mevcut DNA kullanımının yukarıda bahsedilen sınırlamalarının üstesinden gelebilir. Nitekim doğru-

dan şüpheli/şüphelilerin, geleneksel soruşturma yöntemleriyle tespit edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda mikrobiyomlar, bilinmeyen faillerin daha fazla tanımlanmasına olanak sağlayabilir ya da izi bırakan kişinin kimliği ve onun nasıl bulunacağı konusunda bilgi verebilir. Buna karşın tükürük mikrobiyomunun zamansal stabilitesi, diğer mikrobiyomlar (örneğin diş eti kanaması) ve çevresel etkenler ile kontaminasyon riski gibi faktörlerin etkisi iyi araştırılmalı, dikkatle incelenmelidir. Dolayısıyla yeni gelişen ve gelişmeye açık olan bu alanda, bu tür kanıtların ağırlığının istatistiksel önemi konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu derlemede, adli bilimlerdeki tükürük mikrobiyomu çalışmalarındaki yeniliklerin, analizlerde faydalanılan yeni metotların, biyoinformatik araştırmaların güncel bilgiler ışığında paylaşılmasının yanı sıra oral mikrobiyomların, adli vaka çözümlerinde faydalanılmasındaki olabilecek sınırlılıkları ve uygulama güçlükleri ile ilgili bilgilendirme yapmak amaçlanmıştır.

TÜKÜRÜK MİKROBİYOMU

TÜKÜRÜK YAPISI

Tükürük materyali; su, proteinler ve tükürük misellerinin yanı sıra lipoid içerik, epitel ve bakteri hücrelerini de barındıran bir yapıdan oluşur. Tükürüğün %99,5'i su olup; geri kalan %0,5'i enzim, amilaz, lipaz, lizozim, laktoferrin, elektrolitler (sodyum ve potasyum) gibi anti bakteriyel bileşikler, büyüme faktörleri, tamponlar ve mukustan oluşur.⁷ Tükürüğün bileşenleri, ağız boşluğuna girdikten sonra ağız boşluğu mikroorganizmaları, kan hücreleri ve havayolu salgıları ile birleşir.

KLİNİK AMAÇLI BİYOBELİRTEÇ OLARAK KULLANIMI

Tükürükte proteomik ve genomik biyobelirteçlerin varlığı, altta yatan bazı sistemik hastalıkların, ağız hastalıklarının, ayrıca ağız kanserlerinin ve kötü huylu tümörlerin durumunu gösterebilir. Örneğin tükürük transkriptaz seviyelerindeki artış, pankreas kanserlerini işaret edebilir. Kadınlardaki maligniteler için c-erbB-2, prognostik bir belirteç olarak tükürükteki bir proteomdur. Oral *Candida* lösemi/demir eksikliği anemisini, amiloid materyali

multipl miyelom/amiloidozu düşündürür. Bu nedenle tükürükte bu belirteçlerin tespiti, söz konusu kişilerle ilişkili sistemik bazı hastalıkların ön tanısında kullanılabilir.⁸

TAKSONOMİK İÇERİK

Tükürük mikrobiyomunun bileşimi; kişinin yaşına, sirkadiyen ritmine, yaşam tarzına, beslenme alışkanlıklarına, birlikte yaşadığı kişilere, evcil hayvanların varlığına, sigara içme alışkanlığına, öpüşme gibi etkileşimlere ve genel sağlık durumuna göre değişebilir.⁹ Leake ve ark., tükürükte en yaygın filumun, daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes ve Fusobacteria olduğunu ortaya koymuştur.⁵ Bununla birlikte çoğunlukla tükürük mikrobiyomundaki 8 cins (*Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Rothia* ve *Fusobacterium*), toplam bakteri popülasyonunun %70'inden fazlasını oluşturmakta; 58 cins bakteri ise tükürük mikrobiyomunun yaklaşık %95'ini meydana getirmektedir.¹⁰ Türkiye'de gerçekleştirilen bir çalışmada, bu 8 cins bakterinin, tükürük total bakteri popülasyonunun toplamda %86,15'ini oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).¹¹

Sonuç olarak kültürel çalışmalarda ve kültürden bağımsız moleküler çalışmalarda, bakterilerin tanımlanmasına dayanarak, insan ağız boşluğunda 700'den fazla tür tanımlanmıştır ve bunlardan 400 tanesi de insan oral mikrobiyomu veri tabanında listelenmiştir.^{12,13} Bu durum, bireyler arasındaki mikrobiyom farklılıklarının daha çok tür seviyesinde olduğunu göstermektedir.

TÜKÜRÜK MİKROBİYOMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Demografik Faktörler

Yaş

Yaş, araştırmalarda çoğunlukla kaydedilen standart parametrelerden biridir. Yaş verileri, özellikle grupların yaşa göre eşleştirilmesi gereken vaka kontrol çalışmalarında son derece gerekli bir bilgidir. Oral mikrobiyomun, özellikle bebekler, çeşitli dişlenme evrelerindeki çocuklar (karışık veya kalıcı dişlenme), ergenler ve erişkinler karşılaştırıldığında, çalışma deneklerinin yaşına göre değiştiği gösterilmiştir.¹⁴ Japonya'da 40 yaş ve üstü 2.343 erişkin üzerinde yapılan nispeten homojen gruptaki bir çalışmada bile tükürük mikrobiyomunun yaşa göre önemli ölçüde değiştiği belirlenmiştir.¹⁵

Cinsiyet

Şu ana kadar yapılan çalışmaların çoğu, ya cinsiyet ile oral mikrobiyom bileşimi arasında bir ilişki olup olmadığını değerlendirmemiş ya da önemli bir farklılık tespit edememiştir.^{16,17} Hollandalı 268 gencin, oral ve sistemik sağlıklarını araştıran yeni bir çalışmada, tükürükte cinsiyete bağlı gerçekleştirilen alfa çeşitliliği analizinde hiçbir fark bulunamamış, ancak erkekler ve kadınlar arasında farklılaşan 65 operasyonel taksonomik ünite (OTU) tanımlanmıştır.¹⁸ ABD'li 282 gönüllünün oral mikrobiyomunun araştırıldığı yeni bir çalışmada, alfa çeşitliliğinde hiçbir fark olmadığı, yine bazı taksonların ise erkekleri kadınlardan ayırdığı doğrulanmıştır.¹⁹

TABLO 1: Tükürük mikrobiyotasında sıklıkla bulunan 8 cins bakteriye ait taksonomik sınıflandırma.

Cins	Aile	Takım	Sınıf	Filum
<i>Streptococcus</i>	Streptococcaceae	Lactobacillales	Bacilli	Firmicutes
<i>Neisseria</i>	Neisseriaceae	Neisseriales	Betaproteobacteria	Proteobacteria
<i>Prevotella</i>	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes
<i>Haemophilus</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
<i>Veillonella</i>	Veillonellaceae	Vellionellales	Negativicutes	Firmicutes
<i>Porphyromonas</i>	Porphyromonadaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes
<i>Rothia</i>	Micrococcaceae	Micrococcales	Actinobacteria	Actinobacteria
<i>Fusobacterium</i>	Fusobacteriaceae	Fusobacteriales	Fusobacteria	Fusobacteria

(Tablo 1, 11 no.lu kaynakta yer alan çalışmaya ait tükürük mikrobiyomu verileri dikkate alınarak oluşturulmuştur).

Sosyoekonomik durum ve eğitim düzeyi

Çeşitli araştırmalar, gelir veya eğitim düzeyi ile oral mikrobiyom kompozisyonu arasında bir ilişki olduğunu bildirmektedir. Düşük çürük ve periodontit seviyelerine sahip 292 Danimarkalı erişkinin tükürüğü üzerine yapılan bir çalışmada, sosyoekonomik durumun, tükürük mikrobiyomundaki toplam varyansın %20'sini açıkladığı bulunmuştur.¹⁶ Aynı şekilde amplikon dizilemesini kullanan daha yeni bir çalışmada, deneklerin gelir ve eğitim düzeyine bağlı olarak oral mikrobiyomlar arasında farklılıklar bulunmuştur.¹⁹

İrk veya etnik köken

Bireyin ırkı veya etnik kökeni, oral mikrobiyal kompozisyonu için nispeten güçlü kanıtlara sahip demografik bir faktördür. İnsan Mikrobiyomu Projesi'nde, Hispanik olmayan beyaz (Kafkas), Hispanik olmayan siyah (Afrikalı-Amerikalı), Asya, Meksika ve Porto Riko etnik kökenleri karşılaştırılmış ve vücudun her habitatında farklı miktarlarda takson bulunduğu belirtilmiştir.¹⁷ ABD'de 4 ana etnik gruba ait 192 denekte, supragingival ve subgingival plak ve tükürük üzerine yapılan bir çalışmada da etnik kökene göre taksonomik farklılıklar tespit edilmiştir.²⁰

Ağız Sağlığını ve Oral Mikrobiyomu Etkilediği Bilinen Genel Sağlık Faktörleri

Oral mikrobiyomlar ile ilgili bir klinik çalışma öncesi, bireyin oral ve genel sağlığı arasında güçlü bir ilişki olması nedeniyle çalışma deneklerinin genel sağlığı ile ilgili dâhil etme ve dışlama kriterleri net bir şekilde önceden tanımlanmış olmalıdır.²¹ Antibiyotik ve mevcut ilaç kullanımı mutlaka kaydedilmelidir.²² Oral mikrobiyom üzerine yapılan yeni bir girişimsel çalışmada, 4 hafta boyunca bir proton pompa inhibitörü olan esomeprazolün günlük kullanımının, streptokoklarda bir artışa ve *Veillonella* ile *Neisseria*'da bir azalmaya yol açtığı, bakteriyel çeşitliliğin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.²³

Antibiyotiklere maruz kalma

Antibiyotik maruziyeti ile ilgili oral mikrobiyom üzerine yapılan çalışmalarda, maruziyet ve çalışmadaki kaydedilme zamanları arasındaki minimum süre ko-

nusunda fikir birliği bulunmamaktadır. Randomize olarak gerçekleştirilen kontrollü bir çalışmada, sağlıklı bireyler klindamisin, siprofloksasin, amoksisilin ve plaseboya maruz bırakılarak, dışkı ve tükürük mikrobiyotası 1 yıl boyunca izlenmiştir.¹⁸ Bu çalışma sonuçları ile bağırsak mikrobiyotasının, antibiyotiklerin bazılarına maruz kaldıktan sonra tekrar eski hâline dönebilmesi için yaklaşık 1 yıla ihtiyaç duyduğu, buna karşılık tükürük mikrobiyotasındaki değişimin 1 ay sonra zaten fark edilemez hâle geldiği bildirilmektedir.¹⁸ Antibiyotiklere verilen cevap oldukça bireyseldir ve oral mikrobiyom üzerine yapılan çalışmaların çoğunda, antibiyotik tedavisinin bitiminden itibaren dâhil etme kriteri olarak en az 2 veya 3 ay belirlenmektedir.

Sistemik hastalıklar

Bir oral mikrobiyom çalışması öncesinde, ağız sağlığı için etkileri olduğu bilinen diyabet, romatoid artrit ve kardiyovasküler hastalık gibi sistemik hastalıkların anamnezi mutlaka kaydedilmelidir.²¹ Bir çalışmada, oral mikrobiyomun, çalışma deneklerinin beden kitle indeksine göre de farklılık gösterdiği bulunmuştur.¹⁵ Bununla birlikte gebelik, oral mikrobiyal ekosistem de dâhil olmak üzere tüm vücutta gebelik hormonlarının neden olduğu değişiklikler sebebiyle çalışma sonuçlarını ciddi şekilde etkileyecek unsurları oluşturduğundan tipik bir dışlama kriteridir.²⁴

Oral Mikrobiyomu Etkilediği Bilinen Ağız Sağlığı ile İlgili Faktörler

Ağız sağlığı durumu

Ağız ekosistemi ve mikrobiyomu üzerindeki etki için en güçlü kanıtlara sahip önemli faktörlerden biri, bireyin ağız sağlığı durumudur. Gerçekleştirilen çalışmalarda, diş eti ve periodontal sağlığın, diş çürüğünün, ağız içi implantların varlığının ve periimplant sulkusun sağlık durumunun, mevcut diş sayısı, dişsizlik ve protezlerin hepsinin oral mikrobiyom üzerinde güçlü bir etkisi olduğu gösterilmiştir.^{15,25-29} Ağız ekosistemini etkilediği düşünülen bir diğer faktör tükürük akış hızıdır. Bir çalışmada, tükürük akış hızının tükürük mikrobiyomunu etkilediği bildirilirken, başka bir çalışmada herhangi bir fark bulunmadığı belirtilmektedir.^{16,30}

Ağız hijyeni alışkanlıkları

Günlük ağız hijyeni uygulamaları (örneğin diş fırçalama sıklığı, plak temizliğinin etkinliği), bireyin ağız sağlığını etkiler. Nitekim tükürük mikrobiyomunun, hem çocuklarda hem de erişkinlerde bireyin ağız hijyeni seviyesini yansıttığı çalışmalar bulunmaktadır.^{15,31}

Çalışmalarda, ağız ekosisteminin ekolojik modifikasyonunu amaçlayan katkı maddeleri ile belirli bir ağız sağlığı bakım ürününün uzun süreli kullanımının da ağız mikrobiyal bileşimini etkilediği belirtilmektedir. Örneğin enzim ve protein içeren bir diş macununun supragingival plak kompozisyonunu etkilediği gösterilmiştir.^{32,33}

Oral Mikrobiyomu Etkilediği Gösterilen Yaşam Tarzı, İklim ve Mevsimsel Faktörler

Sigara kullanımı

Gerçekleştirilen çalışmalarda, sigara tütününün sadece genel sağlık üzerinde değil, aynı zamanda ağız sağlığı ve oral mikrobiyom üzerinde de oldukça zararlı etkileri olduğuna dair yeterli kanıtlar sunulmuştur.³⁴⁻³⁶

Alkol tüketimi

Önemli sağlık etkileri olan bir başka yaşam tarzı faktörü alkol tüketimidir. ABD’de 1.044 erişkinin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, ağır ve orta derecede alkol içenlerin daha yüksek alfa çeşitliliğine sahip olduğu ve oral mikrobiyomlarının içmeyenlerden farklı olduğu belirlenmiştir.³⁷

Psiko-uyarıcı maddeler çiğneme

Bazı kültürlerde, özellikle Güney Asya ve Güneydoğu Asya’da, areka fıncığı ve betel yapraklarının çiğnenmesi çok yaygın bir alışkanlıktır ve ağız kanserinin önde gelen bir nedeni durumundadır.³⁸ Betel çiğneyenlerin oral mikrobiyomunda, kontrol grubuna göre önemli farklılıklar bildirilmiştir.³⁸ Oral mikrobiyomu etkilediği gösterilen başka bir alışkanlık, bazı kültürlerde popüler olan amfetamin benzeri etkiler sağlayan khat yapraklarının ve dallarının çiğnenmesidir.^{39,40}

Diyet

Diyetin, bağırsak mikrobiyom bileşimindeki değişimin önemli bir bölümünü açıkladığı gösterilmiştir.⁴¹

Filipinler’de, diyetlerinde ekili pirinç ve sebzeler kullanılan geleneksel çiftçiler ile Batı diyetiyle yaşayanlar karşılaştırıldığında önemli farklılıklar tespit edilmiştir.⁴² Bir çalışmada emzirmenin, mama ile beslenen bebeklere kıyasla farklı oral mikrobiyotalara yol açtığı gösterilmiştir.⁴³ Yakın zamanda yapılan diğer bir çalışmada, kısmi emzirme veya emzirmemenin etkilerinin, 2 ve 7 yaşlarındaki çocukların tükürük mikrobiyomlarında etkileri olduğu belirlenmiştir.²²

İklim ve günün saati

Farklı coğrafi ve iklimsel ortamlarda (Alaska, Almanya veya Afrika) yaşayan popülasyonların tükürük mikrobiyomlarının farklılık gösterdiği bildirilmiştir.⁴⁴ Bu konuda gerçekleştirilen 2 araştırmadan 1’inde, günün farklı zamanlarındaki oral mikrobiyom değişikliklerine yönelik bulgular tespit edilebilmişken, diğer çalışma bu veriyi desteklemektedir.^{45,46}

TÜKÜRÜK MİKROBIYOMU METAGENOMİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

Yüksek verimli 16S rRNA gen amplikon dizilimi kullanılan oral mikrobiyom üzerine ilk yayınlar ortaya çıktığında, örnek işleme, dizileme ve bu yöndeki biyoinformatik analiz metodolojileri hâlâ gelişme göstermekteydi.^{18,47-49} YND teknolojisi ve mikrobiyom araştırmalarına adli bilimlerde ilginin artmasıyla birlikte yeni mikrobiyal-tabanlı çalışmalar geliştirilmeye başlanmıştır.⁵⁰ Günümüzde mega baz başına dizileme maliyetleri oldukça azalmıştır ve çoğu araştırmacı, örnekleri bir dizileme merkezine göndererek, analiz verilerini tamamen veya kısmen elde edebilir duruma gelmiştir. Son 10 yılda, oral mikrobiyomu ele alan yüzlerce orijinal araştırma makalesi yayımlanmış ve bu konuda muazzam miktarda bilgi ve birikim sağlanmıştır. Bu başlık altında örnek taşıma ve depolama, biyoinformatik bilginin işlenişine kadar tükürük mikrobiyomu metagenomik analiz yöntemleri özetlenecektir.

ÖRNEK TAŞIMA VE DEPOLAMA

İdeal koşullarda numuneler, DNA içermeyen, steril ve önceden etiketlenmiş bir tüpe yerleştirilir, hemen buza konularak laboratuvara taşınır ve en geç 2 saat

içinde -80°C 'de saklanması gerçekleştirilir. Numune tüpünün sıvı nitrojene batırılarak anında dondurulması, numunedeki değişiklikleri önlemek için en iyi ön koşuldur ve sadece taksonomik bileşim değil, mikrobiyal aktivite üzerine yapılan çalışmalar için de son derece önemlidir. Bununla birlikte, bu tür ideal koşullar, olay yeri örneklemelerinin bir sonucu olarak her zaman mümkün değildir. Bu tür çalışmalar için en azından -20°C 'de dondurucularda depolama yapmak gerekmektedir. Ayrıca örnek tüplerine önceden aktarılabilen RNAProtect® solüsyonu (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) veya OMNIgene® tükürük kiti (DNA Genotek, Ottawa, ON, Canada) gibi spesifik örnekleme kitleri, özellikle bakteriyel DNA veya RNA korumasını hedefleyen ticari olarak temin edilebilen ürünler bulunmaktadır.¹⁵

BAKTERİYEL DNA İZOLASYONU

Örnek toplama aşaması tamamlandığında, bir sonraki adım bakteriyel DNA'nın izolasyonunun başlatılmasıdır. Eğer daha sonraki basamağa hemen geçilmeyecek ise DNA izolasyonunun bekletilmesi tercih edilmemelidir. Çünkü bu süreçte DNA bozulabilir ve uzun süreli depolama sırasında kalitesini kaybedebilir.¹⁸

HİPER DEĞİŞKEN BÖLGE SEÇİMİ

Küçük ribozomal alt birim geninin bileşeni olan 16S rRNA geni, yaklaşık 1.500 baz çifti uzunluğundadır ve çoğu bakteride neredeyse aynı olan yüksek düzeyde korunmuş 9 hiper değişken bölge içerir ve farklı bakteriyel taksonları ayırt etmek için kullanılabilir. Ne yazık ki farklı hiper değişken bölgeler farklı şekilde gelişmiştir ve tüm bakteri soylarını ayırt edebilecek tek bir bölge yoktur.^{51,52} Aslında en uygun yaklaşım, tüm gen bölgesinin dizilimidir. Ancak şu ana kadar bu çalışma, birkaç dizileme teknolojisi ile mümkün olabilmiştir. Bununla birlikte çoğu araştırma, daha kısa sürede teslim edilebilen, yüksek kaliteli dizileme okumaları sağlayan teknolojileri kullanmaktadır. Bu yöndeki araştırmalarda öncelikle hangi bölge/bölgelerin veya bölge kombinasyonlarının hedefleneceği çalışmaya başlamadan önce belirlenmelidir.

16S rRNA geninin hiper değişken bölge seçiminin önemi, 454 pirosekanslama teknolojisi kullanıla-

rak YND'nin ilk dönemlerinde açıkça gösterilmiştir: Subgingival plak bakteriyel DNA'sının farklı hiper değişken bölgelerinin (V1-V3, V4-V6, V7-V9) dizilemesinden elde edilen sonuçlar önemli ölçüde farklılık göstermiştir.⁵³ V4 tabanlı Illumina MiSeq (Illumina, CA, USA) protokolünün kullanılmaya başlanması itibarıyla V4 hiper değişken bölge, sıklıkla diğerlerinden önce seçilmiştir.⁵⁴ Bunun nedeni, bu bölgenin tamamen iki 250 nükleotid eşleştirilmiş uç okumasını kapsamasıdır, böylece hata oranlarının en aza indirilebilmesi mümkün olmuştur.⁵⁵

Farklı hiper değişken bölge/bölgelerin kullanımıyla ortaya çıkan taksonomik farklılıkların yanı sıra her bir primer çiftinin kendi primer sapması olacaktır, bazı taksonlar diğerlerinden daha verimli bir şekilde çoğaltılacaktır. Çoğu prokaryotlar, 16S rRNA geninin korunan bölgelerini paylaşsa da maalesef tüm bakteriyel taksonları çoğaltacak evrensel primerler bulunmamaktadır.¹⁵

BİYOİNFORMATİK ANALİZ

YND teknolojilerinden biri kullanılarak elde edilen dizilerin, çalışma hipotezini test etmek için kullanılacak bir veri kümesine işlenmesi gerekir. Mikrobiyom araştırmalarının ilk dönemlerinde, bir komut satırı kullanılarak, uzun hesaplama süreleri gerektiren ayrı ve özel yapım kodlar kullanılmaktaydı.⁵⁶ Amplikon veri analizi için günümüzde, QIIME 2 ve Mothur gibi birkaç popüler yazılım mevcuttur.^{57,58} Ancak her bir yazılımın bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Genellikle analize, FASTQ formatında ham çift uçlu Illumina verileriyle başlanır ve son çıktı, OTU tablosu olarak da bilinen bir özellik tablosudur. Aşağıda başlıklar hâlinde veri işleme adımları ve geçerli çalışma sonuçlarının oluşturulmasında önemli olan konular kısaca özetlenmektedir.

Veri Kalitesi-Filtreleme

İlk olarak diziler kaliteye göre filtrelenir, düşük kaliteye sahip bazlar veya okumalar kaldırılır, çift uçlu okumalar birleştirilir. Herhangi bir örneğe atanmamış okumalar, yetersiz uzunlukta okumalar veya belirsiz bazlara sahip okumalar uzaklaştırılır.⁵⁹ Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] işlemi sırasında kimerik amplifikasyon-

dan kaynaklanan kimeralar veya diziler tespit edilir ve kaldırılır.⁶⁰

Operasyonel taksonomik üniteler

Filtrelemeden sonra diziler, genellikle %97 benzerlik seviyesinde OTU'lar hâlinde gruplandırılır.⁶¹ Bu eşik, OTU tablosu olarak adlandırılan son veri kümesinde hem PCR hem de dizileme ile ortaya çıkan potansiyel hataların katkısının azalmasına neden olur. OTU'ların kümelenmesi için 3 yaklaşım vardır: De novo yaklaşımı (haricî referans dizileri olmadan), kapalı (tamamen referans tabanlı) ve açık olabilen referans tabanlı yaklaşımlar.⁵⁸ Bu farklı kümeleme yaklaşımlarının, OTU'ların farklı bir sayı ve bileşimi ile sonuçlandığı gösterilmiştir.^{62,63} Ayrıca tek bir OTU, her biri farklı, ilişkili bir taksona ayrı ayrı atabilen dizi grupları içerebilir.

Veri Analizi ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Araştırma sorusunu ele almadan önce, çalışma kontrollerinin değerlendirilmesi yapılmalıdır. Negatif kontroller, örnekler göre yüksek DNA verimi ve pozitif kontrollerin saptama sınırında veya üzerinde, kontrol başına yüksek sayıda dizileme okuması gösterirlerse kontamine olmuştur. Böyle bir durumda, düşük DNA

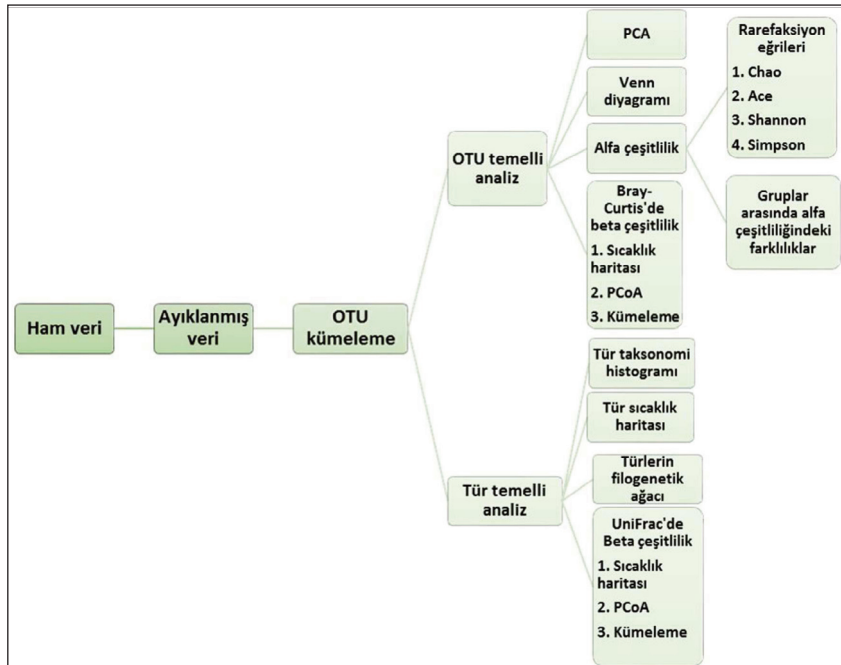
verimine sahip olan, az sayıda okumayla sonuçlanan veya her ikisi birden olan örneklerden gelen veriler ayrılmalıdır.⁶⁴ Kalite kontrol aşamalarını geçen kütüphane örnekleri dizilemeye alınır ve YND verisi üzerinden biyoinformatik analizler gerçekleştirilir (Şekil 1).

Tür içerikleri ve çokluk analizleri

Örneklerdeki tag içeriği; filum, sınıf, sıra, aile, cins ve tür bazında taksonomik sınıflandırmaya tabi tutularak histogram düzeyinde grafikler oluşturulur.

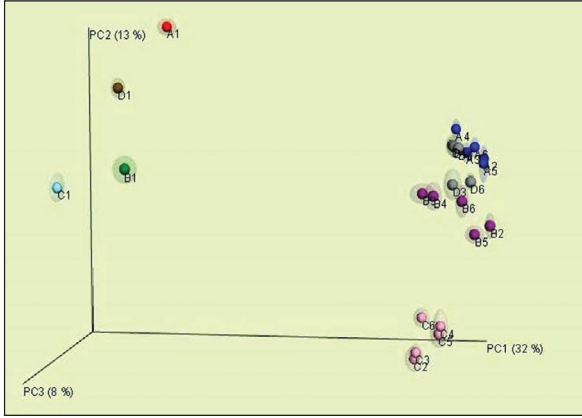
Alfa çeşitlilik analizleri

Analiz edilen örnekteki bakteri çeşitliliği ve bolluğu, çeşitli indeksler ile ifade edilir. Shannon-Wiener indeksi, zenginliği ve eşitliği birleştirir ve nadir türlere daha fazla ağırlık verir.^{65,66} Değeri genellikle 5,0'ı geçmez, değeri ne kadar yüksekse, alfa çeşitlilik o kadar fazladır.⁶⁶ Simpson indeksi, aynı zamanda zenginliği eşitlikle birleştirmekte, bununla birlikte Shannon-Wiener indeksinin aksine ortak türlere daha fazla vurgu yapmaktadır. Bu indeksin değeri 0-1 arasında değişir; değeri ne kadar yüksekse, örneklerin alfa çeşitliliği o kadar fazladır.⁶⁶



ŞEKİL 1: Biyoinformatik analiz iş akışını özetleyen basitleştirilmiş şema.

OTU: Operasyonel Taksonomik Ünite; PCA: Temel Komponent Analizi; PCoA: Temel Koordinat Analizi.



ŞEKİL 2: Beta çeşitlilik ağırlıksız UniFrac uzaklık grafiği gösterimi [Farklı bireylere ait deri örnekleri (A1, B1, C1, D1) ile tükürük örneklerinin (A2-A6, B2-B6, C2-C6, D2-D6) mikrobiyal kompozisyonları arasındaki uzaklığın gösterimi] (Şekil, yazarların 118S890 no.lu TÜBİTAK projesi kapsamında elde ettikleri verilerden üretilmiştir).

Beta çeşitlilik analizleri

Örnekler arası tür farklılığını ortaya çıkarmak için beta çeşitlilik analizleri kullanılır. Çoğunlukla örnekler arasındaki komünitelere ait tür içeriklerinin evrimsel uzaklıklarını hesaplamak için UniFrac analiz yöntemi tercih edilir. UniFrac değerleri, “weighted (dizi çokluklarını göz önünde bulunduran yaklaşım)” ve “unweighted (dizi çokluklarını göz ardı ederek hesaplayan yaklaşım)” olarak 2’ye ayrılır. Beta çeşitlilik uzaklık matrisine göre örnekler arası farklılıkları göstermek için sıcaklık haritası (Heatmap) ve Temel Koordinat Analizi (PCoA), dizileme verilerini analiz etmek için kullanılan 2 popüler yöntemdir (Şekil 2).⁶⁷ Elde edilen grafiklerde, örnekleri temsil eden noktalar arasındaki yakınlık, o örneklerdeki tür içeriğinin birbirine benzer olduğunu gösterir. Ayrıca bu bilgiler kullanılarak örnekler arasında hiyerarşik kümeleme yapılabilir.

TÜKÜRÜK MİKROBİYOMUNUN ADLİ AMAÇLI KULLANIMI

ADLİ AMAÇLI KİŞİSEL KİMLİKLENDİRME

Mikrobiyomlarla ilgili çeşitli çalışmalarda, uzun süreler zarfında bile metagenomik etiketlerden gelen mikrobiyal parmak izlerine dayanılarak, büyük popülasyonlarda tek bir kişinin tanımlanma potansiyeli gösterilmiştir.^{5,68} Özellikle cinsel saldırı vakalarında, kurbanın vücudunda bırakılan ısırık izlerinde bulu-

nan tükürükte, mikrobiyal parmak izlerine neden olan metagenomik etiketler şüpheliyi suçla ilişkilendirebilir.⁶⁹ Mikrobiyal DNA, şüphelinin etnik kökenini tanımlayan atalara ait genomik geçmişle kategorik olarak ilişkiyi gösterebilir.⁶⁹

Tükürük mikrobiyal bileşimin, adli tıp amaçlarına uygun olması için hem toplanan izlerde hem de şüphelinin ağız boşluğunda aynı kalması gerekir. Mikrobiyal olay yeri izlerindeki veya bir bireyin tükürük mikrobiyal topluluklarındaki zamansal değişiklikler, failin suçun soruşturulmasının dışında bırakılmasıyla eşleşmenin başarısız olmasına neden olabilir. Bu konu, aşağıda ayrı bir başlık hâlinde yapılan çalışmalar eşliğinde irdelenmekte, tükürük mikrobiyomu stabilitesinin adli amaçlı olgu çözümlerinde kullanım potansiyeli açısından engel teşkil etmediği belirtilmektedir.

Oral mikrobiyomun bireysel düzeyde ayırt etme olasılığını değerlendiren ilk çalışma, 2012 yılında Stahringer ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir.⁷⁰ Araştırmacılar, ikizler ve kardeşler üzerindeki oral mikrobiyomun değişkenliğine odaklanmışlardır. Bu amaçla mikrobiyal kompozisyonlarını incelemek ve genotipin, cinsiyet, yaş ve ağırlık açısından nasıl etkilendiğini belirlemek için yaşları 8-26 arasındaki 107 kişiden oluşan geniş bir insan grubu ile çalışmışlardır. İnsan mikrobiyomu bileşiminin kalıtsal olup olmadığını değerlendirmek için Stahringer ve ark., 27 monozygot ve 18 dizigotik ikiz çifti, 8 akraba olmayan evlat edinilmiş kardeş çifti ve aynı çalışma grubundan akraba olmayan 1 bireyi çalışmaya dâhil ederek toplamda 264 tükürük örneği toplamıştır.⁷⁰ Çalışma sonuçları, tükürükteki ana bakteri filumunun Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria ve Fusobacteria olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, ağırlıksız UniFrac mesafe analiz yöntemini kullanarak, hem monozygotik ikizlerde hem de dizigotik ikizlerde her bir ikiz çiftinin mikrobiyal toplulukları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını ortaya koymuştur.⁶⁸ Bununla birlikte beraber yaşayan monozygotik çiftler arasında dizigotik olanlara göre daha büyük benzerliğe doğru hafif bir eğilim olmasının, mikrobiyom bileşimi üzerinde küçük bir genetik etkiye işaret ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Stahnger ve ark., ayrıca oral mikrobiyal kompozisyondaki zamansal değişiklikleri tespit etmek için ergenlik dönemini kapsayan 10 yıl boyunca 3 zaman noktasında 82 kişiden 198 tükürük örneği toplamışlardır.⁷⁰ Araştırmacılar, 5 yıl sonra bir bireyin oral mikrobiyomunun popülasyonunkinden daha yakın olarak kendisine benzediğini, ancak 10 yıl sonra kendine benzerliğin artık istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir.⁷⁰ Ayrıca ikiz çiftlerin %84'ü birlikte yaşamayı bıraktıklarında, ikiz çiftler arasındaki benzerliğin 17-22 yaşları arasında azaldığı görülmüştür.⁶⁸ Araştırmacılar, çevrenin, oral mikrobiyomun genel bileşiminde önemli bir rol oynamasına rağmen oral mikrobiyomun en az 5 yıl boyunca dikate değer bir uzun vadeli stabiliteye sahip olduğu sonucuna varmıştır.⁶⁸

Leake ve ark., genellikle PCR tabanlı metagenomikler için kullanılan 16S rRNA hedefi ile oldukça ayırt edici bir genin (rpoB) bir kombinasyonunu kullanarak, özellikle insan DNA tiplemesine dayanan mevcut yöntemler olduğunda, insan tanımlama için kullanılabilir bir tekniği araştırmıştır. Araştırmacılar, Illumina'nın tükürük mikrobiyomunun yüksek verimli dizilemesinin, 2 farklı kişiden tükürük örneklerini tanımlamak için kullanılabilirliği sonucuna varmıştır.⁵

Wang ve ark., 2019 yılında çok sayıda örnek olduğunda, YND'nin maliyetinin arttığını ve bir çalışmanın yapılmasını zorlaştırdığını dikkate alarak, dizileme öncesinde uygulanacak hızlı ve düşük maliyetli bir yöntem arayışına girmiştir.⁷¹ Araştırmacılar, bakteri 16S rRNA V4 bölgesini hedefleyen genel bir primer çifti tasarlamışlardır. Örneklem grubunu, son 3 ayda antibiyotik kullanmayan ve örneklemeden en az 1 saat önce besin tüketmeyen 5 sağlıklı gönüllüden oluşan toplamda 10 örnekte oluşturmuşlardır. Her gönüllü, bir tükürük örneği ve bir oral sürüntü örneği ile çalışmaya katkıda bulunmuştur. Wang ve ark., farklı mikrobiyal toplulukların varlığını ortaya koyan 2 örnek hariç 5 tükürük örneği arasında farklı olduğunu gösteren bir çalışma gerçekleştirmiştir.⁷¹ İki örneğin birbirine yakın sonuçlar göstermesini ise aynı ortamı paylaşan ve benzer bir diyet uygulayan gönüllülerden gelmesi olarak açıklamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, bir

vaka dışında, aynı kişiden alınan tükürük örneklerinin ve oral sürüntü örneklerinin iyi eşleştiğini gözlemlemişlerdir. Tek bir örnekteki tutarsızlığı ise tükürük örneğinin oral mikrobiyoma ek olarak boğaz mikrobiyomunu da verebileceği şeklinde belirtmişlerdir.⁷¹

2020'de yayımlanan yeni bir çalışmada Sundström ve ark., 16S rRNA gen amplikon sıralamasını kullanarak, aynı ailenin üyelerinden toplanan tükürük örneği mikrobiyomu ilişkisini araştırmıştır.⁷² Bunun için birincisi; 10 erişkinden oluşan 3 kuşak bir aile, ikincisi; 4 erişkinden oluşan, 2 kuşaktan bağımsız bir aile çalışma denekleri olarak seçilmiştir. DNA ekstraksiyonundan sonra tüm örnekler, 16S rRNA geninde V3-V4 bölgelerini hedefleyen primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Araştırmacılar, ağırlıksız UniFrac yöntemini kullanarak beta çeşitliliğini ve 2 alakasız aile arasındaki mikrobiyom kompozisyonundaki farklılıklarını incelemek için bir Adonis testini uygulamışlardır. Sonuçlar, bireylerin bakteri toplulukları arasındaki varyansın %13'ünün aile bağları ile açıklanabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar, babalara kıyasla annelerin erişkin çocuklarla daha fazla OTU paylaştığını gözlemlemişlerdir. Bu sonucun, doğum sırasında doğum kanalından, anne sütünden ve bebeklik döneminde anne ile bebek arasındaki güçlü ve yakın fiziksel temastan ileri geldiğini, çocukluk döneminde annenin mikrobiyomunun, çocuğuna yüksek oranda katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu benzerlik, zaman geçtikçe ve çocuklar büyüdükçe daha zayıf hâle gelmiştir (ancak ortadan kalkmamıştır), bu da annenin erişkinlikte hâlâ çocuklarının oral mikrobiyomunu etkilediğini göstermektedir. Nitekim ebeveynler ve hâlâ onlarla yaşayan daha genç erişkin çocuklar arasında en yüksek benzerliğin gözlemlendiği fark edilmiştir, bu da birlikte yaşama gibi çevresel faktörlerin büyük etkisine işaret etmektedir.⁷²

ORAL MİKROBİYOMUN ADLİ KİMLİKLENDİRME BİYOBELİRTECİ OLARAK KALICILIĞI VE ZAMANSAL STABİLİTESİ

Prokaryotik bakteri hücrelerinin bir hücre duvarı ile korunuyor olması ve doğrusal DNA'ya sahip ökaryotik hücrelerdeki yapıdan farklı olarak dairesel bir

genetik materyale sahip olmaları, varlıklarını daha uzun süre devam ettirebilmeleri için bir avantaj sağlamaktadır. Bakteriyel DNA olay yerinde, insan DNA'sından daha uzun süre kalıcı olabilir, bu da onları adli tıp için insan DNA'sından daha uzun süre değerli kılar.

İnsan tükürüğünün stabilitesi araştırmaları, metagenomik analizlerin artması ile son yıllarda daha da fazla çalışılan bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Rasiah ve ark., insan tükürüğünün stabilitesini araştırdıkları bir çalışma için en az 24 saat ağız hijyeni uygulamayan ve tükürük toplamadan önce sakız çiğneyen 10 gönüllüden, 1998'den 2004 yılına kadar kadar uzun bir süre boyunca örnekler toplamıştır.⁷³ Araştırmacılar, bazı geçici değişiklikler olmasına rağmen tükürük bakteriyel bileşiminin zaman içinde nispeten kararlı kaldığı sonucuna varmışlardır. Yazarlar, ayrıca 10 farklı gönüllünün tükürük bakteri modellerini karşılaştırarak oral mikrobiyomun konakçıya özgü olup olmadığını belirlemeye çalışmıştır. Sonuçlar, bireyler arasında tükürük mikrobiyomu açısından belirgin bir varyasyon olduğunu ve bu bireyler arası varyasyonun, tek bir bireyden alınan zaman serilerinde gözlemlenen varyasyondan daha büyük olduğunu göstermiştir.

Costello ve ark., 2009 yılında 0, 1, 90 ve 91. günde 4 kez ağız boşluğu dâhil olmak üzere sağlıklı erişkin gönüllülerin 27 vücut bölgesini analiz ederek, oral bakteri popülasyonunun zaman içindeki uzun vadeli stabilitesini incelemiştir.⁷⁴ Genel bakteri topluluğu bileşimindeki farklılıklar UniFrac mesafeleri kullanılarak değerlendirilmiş ve vücut habitatlarının zamansal çeşitlilik derecesinde farklılık gösterdiği vurgulanmıştır. İncelenen tüm habitatlarda, zamana bağlı olarak aynı kişideki farklılıklar, kişiler arası farklılıklardan daha küçüktür, özellikle oral mikrobiyomun, bağırsak ve deriye göre belirgin derecede uzamsal ve zamansal kararlılık gösterdiği ortaya konulmuştur.⁷⁴

Lazarevic ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise 5 farklı bireyden alınan tükürük örnekleri, 29 günlük bir süre içinde kendi mikrobiyal topluluklarının filogenisi açısından karşılaştırılmıştır.⁴⁸ Araştırmacılar, UniFrac mesafeleri kullanarak tükürükteki bakteri topluluğu karşılaştırmalarını yaptıklarında,

aynı bireyden toplanan örneklerin benzerlik gösterdiklerini ve kümelenildiğini fark etmişlerdir. Sonuçlar, tükürük mikrobiyal topluluğunun en az 5 gün boyunca stabil kaldığını göstermiştir.

Bu araştırmaların bulguları, özellikle kısa zaman aralıklarında tükürük mikrobiyomunun nispeten kararlı kalmasından dolayı adli amaçlı kullanım potansiyeli olduğunu göstermektedir.

YAŞ TAHMİNİNDE KULLANIM POTANSİYELİ

Oral mikrobiyotanın, özellikle anneden çocuğa olmak üzere aile üyelerinden bakteri dikey geçişine bağlı olarak doğumdan kısa bir süre sonra ortaya çıktığı bilinmektedir.⁷² Bakterilerin kolonizasyonu, ağız boşluğunun tamamen steril olduğu bir aşama olan doğumdan 6 saat sonra başlamaktadır. Erken kolonizasyon *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* ve *Veillonella* türlerinin varlığıyla belirtilmiştir. Çeşitli *Streptococci* türleri ve *Actinomyces*, dişlerin patlaması ve diş plağı oluşumu ile bakteri florasına hâkimdir. Flora, istisna olarak *Spirochaetes* ve *Prevotella melaninogenica*'nın yokluğu ile 5 yaşından itibaren erişkinlerle karşılaştırılabilir hâle gelmektedir. Bununla birlikte diş kaybı *Spirochaetes*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus mutans*'ta belirgin bir azalmaya neden olabilmektedir.⁸ Mikrobiyomun kararlılığını sağlamaya yönelik bazı araştırmalar yapılmış olsa da adli tıptaki rolünü belirlemek için her yaş grubuna özel ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.⁷⁴

Bilinmeyen bir iz vericisinin yaş tahmini, şüphelilerin havuzunun daralmasına izin verebilir. Tükürük mikrobiyal analizi, bir deneğin 5 yıl içindeki yaşını tam olarak belirleyebilir ya da düşük bakteri zenginliği ile mikrobiyal izin 65 yaşından büyük bir bireye ait olduğunu gösterebilir. Fakat şimdiye kadar konu üzerinde çalışan araştırmacıların hem fikir olduğu görüş yaşanmaya bağlı olarak oral mikrobiyomdaki değişikliklerin, sağlık koşullarıyla bağlantılı olup olmadığının belirlenmesinin zor olduğudur.¹³

ADLİ AMAÇLI KULLANIMINDAKİ SINIRLILIKLAR

Şu anda mevcut olan mikrobiyom verilerinin çoğunluğu kapsamlı değildir ve adli tıpta uygulan-

bilmesi için doğrulanması gerekir.⁷⁵ Bu yeni alanın adli bilimlerdeki uygulamaları, örnek toplama, depolama ve yayımlanan çalışmaların istatistiksel gücü de dâhil olmak üzere örnek işlemede kullanılan mevcut yöntemler hakkında endişeler uyandırmaktadır. Standartlaştırılmış sistemlerin olmaması, elde edilen sonuçların doğru yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu tür örneklerin kararlılığını ve adli tıp bağlamında analizlerin özgüllüğünü/duyarlılığını açıkça belirlemek için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Şu ana kadar ortaya konulan adli amaçlı kullanımdaki kısıtlamaları maddeler hâlinde özetlersek:

- Geniş çeşitliliklerinden dolayı tükürük mikrobiyomlarının istatistiksel gücü, adli bilimlerde bireysel kimliğin tespit edilmesinde hâlâ sorgulanabilir.

- Sistemik ve ağız hastalıklarının çoğu tükürük bileşenleri için hâlâ keşfedilmemiş durumdadır.

- Mikrobiyal örnek saklama, olay yerinde örneklerin tekrar tekrar çözdürülmesi ve dondurulması gibi, saklama süresi ve sıcaklığı, mikrobiyom tutarlılığını etkileyebilir.

- Kontaminasyonu önlemek için standartlaştırılmış örnekleme tekniklerinin geliştirilmesi ve mikrobiyom imzalarının doğruluğu, özellikle eser miktardaki örnekler için henüz başarısızdır.

SONUÇ

Şüpheliden alınan bir numunedeki oral mikrobiyal imzaların, olay yerindeki bir numunedekiyle eşleşip eşleşmediğini belirlemek için standartlaştırılmış sistemlerin dünya çapında geliştirilmesi ve benimsenmesi gerektiğine inanıyoruz. En önemlisi eşleşme olasılığı hesaplamaları ile belirli bir mikrobiyom bileşiminin ne sıklıkla oluştuğunun belirlenmesi gerekir.

Analitik metodolojinin doğru, spesifik ve tekrarlanabilir olmasını sağlamak için doğrulama basamakları da gerçekleştirilmelidir. Elde edilen sonuçların doğru yorumlanması, biyoinformatik işleme ve veri analizinin geliştirilmesine ve güncellenmiş mikrobiyal veri tabanlarının uygulanmasına bağlıdır. Bu kapsamda karşılaştırmalı kişisel tanımlamalara olanak sağlamak için farklı popülasyonlar ve coğrafik bölgeler için oral mikrobiyom ve tükürük biyobelirteç veri bankaları oluşturulmalıdır. Sonuç olarak tükürük toplama ve saklama teknikleri daha güvenilir hâle getirildiğinde ve kullanılan yöntemler standartize edildiğinde, tükürüğe ait mikrobiyal profiller adli bilimlerde olgu çözümlerinde oldukça yararlı olabilir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı; **Tasarım:** Şükriye Karadayı, Beytullah Karadayı; **Denetleme/Danışmanlık:** Şükriye Karadayı, Beytullah Karadayı; **Analiz ve/veya Yorum:** Şükriye Karadayı, Beytullah Karadayı; **Kaynak Taraması:** Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı; **Makalenin Yazımı:** Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı; **Eleştirel İnceleme:** Beytullah Karadayı; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Şükriye Karadayı.

KAYNAKLAR

1. Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(46):17994-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
2. Fierer N, Lauber CL, Zhou N, McDonald D, Costello EK, Knight R. Forensic identification using skin bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6477-81. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
3. Tozzo P, D'Angiolla G, Brun P, Castagliuolo I, Gino S, Caenazzo L. Skin microbiome analysis for forensic human identification: what do we know so far? *Microorganisms*. 2020;8(6):873. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
4. Karadayı B, Karadayı Ş, Sezgin N. Biyolojik delillerin tespitinde kullanılan tarama ve doğrulama testleri ve bu konudaki son gelişmeler [Presumptive and confirmatory tests used in identification of biological evidence and the latest developments in this topic]. *Türkiye Klinikleri J Foren Sci Leg Med*. 2018;15(2):80-92. [[Crossref](#)]
5. Leake SL, Pagni M, Falquet L, Taroni F, Greub G. The salivary microbiome for differentiating individuals: proof of principle. *Microbes Infect*. 2016;18(6):399-405. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Amankwaa AO. Forensic DNA retention: Public perspective studies in the United Kingdom and around the world. *Sci Justice*. 2018;58(6):455-64. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Leake SL. Is human DNA enough?-potential for bacterial DNA. *Front Genet*. 2013;4:282. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
8. Kapoor P, Chowdhry A. Salivary signature in forensic profiling: A scoping review. *J Forensic Dent Sci*. 2018;10(3):123-7. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
9. Takayasu L, Suda W, Takanashi K, Ilioka E, Kurokawa R, Shindo C, et al. Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. *DNA Res*. 2017;24(3):261-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
10. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res*. 2009;19(4):636-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
11. Karadayı S, Arasoglu T, Akmayan İ, Karadayı B. Assessment of the exclusion potential of suspects by using microbial signature in sexual assault cases: A scenario-based experimental study. *Forensic Sci Int*. 2021;325:110886. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol*. 2000;42:80-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. D'Angiolla G, Tozzo P, Gino S, Caenazzo L. Trick or treating in forensics-the challenge of the saliva microbiome: a narrative review. *Microorganisms*. 2020;8(10):1501. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
14. Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*. 2015;17(3):699-710. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
15. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci Rep*. 2016;6:22164. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
16. Belstrøm D, Holmstrup P, Nielsen CH, Kirkby N, Twetman S, Heitmann BL, et al. Bacterial profiles of saliva in relation to diet, lifestyle factors, and socioeconomic status. *J Oral Microbiol*. 2014;6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
17. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
18. Zaura E, Brandt BW, Prodan A, Teixeira de Mattos MJ, Imangaliyev S, Kool J, et al. On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *ISME J*. 2017;11(5):1218-31. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
19. Renson A, Jones HE, Beghini F, Segata N, Zolnik CP, Usyk M, et al. Sociodemographic variation in the oral microbiome. *Ann Epidemiol*. 2019;35:73-80.e2. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
20. Buchwald S, Kocher T, Biffar R, Harb A, Holtfreter B, Meisel P. Tooth loss and periodontitis by socio-economic status and inflammation in a longitudinal population-based study. *J Clin Periodontol*. 2013;40(3):203-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Sabbah W, Folayan MO, El Tantawi M. The link between oral and general health. *Int J Dent*. 2019;2019:7862923. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. Dzidic M, Collado MC, Abrahamsson T, Artacho A, Stensson M, Jenmalm MC, et al. Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME J*. 2018;12(9):2292-306. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
23. Mishiro T, Oka K, Kuroki Y, Takahashi M, Tatsumi K, Saitoh T, et al. Oral microbiome alterations of healthy volunteers with proton pump inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(5):1059-66. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Balan P, Chong YS, Umashankar S, Swarup S, Loke WM, Lopez V, et al. Keystone species in pregnancy gingivitis: a snapshot of oral microbiome during pregnancy and postpartum period. *Front Microbiol*. 2018;9:2360. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. Nowicki EM, Shroff R, Singleton JA, Renaud DE, Wallace D, Drury J, et al. Microbiota and metatranscriptome changes accompanying the onset of gingivitis. *mBio*. 2018;9(2):e00575-18. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
26. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*. 2013;7(5):1016-25. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
27. Xiao J, Grier A, Faustoferrri RC, Alzoubi S, Gill AL, Feng C, et al. Association between oral candida and bacteriome in children with severe ECC. *J Dent Res*. 2018;97(13):1468-76. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
28. Dabdoub SM, Fellows ML, Paropkari AD, Mason MR, Huja SS, Tsigarida AA, et al. PhyloToAST: Bioinformatics tools for species-level analysis and visualization of complex microbial datasets. *Sci Rep*. 2016;6:29123. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Schincaglia GP, Hong BY, Rosania A, Barasz J, Thompson A, Sobue T, et al. Clinical, immune, and microbiome traits of gingivitis and peri-implant mucositis. *J Dent Res*. 2017;96(1):47-55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. van der Meulen TA, Harmsen HJM, Bootsma H, Liefers SC, Vich Vila A, Zhernakova A, et al. Reduced salivary secretion contributes more to changes in the oral microbiome of patients with primary Sjögren's syndrome than underlying disease. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(10):1542-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Scannapieco FA, Nakazawa F. Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185274. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
32. Zheng X, He J, Wang L, Zhou S, Peng X, Huang S, et al. Ecological effect of arginine on oral microbiota. *Sci Rep*. 2017;7(1):7206. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
33. Koopman JE, Hoogenkamp MA, Buijs MJ, Brandt BW, Keijsers BJ, Crielaard W, et al. Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. *Arch Oral Biol*. 2017;73:79-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Joshi V, Matthews C, Aspiras M, de Jager M, Ward M, Kumar P. Smoking decreases structural and functional resilience in the subgingival ecosystem. *J Clin Periodontol*. 2014;41(11):1037-47. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

35. Kumar PS, Matthews CR, Joshi V, de Jager M, Aspiras M. Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. *Infect Immun*. 2011;79(11):4730-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
36. Wu J, Peters BA, Dominianni C, Zhang Y, Pei Z, Yang L, et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *ISME J*. 2016;10(10):2435-46. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
37. Fan X, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, Purdue MP, Freedman ND, et al. Drinking alcohol is associated with variation in the human oral microbiome in a large study of American adults. *Microbiome*. 2018;6(1):59. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
38. Hernandez BY, Zhu X, Goodman MT, Gatewood R, Mendiola P, Quinata K, et al. Betel nut chewing, oral premalignant lesions, and the oral microbiome. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172196. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
39. Al-Maweri SA, Warnakulasuriya S, Samran A. Khat (*Catha edulis*) and its oral health effects: An updated review. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(1). [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
40. Al Moaleem MM, Porwal A, Al Ahmari NM, Shariff M, Homeida H, Khalid A. Khat chewing induces a floral shift in dental material-associated microbiota: a preliminary study. *Med Sci Monit*. 2020;26:e918219. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
41. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al; LifeLines cohort study, Weersma RK, Feskens EJ, Netea MG, Gevers D, Jonkers D, Franke L, Aulchenko YS, Huttenhower C, Raes J, Hofker MH, Xavier RJ, Wijmenga C, Fu J. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*. 2016;352(6285):565-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
42. Lassalle F, Spagnoletti M, Fumagalli M, Shaw L, Dyble M, Walker C, et al. Oral microbiomes from hunter-gatherers and traditional farmers reveal shifts in commensal balance and pathogen load linked to diet. *Mol Ecol*. 2018;27(1):182-95. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
43. Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Ohman C, Domellöf M, Tanner AC, et al. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(2):127-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
44. Li J, Quinque D, Horz HP, Li M, Rzhetskaya M, Raff JA, et al. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiol*. 2014;14:316. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
45. Skarke C, Lahens NF, Rhoades SD, Campbell A, Bittinger K, Bailey A, et al. A pilot characterization of the human chronobiome. *Sci Rep*. 2017;7(1):17141. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Sato Y, Yamagishi J, Yamashita R, Shinozaki N, Ye B, Yamada T, et al. Inter-individual differences in the oral bacteriome are greater than intra-day fluctuations in individuals. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131607. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
47. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*. 2008;87(11):1016-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
48. Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, Osterås M, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods*. 2009;79(3):266-71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
49. Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, François P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010;11:523. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
50. Çevik FE, Çakan H. Adli mikrobiyal genetik. Gündoğmuş ÜN, editör. Adli Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.32-8. [[Link](#)]
51. Kim M, Morrison M, Yu Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J Microbiol Methods*. 2011;84(1):81-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
52. Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(8): 4800-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
53. Kumar PS, Brooker MR, Dowd SE, Camerlengo T. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One*. 2011;6(6):e20956. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
54. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
55. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(17):5112-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
56. Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet*. 2008;4(11):e1000255. Erratum in: *PLoS Genet*. 2008;4(12). Welch, David Mark [corrected to Mark Welch, David]. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
57. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852-7. Erratum in: *Nat Biotechnol*. 2019;37(9):1091. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
58. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(23):7537-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
59. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods*. 2013;10(1):57-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
60. von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*. 1997; 21(3):213-29. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
61. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1994;44(4):846-9. [[Link](#)]
62. Rideout JR, He Y, Navas-Molina JA, Walters WA, Ursell LK, Gibbons SM, et al. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ*. 2014;2:e545. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
63. Westcott SL, Schloss PD. De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. *PeerJ*. 2015;3:e1487. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
64. Karstens L, Asquith M, Davin S, Fair D, Gregory WT, Wolfe AJ, et al. Controlling for contaminants in low biomass 16S rRNA gene sequencing experiments. *bioRxiv*. 2018. [[Crossref](#)]
65. Borcard D, Gillet F, Legendre P. Community diversity. *Numerical Ecology with R*. 2nd ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2018. p.369-412. [[Crossref](#)]
66. Xia Y, Sun J, Chen D. Introductory overview of statistical analysis of microbiome data. *Statistical Analysis of Microbiome Data with R*. 1st ed. Singapore: Springer Singapore; 2018. p.43-75. [[Crossref](#)]
67. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W566-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]

68. Franzosa EA, Huang K, Meadow JF, Gevers D, Lemon KP, Bohannan BJ, et al. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(22):E2930-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
69. Clarke TH, Gomez A, Singh H, Nelson KE, Brinkac LM. Integrating the microbiome as a resource in the forensics toolkit. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;30:141-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
70. Stahringer SS, Clemente JC, Corley RP, Hewitt J, Knights D, Walters WA, et al. Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood. *Genome Res*. 2012;22(11):2146-52. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
71. Wang S, Song F, Wang Y, Huang Y, Xie B, Luo H. High resolution melting analysis (HRM) based on 16SrRNA as a tool for personal identification with the human oral microbiome. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2019;7(1):161-3. [[Crossref](#)]
72. Sundström K, Mishra PP, Pyysalo MJ, Lehtimäki T, Karhunen PJ, Pessi T. Similarity of salivary microbiome in parents and adult children. *PeerJ*. 2020;8:e8799. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
73. Rasiyah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol*. 2005;50(9):779-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
74. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009;326(5960): 1694-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
75. Yooseph S, Andrews-Pfannkoch C, Tenney A, McQuaid J, Williamson S, Thiagarajan M, et al. A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PLoS One*. 2013;8(12):e81862. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]