

Veteriner Mikrobiyolojisi

Editör
KAZIM ŞAHİN



BİDGE Yayınları

Veteriner Mikrobiyolojisi

Editör: KAZIM ŞAHİN

ISBN: 978-625-8567-67-0

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 2025-12-25

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İÇİNDEKİLER

Bakteriofajlar ve İzolasyon Yöntemleri	1
<i>ÖZDEN DELLAL</i>	
BİYOFİMLERE KARŞI BAKTERİYOFAJ TEMELLİ YAKLAŞIMLAR	22
<i>AYFER GÜLLÜ YÜCETEPE</i>	
BAKTERİYOFAJ KÖKENLİ POLİSAKKARİT DEPOLİMERAZLAR	43
<i>AYFER GÜLLÜ YÜCETEPE</i>	
KEDİ VE KÖPEKLERDE DERMATOFİT ENFEKSİYONLARINA KARŞI OLUŞAN BAĞIŞIKLIK VE AŞILAMA	70
<i>OSMAN YAŞAR TEL</i>	
ADENOVIRUS INFECTIONS IN CHICKENS AND ANTIBACTERIAL- ANTIVIRAL MEDICINAL PLANTS	87
<i>ORKUN BABACAN, SEHER ÖZGE KAYAN, SELAMİ SELVİ</i>	
ANTIBACTERIAL PLANTS AND ANTIBACTERIAL NANOPARTICLES: THEIR USE IN VETERINARY MEDICINE	119
<i>ORKUN BABACAN</i>	

BÖLÜM 1

BAKTERİOFAJLAR VE İZOLASYON YÖNTEMLERİ

1.ÖZDEN DELLAL¹

Giriş

BAKTERİYOFAJLAR

Bakteriyofaj “bakteri” ve “yemek” anlamına gelen iki kelimenin birleşmesi ile oluşan Yunanca bir kelimedir ve bakterilerin lizisine neden olan bakteri virüsleridir (Wommack ve ark., 2000: 64). Bakteriyofajlar kısaca fajlar protein ve nükleik asitten meydana gelmektedir, diğer virüslerde de olduğu gibi genetik materyallerini protein veya kapsit içerisinde bulundurlar. Fajlar nükleik asit

¹ Veteriner Hekim, Harran Üniversitesi, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Orcid: 0009-0002-5616-8796

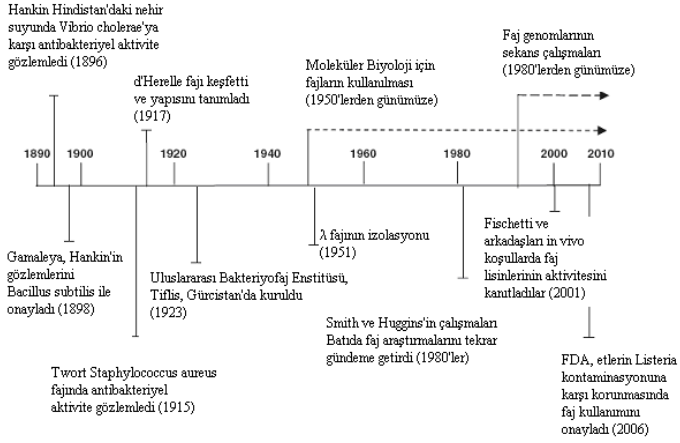
olarak sadece tek ya da çift sarmallı DNA veya RNA bulundurabilirler, fajların büyük bir kısmı nükleik asit olarak DNA'ya sahiptir (Ackermann, 2007: 152). Fajlar bakterilerle kıyaslandığında oldukça küçük mikroorganizmalardır bakterilerin aksine ışık mikroskobu ile görülemezler ancak elektron mikroskobuyla görüntülenebilirler. Bir fajın ortalama ağırlığı 5×10^{-13} gramdır, boyutları ise 24-200 nm arasında değişmektedir. Tanımlanan en büyük faj olan T4 fajı 200 nm uzunluk ve 80-100 nm genişliğindedir (Kropinski, 2018: 169). Çeşitli türlere sahip bakteriyofajların genomları, türler arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Bazı bakteriyofajlar, konak bakterinin genom büyüklüğüne yakın büyüklükte genomlara sahip olabilmektedir, 500 kilo baz büyüklüğüne kadar faj genomları mevcuttur. Bakteriyofajların ribozomları olmadığı için protein sentezi yapamazlar, hücresel mekanizmaları da olmadığı için de enerji üretemezler. Bu yüzden yaşamlarını devam ettirebilmek için spesifik bir konakçıya ihtiyaç duyarlar (Guttman ve ark., 2025: 4). Ancak fajlar sadece prokaryotik hücrelerden bakterileri enfekte eden ve çoğalan spesifik viral patojenik virüsler olduğundan dolayı insanlar, hayvanlar ve bitkiler için yani ökaryot hücreler için zararsızdırlar. (Necel ve ark., 2025: 66). Fajların yapısında lipit bulunmadığı için kloroforma karşı dayanıklıdırlar ve bu özellikleri sayesinde bakteri ortamından ayırmak oldukça kolaydır (Kılıç, 2008:).

BAKTERİİFAJLARIN TAHRİHSEL GELİŞİMİ

Bakteriyofajların keşfi yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Fajlar ile ilgili ilk bilimsel tespitler, İngiliz bakteriyolog Ernest Hanbury Hankin tarafından 1896 yılında Hindistan'da bulunan Yamuna ve Ganj nehrindeki suların birçok bakteriye özellikle de *Vibrio cholerae*'ya karşı inhibe edici etkisi olduğunu gözlemlenmesiyle başlamıştır ve 1901 yılında ise Emmerich ve Löw antimikrobiyal bir maddenin bakteri kültürünü lize ettiğini öne sürmesiyle devam etmiştir (Kutter & Sulakvelidze, 2004). 1915

yılında İngiliz bakteriyolog Frederick Twort katı besiyerinde bakteri kültürlerinde erimeler oluşturan bir ajan keşfetmiştir. 1917’de Kanadalı bakteriyolog Felix d’Herelle Fransa Pasteur Enstitüsü’nde yaptığı çalışmalarda bakterileri öldüren bir canlı keşfetmiş ve yürüttüğü çalışmalarda atık sulardan aldığı örneklerle filtrasyon işlemi uyguladıktan sonra bakteri içermeyen filtratları dizanteri bakteri kültürlerinin içine ilave ettiğinde söz konusu bakteriyi ortadan kaldırdığını gözlemlemiştir. Buna sebep olan canlıların ultravirüsler olduğunu öne sürmüş ve bunları “bakteriyofaj” olarak adlandırmıştır. Bu keşfin hemen sonrasında dizanteri hastalığı olan bir çocuğun tedavisini fajlarla yürütmüş ve tedevide başarılı olmuştur. Bundan sonra İkinci Dünya Savaşı boyunca dizanteri tedavisinde kullanılmak üzere “polyfagin” adlı faj preparatı üretilmiştir (Adhya & Merril, 2006: 443). 1923 yılında George Eliava tarafından faj tedavisi ve faj çalışmalarının geliştirilebilmesi için Tiflis Grücistan’da Eliava Enstitüsü açılmıştır ve bu enstitü sayesinde faj çalışması yürüten birçok bilim insanı çeşitli yöntemler geliştirip, fajları tedavi amacıyla kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda bakteriyofajların büyüklüklerinin virüslere benzer olduğu, bu nedenle yalnızca elektron mikroskobunda incelenebildiği ortaya çıkmıştır (Fokine & Rossmann, 2014: 4). Fajların tarihsel gelişim evresi Şekil 1’de sunulmuştur.

Şekil-1 Bakteriyofajların tarihsel evrimi



Kaynak: (O'Flaherty, Ross & Coffey, 2009: 33)

BAKTERİYOFAJLARIN SINIFLANDIRILMASI

Fajların sınıflandırılmasında morfolojik ve moleküler özellikleri dikkate alınmaktadır. Bradley 1967 yılında sahip oldukları nükleik asit ve morfolojik yapılarına göre bakteriyofajları A, B, C, D, E ve F olmak üzere 6 tipe ayırmıştır:

A tipi fajlar uzun kuyruklu, kılıflı, kasılabilen ve çift iplikli linear DNA'ya,

B tipi fajlar uzun kuyruklu, kılıflı ve çift iplikli linear DNA'ya,

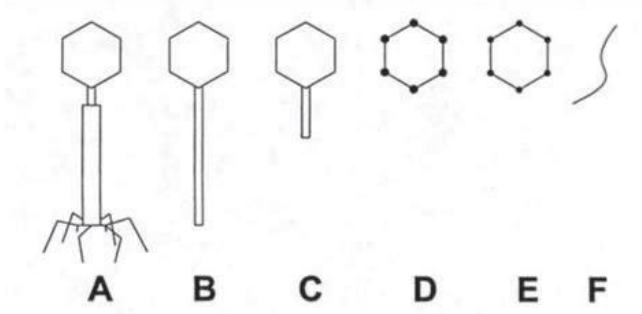
C tipi fajlar kısa kuyruklu, kılıfsız ve çift iplikli linear DNA'ya,

D tipi fajlar kuyruksuz, büyük kapsomerli, tek iplikçi DNA'ya,

E tipi fajlar kuyuksuz, küçük kapsomerli, tek iplikçi RNA'ya,

F tipi fajlar ise başsız, ipliksi ya da filamentöz, tek iplikçi RNA'ya sahiptirler.

Şekil-2 Bradley sınıflandırması



Kaynak: (Bradley, 1967: 31)

Ackermann (2003 ve 2007) tarafından yapılan bakteriyofajlar morfolojik nükleik asit yapılarına göre yeniden sınıflandırılmıştır ve bu sınıflandırma “Ackermann Sınıflandırması” olarak adlandırılmıştır. Ackermann sınıflandırılmasında fajlar kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik fajlar olmak üzere 4 grup altında toplanmıştır. Bu sınıflandırmada fajlar tek bir takım Caudovirale altında 13 familyada toplanmıştır. Bakteriyofajların büyük bir oranın (%96’sının) kuyruklu fajlar grubunda yer aldığı, çift sarmallı DNA'ya ve uzun veya kısa bir kuyruğa sahip olduğu rapor edilmiştir. Kuyruklu fajlar içinde yer alan aileler *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae*’dır. *Myoviridae*’lar kuyruklu fajların %25’ini oluşturmakta ve kasılabilir kuyruğa, *Siphoviridae*’lar %61’ni oluşturmakta ve uzun kuyruğa, *Podoviridae*’lar %14’ünü oluşturmata ve kısa kuyruğa sahiptirler. Polihedral bakteriyofajlar nükleik asit olarak tek veya çift zincirli DNA veya RNA içermekte

ve bu grupta yer alan familyalar *Microviridae* (ssDNA), *Corticoviridae* (dsDNA), *Tectiviridae* (dsDNA), *Leviviridae* (ssRNA) ve *Cystoviridae* (dsRNA)'dır. Pleomorfik fajlar nükleik asit olarak DNA'ya sahiptirler ve bu grupta bulunan aileler *Plasmaviridae* (dsDNA) ve *Fuselloviridae* (dsDNA)'dır (Ackermann, 2023: 154). Bakteriyofaj Ackerman sınıflandırılması Şekil 3'te sunulmuştur.

Şekil-3 Ackermann sınıflandırılması

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familya	Cins	Örnek	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i> <i>Myoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	15 6 6 3	T4 λ T7	Kontraktıl kuyruk Uzun kuyruk Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C ds, C, T ds, L RNA, ss, L ds, L, S	<i>Microviridae</i> <i>Corticoviridae</i> <i>Tectiviridae</i> <i>Leviviridae</i> <i>Cystoviridae</i>	4 1 1 2 1	ϕ X174 PM2 PRD1 MS2 ϕ 6	Lipit içeren kompleks kapsid Lipoprotein kaplı kapsid
Filamentöz	DNA, ss, C ds, L ds, L	<i>Inoviridae</i> <i>Lipothrrixviridae</i> <i>Rudiviridae</i>	2 1 1	fd TTV1 SIRV	Lipit zarf Uzun veya kısa filament TMV benzeri
Pleomorfik	DNA, ds, C, T ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i> <i>Fuselloviridae</i>	1 1	L2 SSV1	Zarf, lipid, kapsid yok Limon formu, kapsid yok

Kaynak: (Ackermann, 2007: 152)

BAKTERİYOFAJLARIN MORFOLOJİSİ VE ÖZELLİKLERİ

Tipik bir faj içerisinde genetik materyali bulundurduğu bir baş, boyun, kuyruk ve kuyruk liflerinden meydana gelir. Baş

genişliğe sahiptir. Kuyruk yapısı da faj tipine göre değişiklik gösterir. Bazılarında hiç kuyruk bulunmazken, bazılarında ise kısa, basit ya da karmaşık yapıda bulunabilir. Faj kuyrukları konakçı hücreye adsorbsiyonu sağlamakla görevlidir. Fajdan genetik materyalin konakçı hücreye aktarımını sağlayan öz yapı kuyruk içerisinde yer alır. Bu öz yapıyı çevreleyen protein yapıya da kuyruk kını adı verilir. Kuyruk kını enfeksiyon sırasında kasılarak nükleik asidin konakçı hücreye aktarımını sağlar.

Fajlar kuyruk iplikçiklerine göre de farklılık gösterebilmektedir. Fajların bazıları topuz şeklinde uç yapısına sahipken, bazılarında hiçbir özgül uç yapısı bulunmamaktadır. Fajların konakçı spesifikliği kuyruk kısmında bulunan proteinlerden kaynaklanmaktadır. Kuyruk kısmında bulunan bu proteinler vasıtasıyla konakçı bakterilerin hücre çeperinde yer alan teikoik asit, lipopolisakkarit, protein, pili ve flagella gibi reseptörlere bağlanır ve böylece konak hücresi dışında diğer mikrofloraya zarar vermez (Meaden & Koskella,2013 :4). Kuyruk iplikçiklerinde yer alan lizozim enzimi sayesinde spesifik bakterisinin hücre duvarını lize ederek genetik materyalini sitoplazmaya enjeksiyonunu sağlar (Kutter & Sulakvelidze, 2004). Çoğu fajların spesifikliği çok yüksek olmasına karşın bazı fajların spesifikliği biraz daha düşük olduğu ve dolayısıyla birçok bakteriyi enfekte edebildikleri bildirilmektedir. Ricci ve Piddock (2010) tarafından yapılan bir çalışmada Salmonella'ya spesifik ST27, ST29 ve ST35 fajların sadece TolC reseptörlerine sahip Salmonella serovarları enfekte ettiği, Enterobacteriaceae familyasında yer alan diğer türlere karşı etkili olmadığı ortaya konmuştur. Ancak spesifikliği daha düşük olan bazı fajların, birçok bakteri türünü enfekte ettiği bildirilmiş ve bu durum “yerel adaptasyon” olarak ifade edilmiştir (Flores ve ark., 2011: 108).

BAKTERİYOFAJLARIN YAŞAM ŞEKİLLERİ

Bakteriyofajların ribozom ve hücresele mekanizmaları bulunmadığından protein ve enerji üretmezler bu yüzden zorunlu hücre içi parazitleridir. Fajlar çoğalmak amacıyla başka bir hücreye girerek replike olmak zorundadırlar. Bu duruma ‘enfeksiyon’, enfekte ettiği hücreye ‘konakçı’ denir ve her fajın konakçısı kendine özgüdür. Fajlar, konakçı hücrelerini enfekte ettikleri zaman genellikle iki farklı hayat döngüsü ile yaşamlarını devam ettirirler. Bunlardan ilki litik döngü (virülan) ikincisi lizojenik (ılıman) döngüdür. Ayrıca fajlarda çok nadir de olsa “filamentli” olarak isimlendirilen üçüncü bir yaşam döngüsü de mevcuttur. Filamentli yaşam döngüsünde litik ve lizojenik döngülerde olduğu gibi faj çoğalmak için konakçının çoğalma mekanizması kullanılır, ancak filamentli sistemde konak hücre ölümü, sürekli faj üretimi ve fajların çevreye salınımı gerçekleşmemektedir (Ye ve ark., 2009: 72).

Bir bakteriyofajın hangi yaşam döngüsüne sahip olacağı operatör bölgesine bağlanan CRO ve CI proteinleri arasındaki önceliğe bağlıdır. CI proteini ile bağlanma gerçekleşiyorsa lizojenik yaşam döngüsü, CRO proteini ile bağlanma gerçekleşiyorsa litik yaşam döngüsüne girmektedir (Guttman, Raya & Kutter,2005: 4).

Litik yaşam döngüsü

Litik fajların çoğalma evreleri adsorbsiyon, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis olmak üzere 5 aşamadan meydana gelir.

Adsorbsiyon veya tutunma: Kuyruklu fajların adsorbsiyonu, kuyruk lifleri sayesinde hedef bakterinin kapsül yüzeyine tutunmasıyla başlar. Kuyruksuz fajların adsorbsiyonu ise kapsomerlere özgül reseptörlerin tutunmasıyla gerçekleşir. Enfeksiyonun ilk ve en önemli aşaması olan adsorbsiyonda fajın konakçı bakteriye spesifikliğı belirlenir.

Gram-negatif bakterilerle tutunma; oligosakkaritler, lipopolisakkaritler ve proteinler gibi reseptörlerle sağlanırken,

Gram-pozitif bakterilerde ise murein tabakasının karmaşık yapıda olmasından dolayı teikoik asit gibi değişik bağlanma bölgeleri bulunur. Birçok faj tutunma için Ca^{2+} , Mg^{2+} gibi iki değerlikli iyonlara ihtiyaç duyar. Bu iyonlar bakteri ve faj partiküllerinin negatif yüklerini nötrleyerek adsorbsiyonu kolaylaştırır. Adsorbsiyon aşaması faj ve bakterinin birbirine temasından ortalama 5 dakika sonra sona ermiş olur (Bertozzi Silva, Storms & Sauvageau, 2016: 363).

Penetrasyon: Bakteriyofajın konakçı hücreye tutunduktan sonra genetik materyalini aktardığı aşama olup, bu mekanizma tüm fajlar için spesifiktir. Fajlar genetik bilgiyi konakçı hücreye enjekte ettiği sırada kuyruk lifleri kısalır ve bu sayede kuyruk, bakteri hücre duvarına penetre olmuş olur. Kapsit içindeki genetik materyal kuyruk içindeki kanaldan geçerek periplazmik boşluğa gelir ve fajın bakteri hücre membranında meydana getirdiği küçük delikten kolayca hücre sitoplazmasına geçer. Açılan delik bakteri hücresi tarafından hemen onarılır. Genetik materyalin salınımdan sonra bakteri hücre duvarında kalan faj kılıfı “hayalet faj”, konakçının içerisine enjekte olan nükleik asit de ‘vejetatif faj’ olarak adlandırılır (Molineux, 2021: 40 -Roos ve ark., 2007: 64).

Biyosentez ve Olgunlaşma: Fajların konakçı hücre içerisinde çoğalma ve gelişme dönemidir. Bu dönemde baş, kuyruk ve diğer faj yapıları sentezlenir. Latent dönem olarak da adlandırılan bu dönem, fajların genetik bilgilerinin konakçı hücrenin sitoplazmasına girmesinden olgun fajların oluşumuna kadar geçen süreyi kapsar. Faj genetik materyali bakteri hücresine girdikten sonra bakteri ribozomları protein sentezine başlar. Faj bakteri hücresinin metabolizmasını bozar, kendi genomunun replikasyonunu sağlar. Bakteriyofaj bileşenleri ve enzimleri sentezlenir ve ayrı ayrı sentezlenen faj bileşenleri birleşmeye

başlar. Aynı ayrı sentezlenen bakteriyofaj yapı taşları bir araya gelerek olgun faj partiküllerini (virion) meydana getirir (Hendrix, 2002:127).

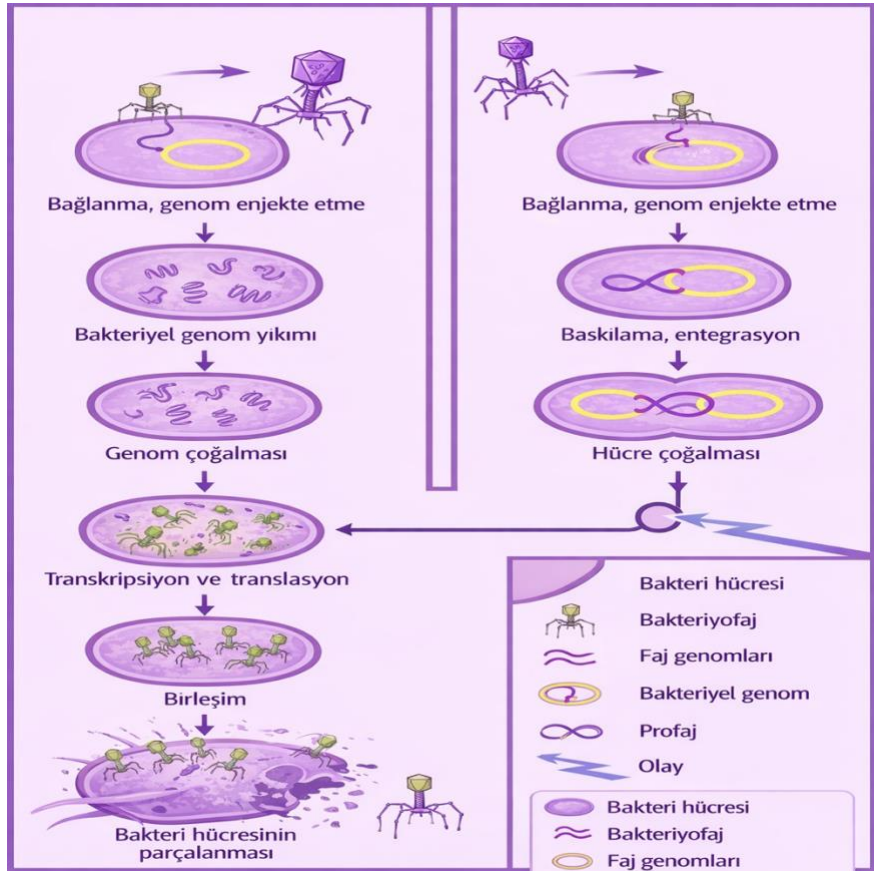
Lizis: Bakteri hücresi içinde belli bir sayıya ulaşan ve olgunlaşan fajlar kendi enzim ve proteinlerini kullanarak bakteriyi lize eder ve bakteriden çıkarak serbest hale geçerler. Lizisin meydana gelebilmesi için iki bileşen kullanılır bu bileşenler lisin ve holin proteinleridir. Bunlardan viral protein olan holin proteinleri hücre membranında gözenekler oluşturur. Viral enzim olan endolizin enzimi ise hücre duvarını (peptidoglikan) parçalar. Holin iç membranda porlar açarak lisin enziminin peptidoglikan tabakaya ulaşmasını sağlayarak hücrenin lize olmasına neden olmaktadır (Hanlon, 2007: 30).

Lizojenik yaşam döngüsü

Lizojenik yaşam döngüsünde litik döngüde olduğu gibi faj konakçı hücrelerine adsorbe olur ve kendi DNA'sını bakteri hücrelerine enjekte eder. Ancak bu penetrasyon aşamasından sonra yeni sentezlenmiş faj partiküllerinin oluşumu yani latent dönem gerçekleşmez. Faj DNA'sının bakteri kromozomuna rekombinasyon yoluyla girmesine 'lizojeni', konakçı hücrenin DNA'sına bağlanan faj genetik materyaline de 'profaj' denir. Kromozomunda bu şekilde faj taşıyan bakteri 'lizojenik bakteri' olarak isimlendirilir. Lizojenik döngünün litik döngüden en temel farkı fajın konakçı hücrelerini lize etmemesidir. Koşullar uygun oldukça konak hücrede faj var olmaya devam eder. Konakçı hücrenin çoğalmasına olanak sağladığı için hücrenin yeni jenerasyonlarında da faj varlığını sürdürür. Fakat ortam şartları konakçı hücre için uygun olmadığında, yani besin kaynaklarının tükenmesi ve inkübasyon sıcaklığının değiştirilmesi durumunda, konak bakteri hücresi mitomisin C gibi antibiyotik, azot gazı ve UV ışınlarına maruz bırakılması durumunda profajlar etkin

hale geçerek litik hayat döngüsüne girerek virülant faja dönüşür, bu olay ‘faj indüksiyonu’ olarak adlandırılır (Lacroix, 2010).

Şekil-5 Litik ve Lizojenik Fajların Yaşam Döngüsü



Kaynak: (Leitner ve ark.,2020: 6)

BAKTERİOFAJ İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Bakteriyofaj izolasyonu, çevresel veya klinik örneklerde bulunan fajların tespit edilmesi, saflaştırılması ve karakterize edilmesine yönelik yöntemlerin bütünüdür. İzolasyon

stratejileri, hedef bakterinin biyolojik özelliklerine, örnek kaynağına ve izolasyon sonrası planlanan uygulamalara (temel araştırma, faj terapisi, biyokontrol veya genomik analizler) bağlı olarak şekillenir. Bakteriyofaj izolasyon yöntemleri temel olarak doğrudan izolasyon ve zenginleştirme (enrichment) temelli izolasyon olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılmaktadır (Van Twest & Kropinski, 2009: 15-21).

DOĞRUDAN İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Doğrudan izolasyon, faj içerebileceği düşünülen örneklerin herhangi bir ön çoğaltma basamağı uygulanmaksızın hedef bakteri üzerinde test edilmesine dayanan bir yaklaşımdır. Bu yöntemin temel amacı, örnekte doğal olarak bulunan faj popülasyonunu mümkün olduğunca bozulmadan ortaya koymaktır. Özellikle ekolojik çalışmalar ve faj çeşitliliğinin araştırıldığı durumlarda doğrudan izolasyon tercih edilmektedir (Ackermann, 2011: 32).

Doğrudan izolasyon yönteminin en önemli avantajı, zenginleştirme süreçlerinde ortaya çıkabilen seçim yanlılığını (selection bias) en aza indirmesidir. Bununla birlikte, örnekteki faj konsantrasyonunun düşük olması durumunda tespit edilebilirlik sınırlı olabilir. Bu nedenle doğrudan izolasyon, genellikle yüksek faj yüküne sahip çevresel örneklerde daha başarılı sonuçlar vermektedir (Clokier, 2011: 1).

ZENGİNLEŞTİRME (ENRICHMENT) TABANLI İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Zenginleştirme yöntemi, örnekte bulunan fajların hedef bakteri ile kontrollü koşullarda çoğaltılmasını esas alır. Bu yaklaşımda, potansiyel fajların konak bakteriyi enfekte ederek replikasyon yapması sağlanır ve böylece faj yoğunluğu artırılır. Zenginleştirme, düşük konsantrasyonda bulunan fajların izolasyonunu mümkün kıldığı için klinik ve terapötik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Abedon, 2011: 1).

Zenginleştirme temelli izolasyonun başlıca avantajı, litik fajların seçilimini kolaylaştırmasıdır. Ancak bu yöntemin önemli bir sınırlılığı, hızlı çoğalan veya konakla daha güçlü etkileşim kuran fajların baskın hale gelerek örnekteki doğal faj çeşitliliğini azaltabilmesidir. Bu durum, özellikle ekolojik veya evrimsel çalışmalarda dikkate alınması gereken bir faktördür (Gordillo Altamirano & Barr, 2019: 32).

PLAK TABANLI İZOLASYON VE TESPİT YÖNTEMLERİ

Plak oluşumu, bakteriyofaj izolasyonunun en temel ve en yaygın kullanılan göstergelerinden biridir. Fajların duyarlı bakteri konakları üzerinde oluşturduğu lizis bölgeleri hem faj varlığının doğrulanmasında hem de saf faj izolatlarının elde edilmesinde kritik öneme sahiptir. Plak temelli yöntemler, başlıca double agar overlay (çift katmanlı agar) yöntemi ve spot test yöntemi olarak iki ana grupta ele alınmaktadır (Ackermann, 2011: 32- Kropinski, 2009).

Çift Katmanlı Agar (Double Agar Overlay) Yöntemi

Double agar overlay yöntemi, bakteriyofaj izolasyonu ve identifikasyonu için altın standart olarak kabul edilen plak bazlı bir tekniktir. Bu yöntemin temel prensibi, hedef bakterinin yarı katı bir agar tabakası içerisinde homojen olarak dağıtılması ve fajların bu bakteri tabakası üzerinde lokalize lizis bölgeleri oluşturmasının sağlanmasına dayanır (Kropinski, 2009).

Bu yaklaşım, fajların enfeksiyon döngüsü boyunca oluşturduğu plakların net bir şekilde gözlemlenmesine olanak tanır. Plak sayısı ve morfolojisi, faj yoğunluğu ve biyolojik özellikleri hakkında nicel ve nitel bilgiler sunar. Özellikle faj titerinin belirlenmesi, saf faj klonlarının elde edilmesi ve izolasyon sonrası saflaştırma aşamalarının planlanmasında double agar overlay yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (Clokier, 2011: 1).

Plakların boyutu, kenar yapısı ve şeffaflık derecesi; fajın litik veya temperate karakteri, enfektivite gücü ve konak etkileşimleri hakkında ön bilgi sağlayabilir. Bu nedenle double agar overlay yöntemi yalnızca bir tespit aracı değil, aynı zamanda ön karakterizasyon basamağı olarak da değerlendirilmektedir (Hyman & Abedon, 2012:70).

Spot Test Yöntemi

Spot test yöntemi, faj varlığının hızlı ve pratik şekilde değerlendirilmesini amaçlayan plak temelli bir yaklaşımdır. Bu yöntemde, potansiyel faj içeren süspansiyonlar, hedef bakteri ile kaplanmış agar yüzeyi üzerine küçük hacimler halinde uygulanır ve lokal lizis bölgelerinin oluşumu gözlemlenir (Khan Mirzaei & Nilsson,2015: 10)

Spot test, özellikle ön tarama (screening) amacıyla tercih edilmektedir. Çok sayıda örneğin veya faj süspansiyonunun kısa sürede değerlendirilmesine olanak tanınması, yöntemin en önemli avantajıdır. Bununla birlikte, spot test yöntemi genellikle kantitatif bilgi sağlamaz ve faj titerinin belirlenmesi için yeterli kabul edilmez. Bu nedenle spot test, çoğu çalışmada double agar overlay yöntemi ile birlikte tamamlayıcı bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır (Calendar , 2006- Mazzocco ve ark., 2009).

Spot testte gözlenen lizis alanlarının yorumlanmasında dikkatli olunması gerekmektedir. Özellikle yüksek faj konsantrasyonlarında ortaya çıkan lizis bölgeleri, gerçek faj enfeksiyonundan ziyade bakteriyel inhibisyona veya lizis dışı etkilerden kaynaklanabilir. Bu nedenle spot test sonuçlarının, ileri doğrulama ve saflaştırma yöntemleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Ackermann, 2003:154 – Abedon, 2011).

Double agar overlay ve spot test yöntemleri, bakteriyofaj izolasyonunda farklı amaçlara hizmet etmektedir. Double agar overlay yöntemi, fajların kantitatif analizi ve saf izolat elde edilmesi

için daha güvenilir sonuçlar sunarken; spot test yöntemi hızlı tarama ve ön değerlendirme aşamalarında avantaj sağlamaktadır. Bu iki yöntemin birlikte kullanımı, faj izolasyon sürecinin doğruluğunu ve verimliliğini artırmaktadır (Gordillo Altamirano & Barr, 2019:32).

ÖRNEK KAYNAĞINA GÖRE BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU

Bakteriyofaj izolasyonunda kullanılan örnek kaynağı, uygulanacak yöntemin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Atıksu sistemleri, yüzey ve yeraltı suları, toprak örnekleri ile hayvan kaynaklı materyaller, yüksek faj yoğunluğu ve çeşitliliği barındırmaları nedeniyle sıklıkla tercih edilen kaynaklar arasında yer almaktadır. Buna karşılık, klinik kökenli örnekler; özellikle patojen bakterilere özgüllük gösteren ve terapötik uygulamalarda kullanılabilecek fajların elde edilmesi açısından önem taşımaktadır (Ackerman & DuBow, 1987, Górski ve ark., 2018:10).

Farklı örnek türleri, içerik ve mikrobiyal yük açısından değişkenlik gösterdiğinden, izolasyon sürecinde uygulanacak ön işleme ve faj kazanım stratejilerinin örnek kaynağına göre uyarlanması gerekmektedir. Bu durum, faj izolasyon çalışmalarının başarısını artırmak için örnek bazlı metodolojik optimizasyonun gerekliliği olarak vurgulanmaktadır (Hyman, 2019: 12, Jurczak-Kurek ve ark., 2016: 6).

KAYNAKÇA

Wommack, K. E., & Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(1), 69-114.

<https://doi.org/10.1128/mmbr.64.1.69-114.2000>

Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 152(2), 227-243.

<https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>

- Kropinski, A. M. (2018). Bacteriophage research—What we have learnt and what still needs to be addressed. *Research in microbiology*, 169(9), 481-487.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.05.002>
- Guttman, B., Raya, R., & Kutter, E. (2005). Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and applications*, Boca Raton: CRC Press
- Necel, A., Dydecka, A., Topka-Bielecka, G., Wesołowski, W., Lewandowska, N., Bloch, S., & Nejman-Faleńczyk, B. (2025). What, how, and why?—anti-EHEC phages and their application potential in medicine and food industry. *Journal of Applied Genetics*, 66(1), 219-240. <https://doi.org/10.1007/s13353-024-00918-4>
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T., Stanton, C. R., Rose, J., ... & Franks, A. E. (2019). Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens*, 8(3), 100. doi: 10.3390/pathogens8030100
- Strange, J. E., Leekitcharoenphon, P., Møller, F. D., & Aarestrup, F. M. (2021). Metagenomics analysis of bacteriophages and antimicrobial resistance from global urban sewage. *Scientific Reports*, 11(1), 1600.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-80990-6>
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: biology and applications*, Boca Raton: CRC Press
- Adhya, S., & Merril, C. (2006). The road to phage therapy. *Nature* 443, 754–755 (2006). <https://doi.org/10.1038/443754a>
- Fokine, A., & Rossmann, M. G. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 4(2), e28281.
<https://doi.org/10.4161/bact.28281>

O'Flaherty, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 801-819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00176.x>

Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4), 230. <https://doi.org/10.1128/br.31.4.230-314.1967>

Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4), 245-251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)

Leitner, L., Kessler, T. M., & Klumpp, J. (2020). Bacteriophages: a panacea in neuro-urology?. *European urology focus*, 6(3), 518-521. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.10.018>

Meaden, S., & Koskella, B. (2013). Exploring the risks of phage application in the environment. *Frontiers in microbiology*, 4, 358. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00358>

Ricci, V., & Piddock, L. J. (2010). Exploiting the role of TolC in pathogenicity: identification of a bacteriophage for eradication of *Salmonella* serovars from poultry. *Applied and environmental microbiology*, 76(5), 1704-1706. <https://doi.org/10.1128/AEM.02681-09>

Flores, C. O., Meyer, J. R., Valverde, S., Farr, L., & Weitz, J. S. (2011). Statistical structure of host-phage interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), E288-E297. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101595108>

Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., & Warriner, K. (2009). Evaluation of a biocontrol preparation consisting of *Enterobacter asburiae* JX1 and a lytic bacteriophage cocktail to suppress the growth of *Salmonella* Javiana associated

with tomatoes. *Journal of Food Protection*, 72(11), 2284-2292.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.11.2284>

Bertozi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS microbiology letters*, 363(4), fnw002.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>

Molineux, I. J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular microbiology*, 40(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02357>

Roos, W. H., Ivanovska, I. L., Evilevitch, A., & Wuite, G. J. L. (2007). Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and molecular life sciences*, 64(12), 1484.
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-6451-1>

Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophage λ and its relatives. *Modern Microbial Genetics*. New York: A John Wiley&Sons Publication

Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents*, 30(2), 118-128. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006>

Lacroix, C. (Ed.). (2010). *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Elsevier. United Kingdom: Woodhead Publishing Limited

Van Twest, R., Kropinski, A.M. (2009). Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. In: Clokie, M.R., Kropinski, A.M. (eds) *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology* (pp. 15-21). Ontario, Canada: Humana Press

- Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90-94. <https://doi.org/10.1071/MA11090>
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In *Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions*(pp. 69-76). Totowa, NJ: Humana Press
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/cmr.00066-18>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*, 70, 217-248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- 33- Khan Mirzaei, M., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS one*, 10(3), e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>
- Calendar, R. (Ed.). (2006). *The bacteriophages (Vol. 2)*. Oxford New York: Oxford University Press.
- Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. In *Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions*(pp. 81-85). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_9

Abedon, S. (2011). Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 77, pp. 1-40). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00001-7>

Ackerman, H. W., & DuBow, M. S. (1987). *Viruses of prokaryotes: general properties of bacteriophages*.

Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., ... & Scheres, J. (2018). Phage therapy: what have we learned?. *Viruses*, 10(6), 288. <https://doi.org/10.3390/v10060288>

Hyman, P. (2019). Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.3390/ph12010035>

Jurczak-Kurek, A., Gąsior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., ... & Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific reports*, 6(1), 34338. <https://doi.org/10.1038/srep34338>

BÖLÜM 2

Biyofilmlere Karşı Bakteriyofaj Temelli Yaklaşımlar

Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE¹

Giriş

Herhangi bir yüzeye tutunmuş mikrobiyal toplulukları tanımlamak amacıyla “biyofilm” terimi ilk kez 1978 yılında Bill Costerton tarafından kullanılmıştır (Costerton, Geesey, & Cheng, 1978: 86). Biyofilmler plastik, metal, cam, toprak partikülleri, ahşap, tıbbi implantlar, biyolojik dokular ve gıda ürünleri gibi çok çeşitli yüzeyler üzerinde oluşabilmektedir (Kokare & ark., 2009: 159). Biyofilm yapısı içerisinde çoğalan bakteriyel patojenler, birçok antibiyotiğin etkisine ve konakçının doğuştan gelen bağışıklık savunmalarına karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedir. Bununla birlikte, biyofilmlerin yol açtığı olumsuz etkilerin azaltılmasında etkili stratejilerin geliştirilmesine yönelik çabalar sürmekte olup, mikrobiyal biyofilmlerin ortadan kaldırılmasında uygun terapötik yaklaşımların tasarlanabilmesi için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Hançer Aydemir, 2018: 218). Bu kapsamların başında bakteriyofajlar yer almaktadır. Bakteriyofajlar hastalıklarının tedavisinde geçmişten bu yana kullanılmakta olup,

¹ Dr Öğr. Üyesi, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Orcid: 0000-0002-9842-3305

antibiyotik direncinin giderek artmasıyla birlikte biyofilmlerin kontrolünde alternatif veya tamamlayıcı bir yaklaşım olarak yeniden ilgi odağı hâline gelmiştir. Özellikle antibiyotiklere karşı toleranslı biyofilm yapılarının parçalanmasında, fajların bakteriye özgü enfeksiyon yetenekleri ve bazı fajların biyofilm matriksini hedefleyen enzimler üretme kapasiteleri yönünden önemli avantajlar sunmaktadır Chan, & Abedon, 2015: 85) (Donlan, 2009: 66) (Sillankorva, 2009).

Bakteriyofajların Keşfi ve Genel Özellikleri

Bakteriyofajlar, ilk olarak 1896 yılında İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin tarafından *Vibrio cholerae* üzerinde gözlemlenen antibakteriyel bir aktivite ile bildirilmiştir. Daha sonra, 1915'te Frederick Twort, bu antibakteriyel aktivitenin bir virüsten kaynaklanabileceğini öne sürerek konuyu yeniden gündeme taşımıştır. Twort, bu ajanın bakteriyel kolonilerin lizisine yol açarak saydam bir görünüm kazanmasına neden olduğunu belirtmiştir, ancak teknik sınırlamalar nedeniyle bu konu üzerinde daha fazla araştırma yapamamıştır. Fajlar 1917 yılında Félix d'Hérelle tarafından yeniden keşfedilmiş ve 1919 yılında dizanteri tedavisinde kullanılmıştır. D'Hérelle, bu antibakteriyel aktivitenin bakterileri parazitleyen bir virüsten kaynaklandığını öne sürmüş ve bu virüslere, bakteri ve faj kelimelerinin birleşiminden türetilen bakteriyofajlar adını vermiştir (Kutter, & Sulakvelidze, 2005: 91) (Ackermann, 2009). Faj döngülerinin keşfedildiği dönemlerde enfeksiyöz hastalıklarda bakteriofajların tedavi edici etkinliği kullanılırken, antibiyotiklerin keşfinden sonra fajlara olan ilgi azalmıştır (Kropinski, 2006: 297). Ancak, tüm dünyada antimikrobiyal maddelere direnç konusunun yoğun bir artış göstermesi fajlara olan ilgiyi yeniden arttırmaya başlamış ve son dönemlerde bakteriyofaj tedavisi ile çalışmalar hız kazanmıştır (Corbellino & ark., 2020: 1998) (Hahn & ark., 2023). Son 15 yıldır

faj tedavisi laboratuvarlarda ve hastanelerde geliştirilme aşamasındadır.

Fajlar bakterileri spesifik olarak öldürebilen ancak diğer organizma türlerini enfekte edemeyen, çoklu ilaca dirençli patojenlere (MDR) karşı etkili olabilen potansiyel antibakteriyel terapötik ajanlardır (Burrowes & ark., 2011: 775). Bakteriyofajlar Dünyada sayıları 10^{31} partikül ile en çok olan bulunan biyolojik varlıklar olarak kabul edilmektedir. Fajlar, 20–60 dakikalık kısa yaşam döngülerine sahip olup, genetik materyallerini bir protein kılıfı içinde taşırlar ve yalnızca DNA veya RNA içerirler. Genellikle bakterinin hücre yüzeyinde bir reseptöre bağlanarak, genetik materyalini hücrenin içine enjekte ederler ve proteinlerini sentezletirmek için konakçının hücre mekanizmalarını kullanırlar (O’Flaherty, Ross, & Coffey, 2009: 801). Fajların büyüklükleri 20-200 nm kadardır. Bakterilere kıyasla oldukça küçük olan etkenlerdir ve elektron mikroskopuyla görüntülenebilirler. Yaşamlarını devam ettirebilmeleri için spesifik bir konakçıya ihtiyaç duymaktadırlar. Tipik bir fajın morfolojik yapısında; içerisinde genetik materyalin bulunduğu baş (kapsid) kısmı, boyun ve konak hücresine tutunmayı sağlayan kuyruk liflerinden meydana gelmektedir. Fajlar genel olarak morfolojik özellikleri, nükleik asit türü zarf ya da lipidlerin varlığına göre ayrılmış ve RefSeg veritabanına göre Caudoviricetes sınıfı adı altında toplanmıştır (Ackermann, 2009) (Ackermann, 2011: 90). Keşiflerinden sonra, bakteriyofajların litik ve lizojenik olmak üzere iki tip hayat döngüsüne sahip oldukları belirtilmiştir. Morfolojik özellikleri bakımından farklılık gösterebilirler de %90’ı baş kısmında dsDNA genomu bulunduran litik fajlardır ve ikozahedral simetri gösterirler (Ackermann, 2009).

Biyofilm Yapısı ve Oluşum Mekanizması

Biyofilmler, mikroorganizmaların bir yüzeye tutunarak kendi sentezledikleri polimerik ve jelse bir matriks içerisinde organize

biçimde yaşamalarıyla oluşan mikrobiyal konsorsiyumlar olarak belirtilmektedirler (Leone & ark., 2006: 2456). Bu jelsi matriks, bakteri hücreleri tarafından üretilen ve literatürde hücre dışı polimerik yapı, ekzopolisakarit veya ekzopolimer (EPS) olarak adlandırılan polisakkarit ağırlıklı bir yapıdan oluşmaktadır (Fujishige & ark., 2006: 79). Alternatif bir tanıma göre ise biyofilm, bir yüzeye veya birbirlerine tutunmuş bakterilerin organik bir polimer matriksi içerisinde gömülü halde bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Poulsen, 1999: 321). Hücre dışı polimerik matriks, biyofilmlerin temel yapısal bileşenlerinden biridir. Polisakkaritler, proteinler, DNA ve sudan oluşan bu matriks, biyofilm oluşturan hücrelerin yüzeye tutunmasında kritik bir rol oynar. Matriksin başlıca işlevlerinden biri, UV radyasyonu, değişken pH koşulları, ozmotik stres, su kaybı ve antibiyotikler gibi çeşitli çevresel ve kimyasal etkenlere karşı bakteriyel hücrelere koruma sağlamaktır (Padera RF. 2006; Gün, & Ekinci, 2009). Olgun bir biyofilmin kütlesinin %75–90'ını EPS oluşturmaktadır (Padera, 2006). Biyofilm tabakaları çok çeşitli çevresel koşullar altında oluşabilmekle birlikte, en basit biyofilm yapısı dahi oldukça karmaşık bir dinamik sergilemektedir. Çeşitli çalışmalar, biyofilmlerin belirli noktalarda sırasıyla başlangıç, olgunlaşma, sürdürülme ve çözünme evrelerini içeren biyolojik dönüşüm süreçlerini tamamladığını göstermiştir (O'Toole & ark., 2000: 49). Yüzeye temas eden bakteriler önce yüzeye tutunmakta, ardından koloni oluşturarak daha ileri aşamada EPS matriksi içerisinde organize olmuş mikrobiyal topluluklar hâlinde biyofilm yapısını meydana getirmektedir (Gün, & Ekinci, 2009: 165). Biyofilm oluşumu, bakterilerin tutunduğu yüzeyin özelliklerine ve bu yüzeyde sonradan birikebilen organik veya inorganik maddelere bağlı olarak, bakterilerin varlık gösterebildiği herhangi bir sulu ortamda gerçekleşebilmektedir (Kumar, & Anand, 1998: 9). Yapılan güncel bir çalışmada, *Listeria monocytogenes* bakterilerinin, gıda kaynaklı veya klinik kaynaklı olmalarına bakılmaksızın yüzeyde biyofilm

oluşturmaya ve virölans genleri taşımaya devam ettikleri ortaya konulmuştur (Saytekin & ark., 2025).

Bakterilerin Yüzey Adezyonu ve Biyofilm Formasyonu

Mikroorganizmalar, gelişim süreçlerine bağlı olarak planktonik ve yerleşik formlar olmak üzere iki temel grupta değerlendirilmektedir. Planktonik hücreler, bireysel ve serbest yaşam tarzı sergilerken yerleşik hücreler belirli bir yüzeye tutunarak organize mikrobiyal topluluklar halinde fonksiyonlarını sürdürürler. Bakterilerin yüzeye tutunma süreci zamana bağlı bir olay olup, genellikle dönüşümlü ve dönüşümsüz adezyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir (Lindsay, & Von Holy, 2006: 313). Dönüşümlü tutunma basamağında bakteri hücresi yüzeyle tam bir temas halinde değildir, ancak hücre ile yüzey arasında uzun menzilli fizikokimyasal etkileşimler oluşmaktadır. Bu etkileşimler elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri gibi nispeten zayıf çekim veya itme kuvvetlerinden meydana gelir. Elektrostatik etkileşimler çoğunlukla itici niteliktedir. Dolayısıyla hem bakteriyel hücre yüzeyi hem de katı yüzeyler genellikle negatif yüklüdür (Poulsen, 1999: 321) (Costerton & ark., 1995). İlk adezyonun başlamasında hidrofobik etkileşimlerin belirgin bir rolü olduğu bildirilmektedir (Costerton & ark., 1995). Bu aşamadaki hücreler, durulama gibi basit mekanik işlemlerle kolaylıkla yüzeyden uzaklaştırılabilir. Dönüşümlü tutunma, yüzeye yaklaşan ve durgun halde bulunan hücreler arasındaki dinamik denge durumunun bir sonucu olarak gerçekleşmektedir (Lindsay, & Von Holy, 2006: 313). Dönüşümsüz tutunma aşamasında ise bakteri hücreleri ile yüzey arasında kısa menzilli ve daha güçlü etkileşimler meydana gelmektedir. Bu aşamada hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimleri, dipol-dipol etkileşimleri, iyonik ve kovalent bağlar ile hidrojen bağları gibi kuvvetler rol oynar. Mikroorganizmalar dönüşümlü tutunma sürecindeyken yüzey üzerinde yaşama ve çoğalma açısından yeterli besin ve uygun

çevresel koşulların varlığını değerlendirir. Uygun koşullar sağlandığında bakteriler flagella ve pilus gibi yüzey yapıları aracılığıyla, ayrıca EPS sentezleyerek yüzeylere geri dönüşümsüz biçimde bağlanabilmektedir.

Biyofilm oluşumunun son aşaması, yüzey kolonizasyonunun gerçekleştiği dönemdir. Bu aşamada yüzeye tutunan bakteriler çoğalarak bölünür ve eşzamanlı olarak EPS üretimi sürdürülür. Böylece ortamdaki planktonik hücrelerin matriks içine tutunması kolaylaşır. Bir bakteri hücresinin yüzeyde ilk koloniyi oluşturmasını takiben, aynı yüzeye diğer bakterilerin de yerleşmesiyle ikincil koloniler meydana gelir. Biyofilmin büyümesine paralel olarak, polimer matriks içerisinde kapsül benzeri yapılar oluşturan mikroorganizma sayısında da artış gözlenir. Biyofilm gelişim sürecinin kopma veya ayrılma evresinde, tek bir hücre ya da hücre kümeleri biyofilm yapısından ayrılarak ortama dağılabilir. Bu ayrılma olayı dış fiziksel kuvvetlerin etkisiyle gerçekleşebileceği gibi, biyofilm oluşum döngüsünün doğal bir parçası olarak tekil ya da çoklu hücrelerin aktif kopması şeklinde de ortaya çıkabilir (Poulsen, 1999: 321). Biyofilmin bu dinamik gelişim ve ayrılma süreçlerinin yanı sıra mikroorganizmalar, topluluk düzeyinde davranışlarını düzenleyen ek bir iletişim mekanizmasına da sahiptir. Birçok mikroorganizma, aktivitelerini yönetebilmek amacıyla birbirleriyle iletişim kurarken küçük ve yayılabilir sinyal moleküllerini kullanmaktadır. Biyofilm oluşumunda kritik öneme sahip olan ve Quorum Sensing olarak nitelendirilen bu mekanizma sayesinde bakteriler, sentezledikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu algılayabilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların popülasyon düzeyini değerlendirebilmekte ve bu bilgiyi topluluk içi düzenlemelerde kullanabilmektedir. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısının artmasıyla birlikte bu sinyal moleküllerinin lokal konsantrasyonu da yükselir. Sinyal yoğunluğundaki bu artış, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi

düzenleyici sürecin başlatılmasını tetikler. Bu bağlamda, biyofilm yapısı içindeki bakteriler, düşük moleköl ağırlıklı hücreler arası haberci moleküller aracılığıyla iletişim kurmakta ve topluluk davranışlarını yönetebilmektedir (Cámara, 2006: 42).

Biyofilm Kontrolünde Faj Kullanımının Avantajları ve Etkileri

Fajlar *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* ve *Salmonella* gibi çeşitli organizmaların neden olduğu farklı bulaşıcı hastalıkların tedavisinde uygulanmaktadır (Sulakvelidze & ark., 2001: 649). Enfeksiyonların tedavisinde fajların kullanılması, antimikrobiyal ajanların kullanımını azaltabilir ve böylece dirençli organizmaların yayılmasını sınırlandırabilir. Biyofilm kontrolü için fajların potansiyeline dair kanıtlar bulunmaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, antimikrobiyal ajanlara, dezenfektanlara ve biyosidlere karşı belirgin düzeyde tolerans sergilemektedir (Stewart, Mukherjee, & Ghannoum, 2004: 250). Bu nedenle, biofilmin azaltılması ya da tamamen ortadan kaldırılması genellikle yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal bileşiklerin uzun süreli uygulanmasını gerektirmektedir (Ceri & ark., 1999: 1771). Doolittle & ark. 1996: 331, T4 faj partiküllerinin biyofilm matriksi boyunca radyal yönde hareket edebildiğini ve bu hareketin, konak bakteriler üzerinde gözlenen plak oluşum sürecine benzer şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Bu bulgu, tek bir faj uygulamasının biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde potansiyel olarak etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Antimikrobiyal etkenlerin temel sınırlılıklarından biri, biyofilmin olgunlaşmasıyla birlikte, biyofilm içi hücrelerin inaktivasyonu veya eradikasyonu için giderek daha yüksek antimikrobiyal konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmasıdır (Anwar & ark., 1992: 1208). Buna karşın biyofilm olgunlaşma süresinin, *P. aeruginosa* biyofilmlerinin F116 fajına duyarlılığı üzerinde anlamlı

bir azaltıcı etki oluşturmadiğı bildirilmiştir (Hanlon & ark., 2001: 2746). Fajın, uygulama öncesinde 20 gün süreyle olgunlaştırılmış biyofilmler üzerinde dahi etkili olması, bu bulguyu desteklemektedir. Öte yandan, biyofilm EPS matrisinin difüzyon üzerindeki sınırlayıcı etkisi nedeniyle antimikrobiyal ajanların etkinliğini azaltabileceğı bilinmektedir (Stewart, Mukherjee, & Ghannoum, 2004: 250). Bunun aksine, faj partiküllerinin hem alginat jelleri hem de *P. aeruginosa* kaynaklı EPS yapıları içerisinde etkin biçimde difüze olabildiğı gösterilmiştir.

Fajlar, biyofilm EPS matrisini parçalama kapasitesine sahip olan polisakkarit depolimeraz enzimlerini sentezleyebilmektedir. İlk dönem çalışmaları, bazı *Klebsiella pneumoniae* fajlarının plak oluşumu sırasında enfekte bakteriler tarafından salınan bir enzim ürettiğini ortaya koymuştur. Bu depolimerazın bakteriyel kapsüler polisakkaridi hedef aldığı bildirilmiş olup elde edilen bulgular enzimin doğrudan faj partiküllerine bağlanarak kapsüler yapıyı parçaladığını ve böylece fajın kapsülü aşarak konak hücre yüzeyine ulaşmasını mümkün kıldığını göstermektedir (Adams, & Park, 1956: 719). Faj kaynaklı depolimerazların biyofilmler üzerinde etkili olabileceğini destekleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. *Enterobacter agglomerans* ve *Serratia marcescens* biyofilmlerinin faj SF153b ile tedavisi, biyofilm kütesinde belirgin bir azalmaya yol açmış, ayrıca faj dirençli *E. agglomerans* suşunun tedavisi de biyofilm seviyelerini düşürmüştür (Hughes, Sutherland, & Jones, 1998: 3039). Faj dirençli biyofilmler üzerindeki bu etkinin, faj tarafından üretilen depolimerazdan kaynaklandığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla faj içermeyen ancak yalnızca enzim bulunduran preparatın, söz konusu organizmanın biyofilmlerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, antimikrobiyal ajanlarla biyofilm kontrolünü güçleştiren başlıca engellerin, antimikrobiyal tolerans, hücre dışı matriksin koruyucu yapısı ve biyofilm yaşının etkisi gibi fajlar

tarafından belirli ölçüde aşılabildiğini ortaya koymaktadır (Donlan, 2009: 66).

Yapılan bir başka çalışmada Pbnavirüsün biyofilm kontrol etkinliğinin, kistik fibrozis hastasından izole edilen *P. aeruginosa* klinik suşu üzerinde deneysel evrim yaklaşımıyla artırılabilirliği gösterilmiştir. Uyarlanmış fajlarda gözlenen biyofilm öldürme kapasitesindeki artışın, yalnızca hedef suşun daha etkin tanınmasından değil, aynı zamanda bu suşun oluşturduğu heterojen biyofilm popülasyonunun daha etkili şekilde algılanmasından da kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yaklaşım, kistik fibrozis hastalarında ve olası diğer bakteriyel enfeksiyonlarda faj tedavisinin optimizasyonu için değerli bir strateji potansiyeli taşımaktadır. Bununla birlikte, elde edilen sonuçların kullanılan faj ve bakteri suşuna özgü olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, bu tür çalışmaların farklı suşlar ve farklı faj tipleri üzerinde genişletilmesinin de önem arz edeceği belirtilmektedir (Meneses & ark., 2025: 10219).

Bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden doğal viral ajanlardır. Bu nedenle antibiyotik direncinden etkilenmezler ve birçok antibiyotiğin aksine, biyofilm yapıları içerisinde bulunan bakterileri doğrudan hedef alabilirler (Sillankorva, 2009). Fajlar, bakteriyel genomla bütünleşerek konak hücreyle birlikte varlığını sürdürebilir (lizojenik fajlar) ya da konak hücreyi lizisle ortadan kaldırabilir (litik fajlar). Litik fajlar, konak bakteride çoğaldıktan sonra hücrenin parçalanmasını sağlayarak çevreye çok sayıda yeni faj partikülü salar ve böylece enfeksiyon döngüsünü devam ettirir. Biyofilm matrisinin düşük geçirgenlik göstermesi nedeniyle biyofilmlerin fajlara direnç sağladığı sıkça varsayılmıştır. Ancak kimyasal antibiyotiklerden çok daha büyük olmalarına rağmen faj partikülleri, konak bakterilerden belirgin şekilde küçüktür ve birçok faj türü biyofilm içindeki bakterileri enfekte edebilme kapasitesine sahiptir. Bakteriyofajların biyofilmlerdeki bakterilere etkisi, kimyasal

antibiyotikler veya biyositlerden farklı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Nitekim fajların, bakteriyel biyofilmlerle birlikte evrimleşmiş olmaları nedeniyle bu yapışkan mikrobiyal toplulukları enfekte etmelerinin doğal bir sonuç olduğu ileri sürülmektedir. Bu farklılığın temelinde en az dört ayrı mekanizmanın bulunduğu bildirilmektedir;

1. Bakteriyofajlar, konak hücreler içinde çoğalarak lokal bir amplifikasyon oluşturur. Bu çoğalma, biyofilm içine giderek artan sayıda bulaşıcı faj partikülü salınımına yol açar. Böylece biyofilm tabakaları içinde yayılan fajlar, EPS materyalini sentezleyen bakteri hücrelerini elimine ederek biyofilmin kademeli olarak parçalanmasına ve yenilenme kapasitesinin azalmasına neden olabilir.

2. Bazı bakteriyofajlar, biyofilm matriksinin ana bileşenlerini parçalayan depolimerize edici enzimleri taşır veya ekspresse edebilir. Bu enzimler, EPS tabakasını zayıflatarak fajların biyofilmin daha derin bölgelerine nüfuz etmesini kolaylaştırır.

3. Bakteriyofajlar ayrıca, konak bakterinin genomunda kodlanmış olan ve EPS'yi parçalayan enzimlerin ekspresyonunu indükleyebilir. Böylece faj enfeksiyonu, konak hücrenin kendi enzimatik kapasitesini biyofilmi zayıflatmak için kullanmasına yol açabilir.

4. Biyofilmlerde bulunan persister hücreler de bakteriyofajlar tarafından enfekte edilebilir. Fajlar bu inaktif hücrelerde çoğalamaz ve onları hemen öldüremez; ancak hücre yeniden metabolik olarak aktif hâle geldiğinde faj enfeksiyonu üretken faza geçerek persister hücrenin ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu mekanizma, biyofilmlerin antibiyotiklere karşı en dirençli alt popülasyonlarından birini hedef alma olanağı sunar.

Bakteriyofajlar, bakteriyel hedeflerinin sayısını çok fazla aştıklarında, çoğalma gereksiz konak hücrelerini öldürebilirler, bu süreç “dışarıdan lizis” olarak adlandırılır (Abedon, 2011: 46). Ancak bu denli yüksek faj yoğunluklarına doğal ortamlarda nadiren ulaşılır. Daha düşük faj yoğunluklarında ise klasik enfeksiyon döngüsü gerçekleşir. Fajlar konak hücrelere girerek çoğalır, ardından meydana gelen hücre lizisi sırasında yeni faj partikülleri serbest kalır ve çevredeki diğer bakterileri enfekte eder. Bu süreç, lokalize faj amplifikasyonuna yol açar ve konakçı bakterilerin yeterli yoğunlukta bulunduğu ortamlarda sürekli faj üretimi ve yayılmasını destekleyen kendi kendini sürdüren enfeksiyon bölgeleri oluşturabilir. Buna karşılık, konakçı popülasyonun düşük olduğu durumlarda bu döngü kesintiye uğrar ve enfeksiyon yayılımı sınırlanır. Biyofilmlerin ise yaygın olarak yüksek bakteri yoğunluğuna sahip yapılar olduğu düşünüldüğünde, fajların biyofilmlerdeki bakterileri etkili bir şekilde hedefleyebilmesi, bu zengin konak kaynağını kullanmaya yönelik evrimsel bir adaptasyon olduğunu göstermektedir. Bu süreçte fajlar, normal enfeksiyon döngüleri sırasında bakteriyel kapsüller polisakkaritlerle başa çıkabilmek için evrimleşmiş mekanizmalarını kullanırlar. Biyofilm içinde lizisin yayılma ve ilerlemeyi sağlayan temel unsur olduğu bu enfeksiyon biçimi aktif penetrasyon olarak tanımlanmıştır (Abedon, & Thomas-Abedon, 2010: 28).

Birçok bakteriyofaj genomunda, biyofilm matrisinin çeşitli bileşenlerini parçalayabilen enzimlere ait genlerin bulunduğu bilinmektedir (Sillankorva, 2009) (Leiman & ark., 2004: 419) (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265). Bu enzimlerin çoğu, konakçı hücreden salınmaları sırasında bakteriyel hücre duvarını hedefleyen çözünür hidrolitik enzimlerdir. Ancak, konakçı hücre lizisi esnasında salındıklarında, biyofilmin EPS maddesini parçalama kapasitesine de sahiptirler. Ayrıca lizise uğrayan bakteriyel hücreler biyofilm matrisine katkı sağlayabilen ekstraselüler DNA açığa çıkarırken,

aynı zamanda normal hücresel replikasyon süreçlerinin bir parçası olarak konakçı hücrelerde bulunan DNaz enzimlerini de serbest bırakabilirler. Bu durum hem matris yapısının zayıflatılması hem de biyofilmin bütünlüğünün bozulması açısından önemli bir etki yaratır. *Escherichia coli*'nin T4 ve HK620 bakteriyofajları gibi birçok bakteriyofaj, virüs partikülünün kuyruğunda yer alan ve bakteriyel hücre duvarının penetrasyonunu kolaylaştıran enzimler içerir. Bu enzimler teorik olarak biyofilm matriksinin bozulmasında rol oynayabilir, ancak enfeksiyon sürecinde kuyruk yapısı yeniden düzenlenene kadar genellikle maskelenmiş durumda bulunurlar ve bu nedenle etkileri oldukça lokalizedir (Leiman & ark., 2004: 419) (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265). Bu proteinlerin yapısal ve fonksiyonel gereksinimleri son derece hassastır. Çünkü hem virüsün yapısal bütünlüğüne uyum sağlamaları hem de bu yapı içerisinde işlev görmeleri gerekmektedir. Kuyrukta bu tür enzimlerin bulunması, bakteriyofaj enfeksiyonunun ortak bir özelliği olarak kabul edilmekte ve (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265). tarafından “kuyruklu bakteriyofaj enfeksiyonunun genel modeli” olarak tanımlanmaktadır. Bu modele göre, bakteriyofaj kuyruğunun bileşenleri kapsüler polisakkaritleri tanıyıp sindirerek kuyruğun hücre zarlarıyla temasını mümkün kılar ve bunu takiben bakteriyel genomun hücre içine enjeksiyonu gerçekleşir.

Polisakkarit depolimerazı kodlayan bakteriyofajların büyük çoğunluğu *Caudovirales* takımına ait olup, bu fajlarda polisakkarit depolimeraz proteinleri bakteriyofaj kuyruğunun yapısal ve fonksiyonel açıdan ortak bir bileşeni olarak yer almaktadır. Bu enzimlerin biyolojik aktivitesi, bakteriyofajların kapsüllü veya biyofilm oluşturan bakterileri enfekte etme yeteneği açısından kritik öneme sahiptir. Nitekim bakteriyofajların polisakkaritleri parçalama kapasitesi ilk kez 1929 yılında tanımlanmıştır. Bu kapasitenin en belirgin göstergelerinden biri, faj plaklarının çevresinde oluşan ve “halo” olarak adlandırılan dairesel saydam zonların varlığıdır.

Enfeksiyon süreci sırasında bakteriyofajlar hem enfeksiyonun ilerleyebilmesi hem de faj progenilerinin salınımı için gerekli olan serbest depolimeraz enzimlerini üretir. Bu enzimler kapsüler polisakkaritler üzerinde hidrolitik aktivite göstererek kapsül yapısının parçalanmasına yol açar. Plak çevresinde gözlenen halo oluşumu, bu hidrolitik aktivitenin fenotipik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Depolimerazların ortamda difüze olabilme özelliği ile faj partiküllerinin daha sınırlı hareketliliği arasındaki fark, fajın geride kalmasına karşın enzimlerin çevreye yayılması sonucunda karakteristik halo yapısının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kapsüler polisakkarit depolimerazlar, bakteriyofajlar tarafından kodlanan ve konak bakterinin yüzeyini saran kapsüler polisakkaritleri özgül olarak parçalayan enzimlerdir. Bu enzimler, fajın kapsül bariyerini aşarak hücre yüzey reseptörlerine ulaşmasını ve enfeksiyonu başlatmasını sağlar. Bunlar biyofilm matrisini zayıflatır, antibiyotik ve bağışıklık hücrelerinin erişimini artırır ve faj penetrasyonunu kolaylaştırır. Bakteriyofajlar tarafından kodlanan bu enzimler arasında bulunan endorhamnosidaz, bakteriyel dış zarın lipopolisakkarit yapısını spesifik olarak hidrolize eder. Bu tür bakteriyofajlar ağırlıklı olarak Gram negatif bakterileri enfekte etmektedir (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265). Aljinat liyaz, bakteriyofajlar tarafından üretilen aljinik asit polisakkarit depolimerazı, başlıca aljinat ve aljinat kapsüler polisakkarit polimerlerini parçalayan bir enzimdir. Bu enzim, β -eliminasyon reaksiyonu yoluyla patojenik bakteriler tarafından sentezlenen aljinat ve aljinat kapsüler polisakkarit yapılarındaki glikozidik bağları koparabilmektedir. Endosialidazlar, sialik asit içeren kapsüler polisakkaritleri içten parçalayan, çoğunlukla bakteriyofaj kaynaklı bakteriyel kapsülü hedef alan antibiyofilm özelliğe sahip özel enzimlerdir. Hiyaluronidazlar, konak bakterinin yüzeyinde veya çevresinde bulunan hiyaluronik asit içeren kapsül ve biyofilm bileşenlerini parçalayan depolimeraz enzimleridir. Bu enzimler, faj enfeksiyonunun erken evrelerinde reseptörlere erişimi

kolaylaştırarak fajın bakteri hücresine bağlanmasını ve genomunu enjekte etmesini sağlar. Endolysinler ise depolimerazlardan ziyade bakteriyofajların litik döngünün sonunda sentezlediği, konak bakterinin peptidoglikan tabakasını hedef alarak hücre lizisini sağlayan güçlü bakteriyolitik enzimlerdir.

Bakteriyel biyofilmlere karşı faj depolimeraz uygulamaları

Antibiyotik tedavisi, bakteriyel biyofilmlerin düşük geçirgenliği nedeniyle klinik uygulamalarda sıklıkla yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, biyofilmlerin neden olduğu antibiyotik direncinin aşılabilmesi amacıyla yukarıda bahsedilen faj depolimerazlarının kullanımı gibi alternatif yaklaşımlar araştırılmaktadır. Fajlar, bakterilerin doğal avcıları olmakla birlikte, tüm fajlar ekzopolisakkarit parçalayıcı aktiviteye sahip depolimeraz enzimlerini kodlamamaktadır (Guo & ark., 2023: 2273567). Depolimerazlar; *E. coli* K1 (Lin & ark., 2017: 2257) *E. coli* K20 (Nimmich & ark., 1991: 137), *K. pneumoniae* K22 (Domingo-Calap & ark., 2020: 425), *K. pneumoniae* K23 [Gorodnichev & ark., 2021: 669618], *K. pneumoniae* K64 (Eckstein & ark., 2021: 186), *Acinetobacter baumannii* K26 (Kasimova & ark., 2021: 182) ve *A. baumannii* K92 (Drobiazko & ark., 2022: 4971) gibi kapsüllü bakterileri enfekte eden bazı bakteriyofajlar tarafından kodlanmaktadır. Tek bir faj depolimerazının kullanımı biyofilmlerle mücadelede etkili olabilse de bakteriyel biyofilmlerin tamamen ortadan kaldırılabilmesi için birden fazla faj depolimerazından oluşan kokteyllerin uygulanması veya bu enzimlerin antibiyotiklerle kombine edilmesi gerekebilmektedir (Guo & ark., 2023: 2273567). Faj depolimerazlarının yapısal özellikleri, depolimeraz tipine bağlı olarak farklılık gösterebilmekle birlikte, genel olarak bu enzimlerin üçlü (trimerik) kristal yapı sergilediği bildirilmektedir (Squeglia & ark., 2020: 613) (Tu & ark., 2022: 9).

Sonuç

Bakteriyel biyofilmler, enfeksiyonların sürekliliğinde ve tedaviye direnç gelişiminde önemli rol oynayan yapılardır. Bakteriyofajlar, bakterilerle olan özgül etkileşimleri sayesinde biyofilm ilişkili enfeksiyonların kontrolünde alternatif bir biyolojik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Fajların doğrudan antibakteriyel etkilerinin yanı sıra, konak-patojen etkileşimlerini dolaylı olarak etkileme potansiyeli de dikkat çekmektedir. Literatürde bildirilen çalışmalar, fajların ve faj kökenli bazı proteinlerin biyofilm oluşumunu sınırlayabildiğini ve bakteriyel virülansı azaltabildiğini göstermektedir. Bu özellikleriyle faj temelli yaklaşımlar, klasik antimikrobiyal stratejilere tamamlayıcı bir seçenek sunmakta ve biyofilm ilişkili enfeksiyonların kontrolünde gelecek vadeden bir alan oluşturmaktadır.

Kaynaklar

Abedon, S.T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage*, 1, 46–49.

Abedon, S. T., & Thomas-Abedon, C. (2010). Phage therapy pharmacology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 28-47.

Ackermann, H. W. (2009). Phage classification and characterization. In *Bacteriophages: Methods and protocols*, volume 1: Isolation, characterization, and interactions (pp. 127-140). Totowa, NJ: Humana press.

Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90-94.

Adams, M. H., & Park, B. H. (1956). An enzyme produced by a phage-host cell system: II. The properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*, 2(6), 719-736.

Anwar, H., Strap, J. L., Chen, K., & Costerton, J. W. (1992). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(6), 1208-1214.

Aydemir, D. H. (2018). Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri. *Turkish Journal of Life Sciences*, 3(1), 218-230.

Brüssow, H., Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2005). Genomics and evolution of tailed phages. *Bacteriophages: Biology and Application*, 91-128.

Burrowes, B., Harper, D. R., Anderson, J., McConville, M., & Enright, M. C. (2011). Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(9), 775-785.

Cámara, M. (2006,). Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioral changes in bacterial populations. In *International Workshop on Membrane Computing* (pp. 42-48). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771-1776.

Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.

Corbellino, M., Kieffer, N., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., ... & Poirel, L. (2020). Eradication of a multidrug-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy

with a custom made, lytic bacteriophage preparation. *Clinical Infectious Diseases*, 70(9), 1998-2001.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms.

Domingo-Calap, P., Beamud, B., Vienne, J., González-Candelas, F., & Sanjuán, R. (2020). Isolation of four lytic phages infecting *Klebsiella pneumoniae* K22 clinical isolates from Spain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 425.

Donlan, R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*, 17(2), 66-72.

Doolittle, M. M., Cooney, J. J., & Caldwell, D. E. (1996). Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 16(6), 331-341.

Drobiazko, A. Y., Kasimova, A. A., Evseev, P. V., Shneider, M. M., Klimuk, E. I., Shashkov, A. S., ... & Popova, A. V. (2022). Capsule-targeting depolymerases derived from *Acinetobacter baumannii* prophage regions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4971.

Eckstein, S., Stender, J., Mzoughi, S., Vogele, K., Kühn, J., Friese, D., ... & Bugert, J. J. (2021). Isolation and characterization of lytic phage TUN1 specific for *Klebsiella pneumoniae* K64 clinical isolates from Tunisia. *BMC Microbiology*, 21(1), 186.

Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., & Hirsch, A. M. (2006). A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150(1), 79-88.

Gorodnichev, R. B., Volozhantsev, N. V., Krasilnikova, V. M., Bodoev, I. N., Kornienko, M. A., Kuptsov, N. S., ... & Shitikov, E. A. (2021). Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-specific bacteriophages from different families: similarity of depolymerases and their therapeutic potential. *Frontiers in Microbiology*, 12, 669618.

Guo, Z., Liu, M., & Zhang, D. (2023). Potential of phage depolymerase for the treatment of bacterial biofilms. *Virulence*, 14(1), 2273567.

Gün, İ., & Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.

Hahn, A., Sami, I., Chaney, H., Koumbourlis, A. C., Del Valle Mojica, C., Cochrane, C., ... & Koff, J. L. (2023). Bacteriophage therapy for pan-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in two persons with cystic fibrosis. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 11, 23247096231188243.

Hanlon, G. W., Denyer, S. P., Olliff, C. J., & Ibrahim, L. J. (2001). Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2746-2753.

Harper, D. R., Parracho, H. M., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., ... & Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270-284.

Hermoso, J. A., García, J. L., & García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), 461-472.

Hughes, K. A., Sutherland, I. W., & Jones, M. V. (1998). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-

borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144(11), 3039-3047.

Kasimova, A. A., Arbatsky, N. P., Timoshina, O. Y., Shneider, M. M., Shashkov, A. S., Chizhov, A. O., ... & Knirel, Y. A. (2021). The K26 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* KZ-1098: Structure and cleavage by a specific phage depolymerase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 182-191.

K. Chan, B., & T. Abedon, S. (2015). Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 85-99.

Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., & Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8(2), 159-168.

Kropinski, A. M. (2006). Phage Therapy--Everything Old Is New again. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 297-306.

Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 9-27.

Kutter E, Sulakvelidze A: Introduction. In Bacteriophages Biology and Applications. Edited by Kutter E, Sulakvelidze A. Boca Raton: CRC Press; 2005:1-4.

Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., & Rossmann, M. G. (2004). Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*, 118(4), 419-429.

Leone, S., Molinaro, A., Alfieri, F., Cafaro, V., Lanzetta, R., Di Donato, A., & Parrilli, M. (2006). The biofilm matrix of

Pseudomonas sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 341(14), 2456-2461.

Lin, H., Paff, M. L., Molineux, I. J., & Bull, J. J. (2017). Therapeutic application of phage capsule depolymerases against K1, K5, and K30 capsulated *E. coli* in mice. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2257.

Lindsay, D., & Von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.

Meneses, L., Valentová, L., Santos, S. B., Erdmann, J., Crabbé, A., Plevka, P., ... & Azeredo, J. (2025). Directed evolution of phages in biofilms enhances *Pseudomonas aeruginosa* control through improved lipopolysaccharide recognition. *Nature Communications*, 16(1), 10219.

Nimmich, W., Schmidt, G., & Krallmann-Wenzel, U. (1991). Two different *Escherichia coli* capsular polysaccharide depolymerases each associated with one of the coliphage ϕ K5 and ϕ K20. *FEMS Microbiology Letters*, 82(2), 137-141.

O'Flaherty, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 801-819.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

Padera, R. F. (2006). Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovascular Pathology*, 15(5), 264-270.

Poulsen, L. V. (1999). Microbial biofilm in food processing. *LWT-Food Science and Technology*, 32(6), 321-326.

Saytekin, A. M., Adıgüzel, A., Al-Kilani, K., Güllü Yüce-tepe, A., & Keskin, O. (2025). Some virulence genes and biofilm formation capabilities of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources. *Veterinary Journal of Ankara University/Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 72(1).

Sillankorva, S. (2009). Use of bacteriophages to control biofilms.

Squeglia, F., Maciejewska, B., Łatka, A., Ruggiero, A., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., & Berisio, R. (2020). Structural and functional studies of a *Klebsiella* phage capsule depolymerase tailspike: mechanistic insights into capsular degradation. *Structure*, 28(6), 613-624.

Stewart, P. S., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2004). Biofilm antimicrobial resistance. *Microbial Biofilms*, 250-268.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris Jr, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-659.

Tu, I. F., Lin, T. L., Yang, F. L., Lee, I. M., Tu, W. L., Liao, J. H., ... & Wu, S. H. (2022). Structural and biological insights into *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharide degradation by a bacteriophage K1 lyase: implications for clinical use. *Journal of Biomedical Science*, 29(1), 9.

Yan, J., Mao, J., & Xie, J. (2014). Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*, 28(3), 265-274.

BÖLÜM 3

Bakteriyofaj Kökenli Polisakkarit Depolimerazlar

Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE¹

Giriş

Bakteriyofajlar, bakterilerin doğal avcıları olan bakteriyel virüslerdir ve antibiyotiklerin keşfinden önce Doğu Avrupa ile eski Sovyetler Birliği'nde klinik amaçlarla kullanılmıştır. Antibiyotiklerin yaygın kullanıma girmesiyle geri planda kalan faj çalışmaları, son yıllarda Batı tıbbında yeniden artan bir ilgi odağı hâline gelmiştir (Myelnikov, 2018: 385). Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç hem tıp hem de veteriner hekimlik alanında giderek büyüyen önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle bakteriyel biyofilmler, antibiyotiklerin biyofilm iç tabakalarında bulunan hücrelere nüfuz etmesini engellemekle kalmamakta, aynı zamanda konakçı bağışıklık sisteminden kaçınmayı da kolaylaştırmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle biyofilm ilişkili enfeksiyonlar, mevcut tedavi seçenekleriyle kontrol altına alınması güç klinik tablolar oluşturmaktadır. Dolayısıyla, bakteriyel

¹ Dr Öğr. Üyesi, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Orcid: 0000-0002-9842-3305

biyofilmlere karşı yeni ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi acil bir gereksinim hâline gelmiştir. Bu noktada biyofilmlerle mücadelede umut vadeden stratejilerden biri, bakteriyel biyofilm matriksini hedef alarak hücrelere erişimi sağlayan faj depolimerazlarının kullanımıdır (Guo, Liu & Zhang, 2023: 2273567). Bu bağlamda, *Podoviridae* familyasına ait bakteriyofajların, virionun yapısal bileşenleri olarak sıklıkla polisakkarit depolimerazlar taşıdığı bilinmektedir. Bu enzimler genellikle kuyruk sivri uç proteinleri (tail spike proteins, TSP) şeklinde bulunur ve konak bakterinin kapsüler polisakkaritlerine (CPS), ekzopolisakkaritlerine (EPS) veya lipopolisakkaritlerine (LPS) özgül olarak bağlanır. Bağlanmanın ardından, polisakkarit tekrar birimleri seçici biçimde parçalanır, böylece faj, son bariyer olan hücre duvarına ulaşarak genomunu bakteri hücresine enjekte eder ve enfeksiyonu başlatır. Son yıllarda benzer depolimeraz enzimlerinin *Ackermannviridae*, *Myoviridae* ve *Siphoviridae* familyalarına ait bakteriyofajlarda da tanımlandığı bildirilmiştir (Knecht, Veljkovic & Fieseler, 2020: 2949).

Bakteriyofajların yalnızca canlı faj partikülleri olarak değil, aynı zamanda kodladıkları enzimler aracılığıyla da antimikrobiyal açıdan önemli potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Faj kaynaklı antimikrobialların saflaştırılması ve karakterizasyonu, konak özgüllüğü veya direnç gelişimi gibi nedenlerle fajın bütün hâliyle etkin olamadığı durumlarda alternatif faj temelli terapötiklerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Özellikle, bakteriyofajlar yerine faj kaynaklı enzimlerin kullanılması durumunda direnç gelişiminin belirgin şekilde azaldığı rapor edilmiştir (Oechslin, 2018: 351). Endolisinler (Gondil, & Chhibber, 2021: 675440), viron ilişkili lizinler (Oliveira, São-José, & Azeredo, 2018: 292), holinler (Roach, & Donovan, 2015: e1062590), spaninler (Kongari & ark., 2018: 326) ve bakteriyel polisakkarit depolimerazlar dahil olmak üzere birçok faj proteini sınıfı antibiyotik etki göstermiştir. Bu

enzimler arasında en kapsamlı şekilde araştırılmış olanlar, bakteriyel hücre duvarının peptidoglikan yapısını parçalayan endolizinlerdir (Tablo 1). Endolizinlerin bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde etkili olduğu gösterilmiş olup, bazıları hâlihazırda ticari ürünler olarak kullanılmaktadır (Gondil, & Chhibber, 2021: 675440) (Housby, & Mann, 2009: 536). Bununla birlikte, önemli bir terapötik potansiyele sahip bir diğer faj kaynaklı protein grubu ise polisakkarit depolimerazlardır (Lin & ark., 2018: 622). Bakteriyofaj polisakkarit depolimerazlarının büyük bir kısmı virion yüzeyiyle ilişkilidir ve çoğunlukla kuyruk lifleri veya diğer yapısal proteinlerin bir parçası olarak kodlanır. Bu enzimlerin, konak bakterinin CPS, EPS veya LPS yapıları üzerinde etki göstererek bu polimerik bileşenleri parçaladığı, böylece hücre yüzeyindeki faj reseptörlerini açığa çıkardığı ve faj enfeksiyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Şekil 1) (Rice ve ark., 2021: 2172). CPS, EPS ve LPS'nin biyofilm oluşumunda oynadığı kritik rol göz önünde bulundurulduğunda, depolimerazlar günümüzde biyofilm ilişkili enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi açısından yoğun biçimde araştırılmaktadır. Faj depolimerazlarının en önemli avantajlarından biri, etki mekanizmalarıdır. Litik olmayan bu enzimler, doğrudan bakteriyi öldürmekten ziyade antivirülans ajanları olarak işlev görmekte, enfeksiyonun şiddetini azaltmakta ve konağın bağışıklık sisteminin, patojeni elimine etmesini kolaylaştırmaktadır. Ancak bu umut verici özelliklerine rağmen, faj depolimerazlarının terapötik kullanımına yönelik çalışmalar şimdiye kadar, kapsüler polisakkaritlerin virülans açısından kritik rol oynadığı sınırlı sayıda bakteri türü üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bakteriler arasında özellikle *Klebsiella pneumoniae*, *Baumannia baumannii* ve *Escherichia coli* öne çıkmaktadır (Guo & ark., 2017: 1460) (Wu & ark., 2019: 2768) (Wang, & ark., 2020: 1407).

Tablo 1: Bakteriyofaj kaynaklı depolimeraz endolizin ve holinlerin yapısal ve fonksiyonel karşılaştırması

Özellik	Depolimeraz	Endolizin	Holin
Ait olduğu yapı	Fajın bir parçası	Neredeyse tüm fajlarda bulunur	Neredeyse tüm fajlarda bulunur
Etki yeri	Polisakkaritler	Peptidoglikan	Hücre zarı
Özgüllük	Dar spektrum: tek veya sınırlı sayıda bakteri türü	Dar spektrum: tek veya sınırlı sayıda bakteri türü	Geniş spektrum: Gram-pozitif, Gram-negatif veya her ikisi
Etki mekanizması	Bakteriyel biyofilmin polisakkarit yapısını parçalar	Bakteri hücre duvarının lizisi	Bakteri hücre zarında porlar oluşturur
Evrimsel süreç	Bakterilerle birlikte evrimleşir	Bakterilerle birlikte evrimleşir	Bakterilerle birlikte evrimleşir
Ekspresyon süreci	Kolay	Kolay	Zor
Bakterilerle etkileşim	Bakteriyostatik veya bakterisidal değil	Bakterisidal	Bakterisidal
Mikrobiyotaya etkisi	Yok	Yok	Var

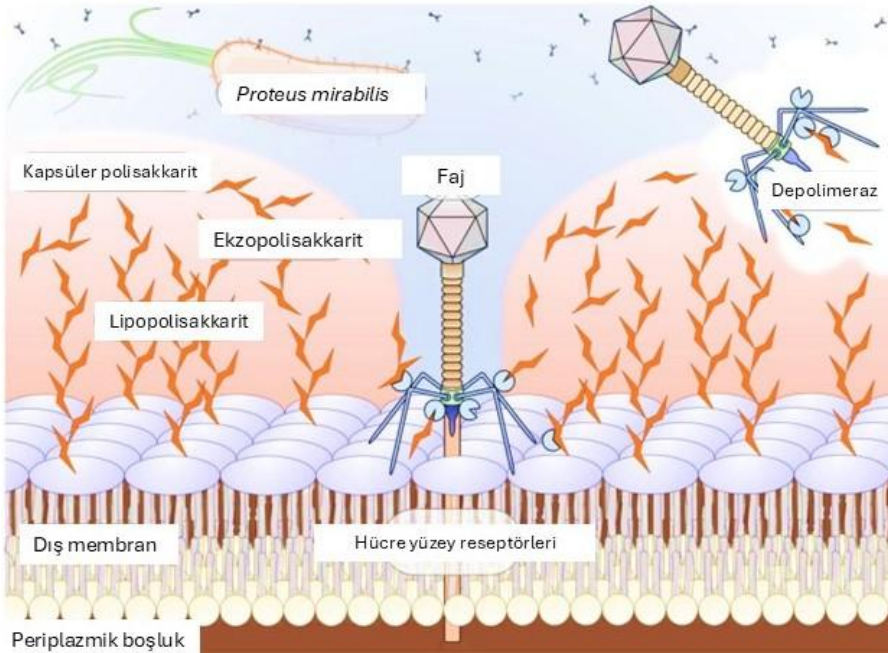
Kaynak: (Guo, Liu & Zhang, 2023: 2273567)

Depolimerazların Yapısal işlevleri

Faj tarafından kodlanan polisakkarit depolimerazların varlığına ilişkin karakteristik bir bulgu, ilk kez 1956 yılında tanımlanmış olup, inkübasyon süresi boyunca plak boyutu sabit kalmasına rağmen, plak çevresinde çapı giderek artan halo (halka) oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. CPS, EPS veya O-polisakkaritlerin parçalanmasından sorumlu olan bu depolimerazlar, ya virion

partikülünün ayrılmaz bir yapısal bileşeni olarak virionla ilişkili şekilde bulunmakta ya da çözünür formda faj partikülüne entegre olmaksızın, bakteriyel hücre lizisi sırasında ortama salınabilmektedir (Şekil 1) (Adams, & Park, 1956: 719) (Stirm & ark., 1971: 343). Her iki formdaki depolimeraz da ortamda serbestçe difüze olabilmekte ve zamanla polisakkaritlerin bozulmasına yol açarak plakların çevresinde tipik halka benzeri bir görünümün oluşmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, polisakkarit matriksin parçalanmasına rağmen, halo bölgesi içerisindeki bakteri hücreleri aktif olarak çoğalmadığından bu bölgede yeni faj enfeksiyonları meydana gelmemektedir (Latka & ark., 2017: 3103).

Şekil 1: Proteus bakteriyofajlarına ait polisakkarit depolimerazların potansiyel polimerik hedefleri



Kaynak: (Rice ve ark., 2021: 2172).

Depolimerazlar, bakteriyel kapsüllerin tanınmasını, bağlanmasını ve parçalanmasını kolaylaştıran, fajın adsorpsiyon aparatının yapısal bir bileşeni olarak görev yapmaktadır. Bu enzimlerin adlandırılması, hedef polisakkaritin tekrarlayan birimlerinin parçalanmasını ifade etmektedir. Biyokimyasal olarak, bakteriyofaj polisakkarit depolimerazları, etki mekanizmalarına göre glikozid hidrolazlar ve polisakkarit liyazları olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Hidrolazlardan farklı olarak liyazlar, substratlarını hidrolitik olmayan bir mekanizma ile parçalar. Diğer bir deyişle, reaksiyon sırasında su molekülü açığa çıkmaz. EPS veya LPS O-polisakkaritlerini hedef alan ve iyi karakterize edilmiş faj kodlu depolimerazların büyük bir kısmı liyaz sınıfına aittir (Tomlinson, & Taylor, 1985: 374) (Linnerborg & ark., 2001: 263) (Olszak & ark., 2017: 16302). Bu enzimler genellikle yüksek düzeyde substrat spesifikliğı sergilemekle birlikte, bazı durumlarda farklı polisakkarit türlerinde ortak olan belirli bir kesim bölgesinin varlığı, tek bir enzimin birden fazla substrat üzerinde etki göstermesine olanak tanıyabilmektedir. LPS'yi hedef alan bu enzimler çoğunlukla kuyruk sivri uç proteinleri (TSP) olarak adlandırılırken, kapsüler polisakkaritleri hedef alan enzimler genellikle depolimeraz terimiyle ifade edilmektedir. Bununla birlikte, depolimeraz terimi genel olarak polimerleri parçalama yeteneğine sahip tüm proteinleri kapsayacak şekilde kullanılabilir. Bu bağlamda, faj tarafından kodlanan endolizinler de bakteriyel peptidoglikanı hidrolaz aktivitesiyle parçaladıkları için fonksiyonel olarak birer depolimeraz olarak değerlendirilmektedir (Schumacher, & Loessner, 2016: 76).

Bakteriyofajlar, başlangıçta erişilemeyen bakteriyel hücre yüzeyi reseptörlerine ulaşabilmek amacıyla çeşitli virionla ilişkili karbonhidrat-aktif enzimler (polisakkarit depolimerazlar) geliştirmiştir (Leiman & ark., 2007: 836) (Leiman, & Molineux,

2008: 287) (Li & ark., 2016: 26455). Bu ikincil reseptörler (ko-reseptörler), bir dış membran proteini, hücre duvarına gömülü bir protein (yapısal proteinler, taşıyıcı kanallar, enzimatik ya da salgı proteinleri) ya da EPS'lerin distal bir bölgesi olabilmektedir (Nilsson, Malmborg, & Borrebaeck, 2000: 4229) Bertozzi Silva, Storms, & Sauvageau, 2016: fnw002). Bu reseptörlere bağlanma, sonuçta faj DNA'sının salınmasını tetikleyen kritik bir basamak olarak görev yapmaktadır (Leiman & Molineux, 2008: 287).

Faj genomunun bakteriyel sitoplazmaya aktarılabilmesi için, bakteriyofajların bir diğer önemli karbonhidrat bariyeri olan peptidoglikan (PG) tabakasını aşması gerekmektedir. Gram-pozitif bakterilerde PG tabakası 40 katmana kadar ulaşabilirken, Gram-negatif bakterilerde genellikle 1–3 katmanla sınırlıdır. Gram-negatif bakterilerin PG kemotipi (A1 γ) büyük ölçüde korunmuşken, Gram-pozitif bakterilerde peptit bileşimi, çapraz bağlanma derecesi ve glikan zinciri modifikasyonları açısından önemli farklılıklar bulunmaktadır (Briers & ark., 2007: 1334). Bu yapısal çeşitlilik nedeniyle faj partikülleri, virionla ilişkili lizinler ile donatılmıştır. Lizis aşamasında görev alan endolizinlerin aksine, virionla ilişkili lizinler PG'yi tamamen parçalamaz, yalnızca faj DNA'sının sitoplazmaya enjeksiyonu için yeterli olacak ölçüde lokal bir delik oluştururlar. PG, bakteriyel hücre için kaçınılmaz bir bariyer oluşturduğundan, virionla ilişkili lizinler her faj için temel bir gereklilik olarak kabul edilirken, polisakkarit depolimerazlar fajlara belirli ekolojik nişlerde rekabet avantajı sağlayan yardımcı araçlar sunmaktadır. Özellikle biyofilm ortamlarında bu enzimler, mikrokolonilere erişimi ve gömülü bakterilerin enfekte edilmesini mümkün kılmakta ve aynı zamanda konakçı spektrumunda farklılaşmaya katkıda bulunmaktadır (Abedon, 2012: 663). LPS parçalayan depolimerazlar üzerine yapılan çalışmalar, düşük enzim kinetiğinin ilk adsorpsiyon basamağından ziyade, salınan faj progenilerinin ayrılmasında önemli rol oynayan O-zincirinin

parçalanması ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Steinbacher & ark., 1996: 10584). LPS'yi reseptör olarak kullanan bakteriyofajlar, O-antijenik tekrar birimlerinin karbonhidrat bileşimi ve O-glikozidik bağların stereokimyası açısından sergilediği geniş kimyasal çeşitliliklerle karşı karşıyadır. Buna ek olarak, tekrar eden birimlerin sayısındaki değişkenlik ile asetilasyon veya glukosilasyon gibi ek modifikasyonların varlığıyla tanımlanan mikroheterojenite, LPS'nin ayırt edici özelliklerinden biridir (Steinbacher & ark., 1996: 10584) (Goldenberg & ark., 1982: 7864).

Polisakkarit depolimerazlar ve virionla ilişkili lizinler, faj-konak etkileşiminde süregelen bir silahlanma yarışı içinde evrimleşmiş olup, yapısal konumlarıyla uyumlu şekilde yüksek derecede özelleşmiş enzim özgüllüğü sergilemeleri bakımından ortak özellikler taşımaktadır. Bu faj kodlu virionla ilişkili enzimlere ilişkin çeşitli derleme çalışmalarında; genel özellikler ve biyomedikal uygulamalar (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek, & Maciejewska, 2015: 1757) (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265) ile özellikle virionla ilişkili peptidoglikan hidrolazlar (VAPGH'ler) (Rodríguez-Rubio & ark., 2013: 427) ele alınmıştır. Ayrıca kapsamlı bir *in silico* analiz temelinde, 24 farklı bakteri cinsini enfekte eden 143 fajda tanımlanan 160 potansiyel depolimerazın ayrıntılı bir özetini sunmuştur (Pires & ark., 2016: 2141).

Enzimatik özgüllükleri ve birincil amino asit dizilimleri büyük ölçüde farklılık göstermesine rağmen, karakterize edilmiş birçok polisakkarit depolimerazın, özgül bir katalitik cebi oluşturan uzun ve yüksek derecede iç içe geçmiş bir β -sarmal (β -heliks) domain içerdiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, bu β -sarmal yapının yalnızca katalitik işlevle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda zorlu çevresel koşullar altında proteinin yapısal stabilitesinin korunmasına önemli ölçüde katkı sağladığı bildirilmektedir (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265) (Majkowska-Skrobek & ark., 2016: 324). Depolimeraz aktivitesine sahip reseptör bağlanma proteinleri (RBP'ler), merkezi

bölgede yer alan enzimatik bir alan etrafında organize olmuş modüler bir yapıya sahiptir. RBP'nin C-terminal bölgesi, doğru katlanma ve trimerizasyonu destekleyen bir şaperon alanı veya konak hücre tanınmasıyla ilişkili ek bir domain içerebilir; bu alan olgunlaşma sürecinde sıklıkla otoproteolitik olarak uzaklaştırılır (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265) (Seul & ark., 2014: 1336) (Weigele & ark., 2003: 4022) (Schwarzer & ark., 2012: 10384). C-terminal şaperonun otokleavajı, endosialidazlar ile diğer kuyruk sivri uçları ve kuyruk liflerinde yaygın bir özellik olup, katlanma bariyerinin artırılması ve olgun trimerin kinetik olarak daha kararlı bir konformasyonda tutulması için gereklidir (Schwarzer & ark., 2007: 2821). RBP'nin N-terminalinde yer alan kubbe benzeri yapı, esnek bir bağlayıcı aracılığıyla proteini faj partikülüne bağlar. Bu modüler mimari, özellikle yatay gen transferi yoluyla hızlı evrimi mümkün kılarak konakçı aralığının değişmesine olanak tanır. Kuyruk aparatına bağlanmadan sorumlu yapısal alanları, filogenetik olarak ilişkili fajlar arasında yüksek derecede korunmuşken, konak hücre reseptörlerinin tanınması ve parçalanmasından sorumlu alanlar filogenetik sınırlar arasında yoğun bir genetik değişime maruz kalmaktadır. Buna ek olarak, ikincil RBP alanları, dikey gen aktarımı ve mutasyon birikimi yoluyla sürekli olarak modifiye edilmekte ve böylece konakçı özgüllüğünün ince ayarını sağlamaktadır (Schwarzer & ark., 2012: 10384) (Barbirz & ark., 2008: 303) (Leiman, & Molineux, 2008: 287) (Latka & ark., 2017: 3103).

Polisakkarit Depolimerazların Enzimatik Aktivitesi ve Katalitik Mekanizmaları

Bakteriyofajlar tarafından kodlanan polisakkarit depolimerazlar, etki mekanizmalarına göre iki ana sınıfa ayrılmaktadır: hidrolazlar (EC 3) ve liyazlar (EC 4). Her iki enzim grubu da bakteriyel polisakkaritleri çözünür oligosakkaritlere parçalayarak karbonhidrat bariyerinin yıkılmasına katkıda bulunur. CPS, EPS ve O-polisakkaritlerin yüksek yapısal çeşitliliği nedeniyle,

bu enzimler son derece yüksek substrat özgüllüğü sergiler. Bu durum çoğu zaman fajların dar konakçı spektrumuna sahip olmasına yol açar. Hidrolazlar çoğunlukla O-glikozil hidrolazlar (EC 3.2.1) sınıfında yer almakta olup, polisakkaritlerin O-glikozidik bağlarını bir su molekülü kullanarak spesifik şekilde hidrolize ederler. Bu gruba sialidazlar, ramnozidazlar, levanazlar, ksilanazlar ve dekstranazlar dâhildir (Davies & Henrissat, 1995: 853) (Pires & ark., 2016: 2141). Depolimerazlar arasında en iyi karakterize edilen enzimler, *Escherichia coli* K1 kapsülüne özgü bakteriyofajlardan (CUS-3, 63D, K1A, K1E, K1F, K1-5, Φ1.2 ve Φ92) izole edilen sialidazlar (endo-N-asetilnöraminidazlar)'dır. Bu enzimler, kapsüler polisialik asit zincirindeki iç α -2,8 bağlarını hidrolize eder. Endosialidazlar, sialik asit içeren kapsüler polisakkaritleri içten parçalayan, çoğunlukla bakteriyofaj kaynaklı bakteriyel kapsülü hedef alan antibiyofilm özelliğe sahip özel enzimlerdir. Endosialidaz alanlarına sahip proteinler ayrıca *Klebsiella* fajları KLPN1 ve 0507-KN2-1'de de tanımlanmıştır (Hsu & ark., 2013: e70092) (Hoyle & ark., 2015: e1061). Ramnozidazlar, *Salmonella* lipopolisakkaritinin O-antijeninde bulunan L-ramnoz ile D-galaktoz arasındaki α -1,3 O-glikozidik bağı parçalayabilen enzimlerdir. Bu enzimler, bazı *Salmonella*'ya özgü fajlarda ve *Shigella*'ya özgü faj Sf6'da TSP olarak tanımlanmıştır (Chua & ark., 1999: 1649) (Walter & ark., 2008: 2265) (Guichard & ark., 2013: 152). Buna ek olarak, *E. coli* LPS'yi hedef alan depolimerazlar, HK620 ve Omega8 fajlarında sırasıyla endo-N-asetilglukozaminidaz ve endo- α -1,3-mannosidaz olarak tanımlanmıştır (Prehm, & Jann, 1976: 940) (Barbirz & ark., 2008: 303).

Bacillus biyofilmlerinde bulunan levanın fruktoz monomerleri arasındaki β -2,6 bağlarının hidrolizini katalize eden bir levanaz, *Bacillus* fajı SP10'da tanımlanmıştır. Benzer şekilde, *Caulobacter* fajı Cr30'da ksilan içerisindeki β -1,4 glikozidik bağların hidrolizinden sorumlu bir ksilanaz belirlenmiş;

dekstrandaki glikoz birimleri arasındaki α -1,6 bağlarını parçalayan bir dekstranazın ise *Lactobacillus* fajı Φ PYB5'te bulunduğu öne sürülmüştür (Pires & ark., 2016: 2141). Bununla birlikte, bazı virionla ilişkili depolimerazlar klasik anlamda polisakkaritleri depolimerize etmez; bunun yerine, bakteri kapsüllerinin yapısal çeşitliliğine yanıt olarak polipeptitleri (EC 3.4) veya lipitleri (EC 3.1) hedef alabilir. Bu kapsamda, *Bacillus* türlerine ait poli- γ -glutamat kapsüller polipeptidi parçalayan bir peptidaz enziminin *Bacillus* fajı Φ NIT1 tarafından kodlandığı deneysel olarak doğrulanmıştır (Kimura, & Itoh, 2003: 2491). Hidrolitik aktiviteye sahip virionla ilişkili depolimerazların bir diğer grubunu ise, polisakkarit zincirini parçalamak yerine O-antijenin deasetilasyonunu gerçekleştiren Vi fajlarının (Tip II ve III) kuyruk dikenlerindeki LPS deasetilazlar ile *Salmonella anatum* fajı c341'de tanımlanan enzimler oluşturmaktadır (Iwashita & Kanegasaki, 1976: 5361).

Diğer polisakkarit depolimerazlar, glikozidik bağları su molekülü kullanmadan, β -eliminasyon mekanizmasıyla eş zamanlı olarak yeni bir çift bağ oluşturarak parçalayan liyazlar (EC 4) sınıfına aittir ve bu yönleriyle hidrolazlardan ayrılır. Bu grup, yaygın olarak bulunan hiyalüronat, pektat/pektin ve aljinat liyazlarını ile kapsüller polisakkarit K5'e özgü liyazları kapsamaktadır (Sutherland, 1995: 323). Hiyaluronidazlar, konak bakterinin yüzeyinde veya çevresinde bulunan hiyaluronik asit içeren kapsül ve biyofilm bileşenlerini parçalayan depolimeraz enzimleridir. Bu enzimler, faj enfeksiyonunun erken evrelerinde reseptörlere erişimi kolaylaştırarak fajın bakteri hücresine bağlanmasını ve genomunu enjekte etmesini sağlar (Yan, Mao, & Xie, 2014: 265). Bakteriyofaj tarafından kodlanan hiyaluronidazlar, hiyalüronik asidin alt birimleri arasındaki β -1,4 glikozidik bağların parçalanmasından sorumludur ve hiyalüronik asit kapsülü taşıyan *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus equi*'yi enfekte eden profajlarda tanımlanmıştır

(Martinez-Fleites & ark., 2009: 963) (Lindsay & ark., 2009: 443). Bu enzimlerin, lizojenik konak bakteriler tarafından insan dokularının invazyonu ve penetrasyonunda virülans faktörü olarak da kullanılabildiği bildirilmektedir. Pektat ve pektin liyazlar ise poligalakturnik asitteki α -1,4 bağlarının parçalanmasıyla karakterizedir. Bu tip enzimler, bazı *Pseudomonas* fajları (AF) (Cornelissen & ark., 2012: 251), *Klebsiella* fajları (Lin & ark., 2014: 1734), *Vibrio* fajı JA1 (Linnerborg & ark., 2001: 263) ve *Staphylococcus* fajı vB_SepiS- Φ IPLA7'de tanımlanmıştır (Gutiérrez & ark., 2015: 1315).

Aljinat liyaz, bakteriyofajlar tarafından üretilen alginik asit polisakkarit depolimerazı, başlıca aljinat ve aljinat kapsüler polisakkarit polimerlerini parçalayan bir enzimdir. Bu enzim, β -eliminasyon reaksiyonu yoluyla patojenik bakteriler tarafından sentezlenen aljinat ve aljinat kapsüler polisakkarit yapılarındaki glikozidik bağları koparabilmektedir. *Pseudomonas* ve *Azotobacter* fajları için karakteristik olan aljinat liyazlar (mannuronat veya guluronat liyazlar), kistik fibrozis hastalarını enfekte eden mukoid suşlarda yaygın olarak bulunan ve doğrusal bir β -D-mannuronat polisakkariti olan aljinatın α -1,4 glikozidik bağlarını ve bunun C5 epimeri olan α -L-guluronat içeren bölgelerini parçalayabilmektedir (Wong & ark., 2000: 289) (Glonti, Chanishvili, & Taylor, 2010: 695). Öte yandan, *E. coli* K5 kapsüler polisakkariti olan poli (β -1,4-GlcA- α -1,4-GlcNAc), her ikisi de α -1,4 bağları üzerinde etkili spesifik bir liyaz sentezleyen kapsüle özgü bakteriyofajlar K5A ve K1-5 için reseptör görevi görmektedir (Clarke, Esumeh, & Roberts, 2000: 3761) (Thompson & ark., 2010: 23963).

Depolimeraz Aktivitesinin Belirlenmesine Yönelik Analiz Yöntemleri

Depolimerizasyon aktivitesinin belirlenmesi CPS, EPS veya biyofilm matrisi bileşenlerinin LPS ayrılmasındaki teknik güçlükler

nedeniyle özellikle zordur ve bu durum polisakkarit bozunmasının analizini önemli ölçüde karmaşıktırmaktadır. Bu nedenle, günümüze kadar depolimeraz aktivitesinin saptanmasına yönelik kullanılan yöntemler oldukça çeşitlilik göstermektedir. Genel olarak bu yaklaşımlar, polisakkarit yapısı ve bileşiminden bağımsız olarak uygulanabilen ya da belirli substratlara özgü olan biyolojik, biyokimyasal ve fiziksel yöntemler şeklinde sınıflandırılabilir (Latka & ark., 2017: 3103). Depolimeraz varlığının belirlenmesinde kullanılan başlıca biyolojik yöntemlerden biri, bakteri tabakaları üzerine faj veya enzim lekelerinin uygulanması ve bunun sonucunda oluşan karakteristik bulanık halo bölgelerinin gözlemlenmesine dayanmaktadır (Cornelissen & ark., 2011: e18597). Spektrofotometrik yöntemler, depolimeraz aktivitesinin nicel olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Biyofilm matrisinin parçalanma düzeyinin belirlenmesinde, biyofilm biyokütlesinin kolorimetrik ölçümü amacıyla yaygın olarak kristal viyole veya dimetil metilen mavisi boyaları kullanılmaktadır (Cornelissen & ark., 2011: e18597) (Tote & ark., 2008: 249). İndirgeyici şekerlerin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ise EPS ve CPS'nin enzimatik sindiriminin doğrudan belirlenmesine imkân sağlamaktadır (Hsu & ark., 2013: e70092). Bunun yanı sıra, sakkaritlerin periodat oksidasyonunun incelenmesi amacıyla sodyum periodat tüketiminin ve açığa çıkan formik asit miktarının tayini (Kwiatkowski & ark., 1983: 367), setilpiridinyum klorür kompleksleri ile çöktürülen çözünmeyen EPS'nin bulanıklığındaki azalmanın değerlendirilmesi (Majkowska-Skrobek & ark., 2016: 324) ve üronik asit salınımının ölçümü (Glonti, Chanishvili, & Taylor, 2010: 695) depolimeraz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan diğer tamamlayıcı yöntemler arasında yer almaktadır.

Polimerden salınan şekerlerin kaba fraksiyonlanması ve analizi, ince tabaka kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Glonti, Chanishvili, & Taylor, 2010: 695).

Bunun yanı sıra, fajların EPS matrisi içerisindeki difüzyon hızını belirlemek ve depolimerizasyon sonrası işlenmiş polisakkaritlerin viskozitesindeki azalmayı değerlendirmek amacıyla aljinat jellerinin reolojik analizleri yapılmıştır (Glonti, Chanishvili, & Taylor, 2010: 695). Depolimeraz aktivitesinin incelenmesinde çeşitli elektroforetik yöntemler de uygulanmıştır. Sindirilmemiş ve sindirilmiş polisakkaritler, alsiya mavisi, gümüş veya metilen mavisi ile boyanmış poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak karşılaştırılabilmektedir (Clarke, Esumeh, & Roberts, 2000: 3761) (Barbirz & ark., 2008: 303) (Majkowska-Skrobek & ark., 2016: 324). Buna ek olarak, florofor destekli karbonhidrat elektroforezi (Chua & ark., 1999: 1649) ve kapiller elektroforez (Baker, Dong, & Pritchard, 2002: 317) depolimerizasyon ürünlerinin analizinde kullanılan diğer elektroforetik yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Ayrıca, biyofilm yapısındaki değişikliklerin ve kalınlığının değerlendirilmesinde konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) (Peduzzi & ark., 2013: 5411), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi görüntüleme tekniklerinden yararlanılmaktadır (Obořilová & ark., 2021: 13538). Biyofilm matrisinin bozulmasını yüksek duyarlılıkla izleyebilen daha ileri bir yöntem ise, biyofilm tabakası boyunca küçük moleküllerin difüzyon hızını belirlemeye dayanan lazer interferometrisi olup, bu teknik son yıllarda başarılı biçimde uygulanmıştır (Sausset & ark., 2023: e75).

Faj Depolimerazlarının Antibakteriyel ve Terapötik Potansiyeli

Fajların bakteriyel antagonistler olarak kullanımı, mikroorganizma aracılı bir biyolojik kontrol stratejisi olarak tanımlanabilir (Harper, 2006: 1). Daha geniş bir çerçevede biyolojik kontrol, yalnızca istenmeyen organizmalara karşı antagonist olarak bütün organizmaların kullanımını değil, aynı zamanda bu organizmalar tarafından üretilen biyolojik ürünlerin antagonist ajanlar olarak uygulanmasını da kapsar. Bu bağlamda, geleneksel

olarak mikroorganizmaların doğal ürünleri olarak kabul edilen antibiyotikler de biyolojik kontrol ajanları olarak değerlendirilebilir. Benzer şekilde, endolizinler ve EPS depolimerazlar da faj kökenli biyolojik ürünler olarak biyolojik kontrol kapsamında ele alınmaktadır (Abedon, 2009: 807).

Prensip olarak, biyofilmler, ek antibakteriyel ajanların uygulanmasına gerek duyulmaksızın, yalnızca EPS depolimerazların etkisiyle yüzeylerden uzaklaştırılabilmektedir (Sutherland & ark., 2004: 1). Ayrıca, bu enzimlerin etkisi mutlaka bir biyofilm bağlamıyla sınırlı olmayıp, bakterilerin hastalık oluşturma potansiyelini de azaltabilmektedir. Bu doğrultuda Mushtaq & ark., (2004), saflaştırılmış halde uygulanan faj kökenli kapsül parçalayıcı bir EPS depolimerazın, muhtemelen dolaşımdaki bakterileri konak bağışıklık sistemine daha duyarlı hâle getirerek, sıçan modelinde sistemik *E. coli* enfeksiyonlarının iyileştirilmesine katkı sağladığını göstermiştir. Wasch & ark., (2010) endoglikozidaz aktivitesine sahip bakteriyofaj P22'nin kuyruk diken proteininin tavuklarda *Salmonella* kolonizasyonunu ve enfeksiyonunu önleyebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, yazarlar gözlenen bu koruyucu etkinin, EPS'nin enzimatik bozunmasından ziyade, söz konusu proteinin bakteriyel yüzeye bağlanması sonucunda bakteriyel hareketliliğin azalmasıyla ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.

Yapılan başka bir çalışmada, *A. baumannii* ϕ AB6 fajından elde edilen TSP'nin, kateter yüzeylerinde konakçı hücre kolonizasyonunu belirgin biçimde engellediği bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, *A. baumannii* 54149 suşu ile enfekte edilen zebra balığı modelinde TSP'nin terapötik etkinliğini değerlendirmiş ve TSP uygulanan gruptaki zebra balıklarının hayatta kalma oranının (%80), fosfat tamponlu salin uygulanan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir. Dp49, *A. baumannii* fajı vB_AbaM_IME285'ten

tanımlanan başka bir kapsül depolimerazdır. Dp49'un depolimeraz aktivitesine ilişkin pozitiflik, 49 *A. baumannii* klinik izolatından 25'inde bulunmuştur (Wang & ark., 2020: 1407). *K. pneumoniae* fajı P560 tarafından kodlanan depolimeraz P560dep'in biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. İntraperitoneal yolla uygulanan 50 µg P560dep dozunun, KL47 karbapenem-dirençli *K. pneumoniae* ile enfekte edilen farelerin %90–100'ünü ölümden koruduğu bildirilmiştir. Her ne kadar depolimeraz doğrudan bakterisidal bir etki göstermese de yazarlar bu enzimi bulaşıcı hastalıklarla mücadelede çekici ve umut vadeden bir terapötik ajan olarak değerlendirmiştir (Li & ark., 2022: 538). Faj depolimerazlarının, Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) enfeksiyonlarının tedavisinde de potansiyel olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu kapsamda, STEC HB10 O91 suşunu enfekte eden bakteriyofaj PHB19 izole edilmiş, tüm genomu bir faj çalışma grubu tarafından dizilenmiş ve analiz edilmiştir. Araştırmacılar (Chen & ark., 2020: e00145), PHB19'un TSP'den türeyen yeni bir faj depolimerazı olan Dep6'yı tanımlamıştır. İn vitro çalışmalar, Dep6'nın STEC biyofilmlerini etkin bir şekilde ortadan kaldırdığını ve konak bakterilerin serum aracılı öldürmeye karşı duyarlılığını artırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, Dep6'nın insan eritrositleri, akciğer karsinomu hücreleri ve embriyonik böbrek hücreleri üzerinde hem in vitro hem de in vivo koşullarda herhangi bir toksik etki göstermediği bildirilmiştir.

Sonuç

Bakteriyofaj kaynaklı polisakkarit depolimerazlar, bakteriyel kapsül, biyofilm matriksi ve yüzey polisakkaritlerini hedef alarak enfeksiyon patogeneğinde önemli rol üstlenebilen özgün enzimlerdir. Yapısal özellikleri, yüksek substrat özgülükleri ve litik olmayan etki mekanizmaları sayesinde bu enzimler, doğrudan bakterisidal ajanlar olmaktan ziyade antivirülans özellikleri bakımından etkili bileşenler olarak öne çıkmaktadır. Mevcut

çalışmalar, faj depolimerazlarının biyofilm ilişkili enfeksiyonların kontrolünde, konak bağışıklık yanıtının güçlendirilmesinde ve antibiyotiklere veya diğer antimikrobiyal yaklaşımlara duyarlılığın artırılmasında önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya konulmaktadır. Bununla birlikte, terapötik uygulamaya geçiş sürecinde enzim stabilitesi, bağışıklık yanıtı, farmakokinetik özellikler ve hedef bakteri çeşitliliği gibi faktörlerin kapsamlı biçimde değerlendirilmesi gerekmektedir. Gelecekte yapılacak yapısal, fonksiyonel ve translasyonel çalışmaların, faj depolimerazlarının klinik ve veteriner hekimlikte yenilikçi ve tamamlayıcı antimikrobiyal ajanlar olarak kullanımının önünü açacağı öngörülmektedir.

Kaynaklar

Abedon, S. T. (2009). Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 807-815.

Abedon, S. T. (2012). Spatial vulnerability: bacterial arrangements, microcolonies, and biofilms as responses to low rather than high phage densities. *Viruses*, 4(5), 663-687.

Adams, M. H., & Park, B. H. (1956). An enzyme produced by a phage-host cell system: II. The properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*, 2(6), 719-736.

Baker, J. R., Dong, S., & Pritchard, D. G. (2002). The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Biochemical Journal*, 365(1), 317-322.

Barbirz, S., Müller, J. J., Uetrecht, C., Clark, A. J., Heinemann, U., & Seckler, R. (2008). Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike

endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Molecular Microbiology*, 69(2), 303-316.

Bertozi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), fnw002.

Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., & Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ϕ KZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1334-1344.

Chen, Y., Li, X., Wang, S., Guan, L., Li, X., Hu, D., ... & Qian, P. (2020). A novel tail-associated O91-specific polysaccharide depolymerase from a podophage reveals lytic efficacy of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(9), e00145-20.

Chua, J. E., Manning, P. A., & Morona, R. (1999). The *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6 tailspike protein (TSP)/endorhamnosidase is related to the bacteriophage P22 TSP and has a motif common to exo- and endoglycanases, and C-5 epimerases. *Microbiology*, 145(7), 1649-1659.

Clarke, B. R., Esumeh, F., & Roberts, I. S. (2000). Cloning, expression, and purification of the K5 capsular polysaccharide lyase (KflA) from coliphage K5A: evidence for two distinct K5 lyase enzymes. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3761-3766.

Cornelissen, A., Ceyssens, P. J., Krylov, V. N., Noben, J. P., Volckaert, G., & Lavigne, R. (2012). Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF. *Virology*, 434(2), 251-256.

Cornelissen, A., Ceyssens, P. J., T'syen, J., Van Praet, H., Noben, J. P., Shaburova, O. V., ... & Lavigne, R. (2011). The T7-related *Pseudomonas putida* phage ϕ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PloS One*, 6(4), e18597.

Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859.

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., & Maciejewska, B. (2015). Bacteriophages and phage-derived proteins—application approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 22(14), 1757-1773.

Glonti, T., Chanishvili, N., & Taylor, P. W. (2010). Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 695-702.

Goldenberg, D. P., Berget, P. B., & King, J. (1982). Maturation of the tail spike endorhamnosidase of *Salmonella* phage P22. *Journal of Biological Chemistry*, 257(13), 7864-7871.

Gondil, V. S., & Chhibber, S. (2021). Bacteriophage and endolysin encapsulation systems: a promising strategy to improve therapeutic outcomes. *Frontiers in pharmacology*, 12, 675440.

Guichard, J. A., Middleton, P. C., & McConnell, M. R. (2013). Genetic analysis of structural proteins in the adsorption apparatus of bacteriophage epsilon 15. *World Journal of Virology*, 2(4), 152.

Guo, Z., Huang, J., Yan, G., Lei, L., Wang, S., Yu, L., ... & Yang, J. (2017). Identification and characterization of Dpo42, a novel depolymerase derived from the *Escherichia coli* phage ν B_EcoM_ECOO78. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1460.

Guo, Z., Liu, M., & Zhang, D. (2023). Potential of phage depolymerase for the treatment of bacterial biofilms. *Virulence*, 14(1), 2273567.

Gutiérrez, D., Briers, Y., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., & García, P. (2015). Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB_SepiS-phiIPLA7 as an anti-biofilm agent in staphylococcal species. *Frontiers in microbiology*, 6, 1315.

Harper, D.R. Biological control by microorganisms, The Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, West Sussex, England, UK, John Wiley & Sons 2006; 1-10.

Housby, J. N., & Mann, N. H. (2009). Phage therapy. *Drug Ddiscovery Today*, 14(11-12), 536-540.

Hoyles, L., Murphy, J., Neve, H., Heller, K. J., Turton, J. F., Mahony, J., ... & van Sinderen, D. (2015). Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae–bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman. *PeerJ*, 3, e1061.

Hsu, C. R., Lin, T. L., Pan, Y. J., Hsieh, P. F., & Wang, J. T. (2013). Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of Klebsiella pneumoniae and characterization of its polysaccharide depolymerase. *PloS One*, 8(8), e70092.

Iwashita, S. H. I. N. T. A. R. O., & Kanegasaki, S. (1976). Deacetylation reaction catalyzed by Salmonella phage c341 and its baseplate parts. *Journal of Biological Chemistry*, 251(17), 5361-5365.

Kimura, K., & Itoh, Y. (2003). Characterization of poly- γ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of Bacillus subtilis encapsulated with poly- γ -

glutamate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2491-2497.

Knecht, L. E., Veljkovic, M., & Fieseler, L. (2020). Diversity and function of phage encoded depolymerases. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2949.

Kongari, R., Rajaure, M., Cahill, J., Rasche, E., Mijalis, E., Berry, J., & Young, R. (2018). Phage spanins: diversity, topological dynamics and gene convergence. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 326.

Kwiatkowski, B., Boschek, B., Thiele, H., & Stirm, S. (1983). Substrate specificity of two bacteriophage-associated endo-N-acetylneuraminidases. *Journal of Virology*, 45(1), 367-374.

Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3103-3119.

Leiman, P. G., & Molineux, I. J. (2008). Evolution of a new enzyme activity from the same motif fold. *Molecular Microbiology*, 69(2), 287-290.

Leiman, P. G., Battisti, A. J., Bowman, V. D., Stummeyer, K., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., ... & Molineux, I. J. (2007). The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain processive degradation of polysaccharide capsules and evolution of new host specificities. *Journal of Molecular Biology*, 371(3), 836-849.

Li, M., Wang, H., Chen, L., Guo, G., Li, P., Ma, J., ... & Zhang, W. (2022). Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL47 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its therapeutic potential in mice. *Virologica Sinica*, 37(4), 538-546.

Li, X., Koç, C., Kühner, P., Stierhof, Y. D., Krismer, B., Enright, M. C., ... & Xia, G. (2016). An essential role for the baseplate protein Gp45 in phage adsorption to *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 6(1), 26455.

Lin, H., Paff, M. L., Molineux, I. J., & Bull, J. J. (2018). Antibiotic therapy using phage depolymerases: robustness across a range of conditions. *Viruses*, 10(11), 622.

Lin, T. L., Hsieh, P. F., Huang, Y. T., Lee, W. C., Tsai, Y. T., Su, P. A., ... & Wang, J. T. (2014). Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(11), 1734-1744.

Lindsay, A. M., Zhang, M., Mitchell, Z., Holden, M. T., Waller, A. S., Sutcliffe, I. C., & Black, G. W. (2009). The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection. *Microbiology*, 155(2), 443-449.

Linnerborg, M., Weintraub, A., Albert, M. J., & Widmalm, G. (2001). Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1. *Carbohydrate Research*, 333(4), 263-269.

Majkowska-Skrobek, G., Łątka, A., Berisio, R., Maciejewska, B., Squeglia, F., Romano, M., ... & Drulis-Kawa, Z. (2016). Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. *Viruses*, 8(12), 324.

Martinez-Fleites, C., Smith, N. L., Turkenburg, J. P., Black, G. W., & Taylor, E. J. (2009). Structures of two truncated phage-tail hyaluronate lyases from *Streptococcus pyogenes* serotype

M1. *Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(10), 963-966.

Mushtaq, N., Redpath, M. B., Luzio, J. P., & Taylor, P. W. (2004). Prevention and cure of systemic *Escherichia coli* K1 infection by modification of the bacterial phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1503-1508.

Myelnikov, D. (2018). An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922–1955. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 73(4), 385-411.

Nilsson, N., Malmborg, A. C., & Borrebaeck, C. A. (2000). The phage infection process: a functional role for the distal linker region of bacteriophage protein 3. *Journal of Virology*, 74(9), 4229-4235.

Obořilová, R., Šimečková, H., Pastucha, M., Klimovič, Š., Víšová, I., Příbyl, J., ... & Farka, Z. (2021). Atomic force microscopy and surface plasmon resonance for real-time single-cell monitoring of bacteriophage-mediated lysis of bacteria. *Nanoscale*, 13(31), 13538-13549.

Oechslin, F. (2018). Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 10(7), 351.

Oliveira, H., São-José, C., & Azeredo, J. (2018). Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for in vivo therapy. *Viruses*, 10(6), 292.

Olszak, T., Shneider, M. M., Latka, A., Maciejewska, B., Browning, C., Sycheva, L. V., ... & Drulis-Kawa, Z. (2017). The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence. *Scientific Reports*, 7(1), 16302.

Peduzzi, P., Agis, M., & Luef, B. (2013). Evaluation of confocal laser scanning microscopy for enumeration of virus-like particles in aquatic systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(7), 5411-5418.

Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2141-2151.

Prehm, P. E. T. E. R., & Jann, K. L. A. U. S. (1976). Enzymatic action of coliphage omega8 and its possible role in infection. *Journal of Virology*, 19(3), 940-949.

Rice, C. J., Kelly, S. A., O'Brien, S. C., Melaugh, E. M., Ganacias, J. C., Chai, Z. H., ... & Skvortsov, T. (2021). Novel phage-derived depolymerase with activity against *Proteus mirabilis* biofilms. *Microorganisms*, 9(10), 2172.

Roach, D. R., & Donovan, D. M. (2015). Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 5(3), e1062590.

Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D. M., Rodríguez, A., & García, P. (2013). Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 427-434.

Sausset, R., Krupova, Z., Guédon, E., Peron, S., Grangier, A., Petit, M. A., ... & De Paepe, M. (2023). Comparison of interferometric light microscopy with nanoparticle tracking analysis for the study of extracellular vesicles and bacteriophages. *Journal of Extracellular Biology*, 2(2), e75.

Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 76-87.

Schwarzer, D., Buettner, F. F., Browning, C., Nazarov, S., Rabsch, W., Bethe, A., ... & Gerardy-Schahn, R. (2012). A multivalent adsorption apparatus explains the broad host range of phage phi92: a comprehensive genomic and structural analysis. *Journal of Virology*, 86(19), 10384-10398.

Schwarzer, D., Stummeyer, K., Gerardy-Schahn, R., & Mühlenhoff, M. (2007). Characterization of a novel intramolecular chaperone domain conserved in endosialidases and other bacteriophage tail spike and fiber proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2821-2831.

Seul, A., Müller, J. J., Andres, D., Stettner, E., Heinemann, U., & Seckler, R. (2014). Bacteriophage P22 tailspike: structure of the complete protein and function of the interdomain linker. *Biological Crystallography*, 70(5), 1336-1345.

Steinbacher, S., Baxa, U., Miller, S., Weintraub, A., Seckler, R., & Huber, R. (1996). Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10584-10588.

Stirm, S., Bessler, W., Fehmel, F., & Freund-Mölbart, E. (1971). Bacteriophage particles with endo-glycosidase activity. *Journal of Virology*, 8(3), 343-346

Sutherland, I. W. (1995). Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(4), 323-347.

Sutherland, I. W., Hughes, K. A., Skillman, L. C., & Tait, K. (2004). The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 232(1), 1-6.

Thompson, J. E., Pourhossein, M., Waterhouse, A., Hudson, T., Goldrick, M., Derrick, J. P., & Roberts, I. S. (2010). The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23963-23969.

Tomlinson, S., & Taylor, P. W. (1985). Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide. *Journal of Virology*, 55(2), 374-378.

Tote, K., Berghe, D. V., Maes, L., & Cos, P. (2008). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 249-254.

Walter, M., Fiedler, C., Grassl, R., Biebl, M., Rachel, R., Hermo-Parrado, X. L., ... & van Raaij, M. J. (2008). Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage det7: a podoviral tail spike in a myovirus. *Journal of Virology*, 82(5), 2265-2273.

Wang, C., Li, P., Zhu, Y., Huang, Y., Gao, M., Yuan, X., ... & Bai, C. (2020). Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* phage-derived depolymerase and its therapeutic application in mice. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1407.

Waseh, S., Hanifi-Moghaddam, P., Coleman, R., Masotti, M., Ryan, S., Foss, M., ... & Tanha, J. (2010). Orally administered P22 phage tailspike protein reduces *Salmonella* colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. *PLoS One*, 5(11), e13904.

Weigele, P. R., Scanlon, E., & King, J. (2003). Homotrimeric, β -stranded viral adhesins and tail proteins. *Journal of Bacteriology*, 185(14), 4022-4030.

Wong, T. Y., Preston, L. A., & Schiller, N. L. (2000). Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 289-340.

Wu, Y., Wang, R., Xu, M., Liu, Y., Zhu, X., Qiu, J., ... & Li, Q. (2019). A novel polysaccharide depolymerase encoded by the phage SH-KP152226 confers specific activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* via biofilm degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2768.

Yan, J., Mao, J., & Xie, J. (2014). Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*, 28(3), 265-274.

BÖLÜM 4

Kedi ve Köpeklerde Dermatofit Enfeksiyonlarına Karşı oluşan Bağışıklık ve Aşılama OSMAN YAŞAR TEL¹

Giriş

Dermatofitler, keratinize dokuları (kıl, tırnak ve stratum korneum) enfekte etme yeteneğine sahip filamentöz mantarlardır. Bu mantarlar özellikle sıcak ve nemli iklimlerde sık görülmekte, hem insanlarda hem de hayvanlarda yüzeysel mikozlara neden olmaktadır (Paixao ve ark., 2023). Taksonomik olarak dermatofitler, uzun yıllar boyunca üç temel cins altında sınıflandırılmıştır: *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton*. Ancak son dönemlerde yapılan moleküler ve filogenetik çalışmalar, bu sınıflandırmayı genişletmiş ve *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Lophophyton* ve *Paraphyton* gibi yeni cinslerin tanımlanmasını sağlamıştır (De Hoog ve ark., 2017). Bu taksonomik revizyonlar, özellikle veteriner dermatolojide enfeksiyon etkenlerinin doğru tanımlanmasını kolaylaştırmış, tür düzeyinde tanısal doğruluğu artırmıştır.

Dermatofitler ekolojik olarak üç gruba ayrılır: geofilik, zoofilik ve antropofilik türler. Geofilik türler genellikle toprakta saprofit olarak yaşarken, zoofilik türler hayvanlarda enfeksiyona neden olur ve zoonotik potansiyele sahiptir. Antropofilik türler ise insanlarda konak adaptasyonu göstermiştir. Kedi ve köpeklerde enfeksiyon oluşturan en yaygın zoofilik türler *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Nannizzia gypseum*'dur (Grable,

¹ Prof.Dr, Harran Üniversitesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Mikrobiyoloji A.B.D., Orcid: 0000-0001-7848-3899

2020). Özellikle *M. canis*, kedilerde dermatofitozun başlıca etkenidir ve genç, uzun tüylü kedilerde enfeksiyon sıklığı yüksektir (Moriello, 2020). Kedilerde sıklıkla asemptomatik taşıyıcılık söz konusudur ve bu durum zoonotik bulaşma açısından önemli bir risk oluşturur. Köpeklerde ise enfeksiyon genellikle klinik olarak belirgindir; eritemli, kabuklu, alopetik lezyonlarla karakterizedir (Moriello, 2021). Dermatofit enfeksiyonları, zoonotik karakteri nedeniyle hem veteriner hekimlikte hem de halk sağlığında önemli bir yere sahiptir. Kedi ve köpeklerde görülen dermatofitoz vakalarının yaklaşık %90'ının *M. canis* kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Gautam, 2021).

Dermatofit enfeksiyonları genellikle doğrudan temasla veya kontamine çevresel materyaller aracılığıyla bulaşmaktadır. Sporlar, çevrede haftalar hatta aylar boyunca canlı kalabilir; bu nedenle enfeksiyon kontrolü güçleşir. Özellikle barınak, pet shop ve kalabalık yaşam alanlarında bulaşma oranı yüksek olup, asemptomatik taşıyıcı kediler bu yayılımda kritik bir rol oynamaktadır (Moriello, 2020). Mikroskobik olarak dermatofitler, septalı hiflerden ve spor formundaki arthrokonidyalardan oluşur. Keratini parçalayan keratinaz, lipaz ve fosfataz gibi enzimlerin üretimi, bu mantarların keratinize dokulara invazyon yeteneğini sağlar (Paixao ve ark., 2023). Bu enzimatik aktivite, enfeksiyonun başlangıcında deri bariyerini aşarak konak savunma mekanizmalarını tetikler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, dermatofitlerin biyofilm oluşturabildiğini ve bu yapının antifungal ilaçlara karşı direnç kazandırdığını göstermiştir (Gautam, 2021). Bu biyofilm yapısı, özellikle kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlarda tedavi başarısını azaltan önemli bir faktördür.

Tanısal açıdan, geleneksel yöntemler arasında direkt mikroskobik inceleme, kültür ve Wood's lambası kullanımı yer almaktadır. Ancak son dönemlerde PCR tabanlı moleküler tanı yöntemleri, özellikle *Microsporum canis*'in hızlı ve doğru teşhisinde büyük bir ilerleme sağlamıştır (Paixao ve ark., 2023). Moleküler

testlerin duyarlılığı klasik kültür yöntemlerinden yüksektir ve enfeksiyonun erken evrede tespit edilmesini mümkün kılar. Ayrıca tür düzeyinde tanımlama, uygun tedavi seçimi ve epidemiyolojik izlemede kritik öneme sahiptir. Dermatofitozun önemi yalnızca veteriner klinik pratiğinde değil, aynı zamanda zoonotik boyutuyla da değerlidir. Evcil hayvanlarla yakın temasta bulunan insanlar, özellikle çocuklar, yaşlılar ve immün sistemi baskılanmış bireyler risk altındadır. Bu nedenle kedi ve köpeklerde dermatofit enfeksiyonlarının kontrolü, yalnızca hayvan sağlığı açısından değil, halk sağlığının korunması açısından da önemli bir gerekliliktir (Gautam, 2021).

Kedi ve köpeklerde dermatofit enfeksiyonlarına karşı bağışıklık

Kedi ve köpeklerde dermatofit enfeksiyonlarına karşı bağışıklıkta, birden fazla savunma mekanizması birlikte çalışmaktadır. Epidermal bariyer, doğal bağışıklık ve inflamasyon erken savunmada kritik rol oynarken, pro-inflamatuar sitokinler (örneğin IL-1 β , TNF- α) konak bağışıklık tepkisini şekillendirir. Kedi ve köpeklerde, dermatofit enfeksiyonları, oluşturan *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Nannizzia gypseum* gibi türler konak immün sistemini uyararak hem lokal hem de sistemik savunma yanıtlarını tetikler (Paryuni, Indarjulianto & Widyarini, 2020; Deng ve ark., 2023).

Dermatofitler infeksiyonlarında ilk Savunma Hattı (Deri)

Deri yalnızca fiziksel bir bariyer değil, aynı zamanda aktif bir immünolojik organdır. Epidermal keratinositler ve dermal bağışıklık hücreleri, dermatofitlerin hücre duvarında bulunan β -glukan, mannan ve kitin gibi patojenle ilişkili moleküler desenleri (PAMP'ler) tanıyarak patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) aracılığıyla bağışıklık yanıtını başlatır. Bu reseptörler arasında Toll-like reseptörler (TLR2, TLR4) ve C-tip lektin reseptörleri (Dectin-1, Dectin-2, Mincle) yer alır. Dectin-1 gibi C-tip lektin reseptörleri,

özellikle β -glukanları tanıyarak Syk/CARD9 sinyal yolunu aktive eder ve bu süreç, Th17 tipi bağışıklığın gelişmesini destekler (Heinen ve ark., 2019; Burstein ve ark., 2020; Mata-Martínez ve ark., 2022).

PRR'lerin PAMP'leri algılaması sonucunda NF- κ B ve MAPK sinyal yolları aktive olur; bunun sonucu olarak IL-1 β , TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır. Bu sitokinler nötrofillerin ve makrofajların enfekte bölgeye göçünü uyarak mantar eliminasyonunu hızlandırır (Jartarkar ve ark., 2021).

Dermatofit enfeksiyonlu deri lezyonlarında histopatolojik olarak epidermal hiperplazi, Langerhans hücre aktivasyonu ve yoğun nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir. Bu bulgular, deri immün sisteminin hem doğuştan gelen hem de adaptif bileşenlerinin aktif olduğunu göstermektedir (Jartarkar ve ark., 2021).

Ayrıca keratinositler, β -defensinler ve katelisidinler gibi antimikrobiyal peptitleri (AMP) sentezleyerek dermatofitlerin büyümesini baskılar. Bu peptitlerin üretimi IL-17 ve IL-22 aracılığıyla uyarılır ve Th17 eksenli bağışıklığın önemli bir parçasını oluşturur (Deng ve ark., 2023; Burstein ve ark., 2020).

Doğal Bağışıklık

Doğal bağışıklık, dermatofitlerin konakla ilk temasında devreye giren temel savunma sistemidir. Epidermal keratinositler, dermal makrofajlar ve dendritik hücreler gibi hücreler, patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) aracılığıyla dermatofitlerin hücre duvarında bulunan β -glukan ve diğer karbonhidrat bileşenlerini tanır (Jartarkar ve ark., 2021; Burstein ve ark., 2020). PRR'ler arasında C-tip lektin reseptörleri (CLR'ler), özellikle Dectin-1 ve Dectin-2, fungal β -glukanları tanıdığı ve Syk/CARD9 sinyal yolağı üzerinden antifungal sinyali başlattığı gösterilmiştir, bu da hematopoietik bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu uyarır (Jartarkar ve ark., 2021)

Dermatofit enfeksiyonunda, makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositik hücreler kritik rol oynar. Makrofajlar dermatofitleri fagosite eder ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile lizozomal enzim üretimi sayesinde mikroorganizmayı yok edebilir (Jartarkar ve ark., 2021). Nötrofiller ise epitel yüzeyinde ilk savunma hattını oluşturarak mantar hücrelerine karşı etkili bir fagositik yanıt verir; ayrıca nötrofillerin epidermal reaksiyonlarda proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretimi ile enfeksiyon bölgesine daha fazla bağışıklık hücrelerini çeker (Jartarkar ve ark., 2021; Deng ve ark., 2023). Dermatofit enfeksiyonlu deri lezyonlarında yapılan histopatolojik çalışmalar, epidermal hiperplazi ve bağışıklık hücre infiltrasyonu gibi bulgularla birlikte, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin bölgeye yöneldiğini göstermiştir (Jartarkar ve ark., 2021). Ayrıca epidermal hücreler ve inflamatuvar bağışıklık yanıtı, antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) üretir. Bu AMP'ler, mantar hücre duvar bileşenlerine karşı doğrudan antifungal etkili olabilir ve hem doğuştan gelen bağışıklığın bir parçası olarak işlev görebilir (Sardana ve ark., 2021).

Kazanılmış (Adaptif) Bağışıklık

Dermatofit enfeksiyonlarına karşı kazanılmış bağışıklık, antijen sunan hücrelerin (özellikle Langerhans hücrelerinin) mantar antijenlerini işlemesi ve lenf düğümlerine taşımasıyla başlar. Bu antijenler, MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla CD4+ T lenfositlere sunulur ve hem hücresel hem de humoral immün yanıtların aktive edilmesini sağlar (Deng ve ark., 2023).

T-hücreleri aracılı bağışıklıkta, dermatofitlere karşı en önemli koruyucu yanıt Th1 ve Th17 hücreleri tarafından oluşturulur. Th1 hücre yanıtı, interferon-gamma (IFN- γ) ve interleukin-12 (IL-12) üretimiyle makrofajları aktive eder, böylece hücre içi mantarların eliminasyonunu sağlar. Bu yanıt, mantarların derin dokulara ilerlemesini önleyen temel mekanizmadır. Th17 hücre yanıtı ise

interlökin-17 (IL-17) ve interlökin-22 (IL-22) salgılayarak nötrofillerin enfeksiyon bölgesine göçünü artırır ve keratinositlerde antimikrobiyal peptit (AMP) üretimini uyarır. Bu süreç, özellikle yüzeysel dermatofitlerin temizlenmesinde etkilidir (Heinen ve ark., 2019; Burstein ve ark., 2020). Deneysel modellerde, Th1 ve Th17 yanıtlarının birlikte etkinleşmesinin dermatofitlerin eliminasyonunda sinerjik bir etki oluşturduğu gösterilmiştir. IL-17 ve IFN- γ eksikliği olan farelerde, fungal yükün arttığı ve iyileşmenin geciktiği gözlemlenmiştir (Heinen ve ark., 2019).

Humoral bağışıklık ise B lenfositleri tarafından üretilen IgG ve IgA antikorları aracılığıyla dermatofit antijenlerinin nötralizasyonunu destekler ve fagositozun etkinliğini artırır. Ancak yüzeysel dermatofit enfeksiyonlarında antikor yanıtının tek başına koruyucu etkisi sınırlıdır. Bununla birlikte, deneysel aşı çalışmalarında humoral yanıtın hücresel (Th1/Th17) yanıtla birlikte çalıştığında klinik iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmektedir (Paryuni ve ark., 2020; Deng ve ark., 2023).

Kedilerde yapılan deneysel çalışmalarda *Microsporum canis* enfeksiyonlarında IL-17 ekspresyonunun artışıyla klinik iyileşme arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (Moriello & DeBoer, 2012). Köpeklerde ise *Trichophyton mentagrophytes* enfeksiyonlarında IFN- γ baskın Th1 yanıtının hastalığın sınırlandırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Paryuni ve ark., 2020).

Son yıllarda yapılan immünojenetik çalışmalar, dermatofit enfeksiyonlarına yatkınlığın CARD9, Dectin-1 ve TLR4 genlerindeki farklı ekspresyon paternleriyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. CARD9 sinyal yolundaki bozuklukların, Th17 yanıtını zayıflatarak kronik dermatofitoz olgularında rol oynadığı bildirilmektedir (Deng ve ark., 2023). Özetle, kedi ve köpeklerde dermatofit enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklık, Th1/Th17 eksenine dayalı hücresel yanıtın baskın olduğu bir süreçtir. Bu yanıt,

hem doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarıyla etkileşim içinde çalışır hem de uzun süreli adaptif koruma sağlar.

Dermatofit Aşılarında Kullanılan Adjuvanlar ve İmmünolojik Etkileri

Kedi ve köpeklerde geliştirilen inaktif dermatofit aşılarının etkinliği, kullanılan adjuvan sistemlerinin türüne ve bu adjuvanların immün yanıt profili üzerindeki etkisine bağlıdır. Adjuvanlar, antijenin immünojenisitesini artırarak daha güçlü, uzun süreli bağışıklık yanıtı oluşturur ve antigenle birlikte T hücresi aracılı (Th1/Th17 gibi) hücrel bağışıklığı uyabilir (Domínguez-Odio ve ark., 2022).

Veteriner aşılarında yaygın olarak kullanılan alüminyum bazlı adjuvanlar (örn. alüminyum hidroksit ve diğer mineral tuzlar), humoral bağışıklığı güçlendirmede etkilidir ancak genellikle hücrel bağışıklığın tetiklenmesinde sınırlı kalır. Alüminyum adjuvanların temel mekanizması, antigenin enjeksiyon bölgesinde “depo etkisi” yaratarak antigenin yavaş salınımını sağlamaktır; bu da özellikle antikor yanıtını artırır ancak Th1-tipi immün yanıtı zayıf uyabilir (Antipov ve Petrovsky, 2025).

Toll-like reseptör (TLR) agonistleri, modern adjuvan stratejilerinde giderek daha fazla ilgi görmektedir. Özellikle Monofosforil Lipid A (MPLA), lipopolisakkarit (LPS) yapısının modifiye edilmiş bir türevidir ve TLR4 üzerinden immün sistemi uyarır. MPLA, hem humoral hem de hücrel bağışıklık yanıtlarını artırabilen, insan aşılarında lisanslı bir adjuvandır ve dengeli Th1/Th2 yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir; bu mekanizma bazı veteriner aşı stratejilerinde de potansiyel olarak kullanılabilir (Savelkoul ve ark., 2015)

Adjuvan sistemlerinin kombinasyonu, örneğin MPLA + Alum (materyel olarak insan aşılarında AS04 adıyla kullanılan formülasyon), hem antikor üretimini hem de hücrel bağışıklığı

artırarak daha dengeli ve güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturabilir. Bu tür kombinasyon sistemleri, klasik alum adjuvanlarına göre daha geniş spektrumlu immün tepkiler uyandırma potansiyeline sahiptir ve bu stratejiler veteriner aşı geliştirme alanında da ilgi görmektedir (Savelkoul ve ark., 2015).

Ayrıca emülsiyon bazlı adjuvanlar, özellikle Montanide™ ISA tipi su-yağ ve yağ-emülsiyon sistemleri, veteriner aşılarında yaygın olarak kullanılır. Bu tip adjuvanlar antijenin yavaş salınımını sağlayarak uzun süreli immün yanıtı destekler ve hem humoral hem de hücrel bağışıklığı uyarabilir; Montanide™ adjuvanların farklı türlerde kullanımı kitaplarda ve üretici kaynaklarında tarif edilmektedir (Anonim, 2025).

Bazı çalışmalar, adjuvansız polivalan dermatofit aşılarının hem humoral hem de hücrel bağışıklığı uyarabildiğini göstermesine rağmen, genel bir eğilim olarak adjuvan destekli formülasyonların daha güçlü, uzun süreli bağışıklık ve immün hafıza oluşturduğu yönündedir; bu durum veteriner aşı geliştirme çalışmalarıyla paralellik gösterir (Antipov ve Petrovsky, 2025)

Özetle, kedi ve köpeklerde dermatofit aşılarının etkinliği sadece antijenin tipi ile değil, kullanılan adjuvan sistemlerinin immünojenik özellikleriyle de doğrudan ilişkilidir. Mineraller (alum), TLR agonistleri (MPLA/AS04) ve emülsiyon sistemleri (Montanide™) gibi adjuvanlar, antijenin immün sistemi uyarmasını güçlendirerek daha dengeli ve koruyucu bağışıklık yanıtı sağlar.

Kedi ve Köpeklerde Dermatofit Aşıları

Dermatofitozis, zoonotik özellik taşıyan ve tedavi süresi uzun olan bir mantar enfeksiyonudur. Özellikle *Microsporum canis*'in neden olduğu enfeksiyonlar, hem halk sağlığı hem de veteriner hekimlik açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle aşıyla korunma, hastalığın kontrolünde etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Lund & DeBoer, 2008). Dermatofit

aşıları genellikle inaktif mantar hücreleri veya zayıflatılmış canlı suşlar içerir. Bazı formülasyonlar yalnızca tedaviye destek amacıyla, bazıları ise profilaktik koruma sağlamak için geliştirilmiştir.

Bu kapsamda, son yıllarda hem Avrupa’da hem de Rusya’da geliştirilen çeşitli inaktif ve canlı dermatofit aşıları, kedi ve köpeklerde enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisinde önemli bir biyolojik araç olarak öne çıkmaktadır (Tablo 1). Bu aşıların içeriği, etki mekanizması, uygulama protokolleri ve sağladıkları bağışıklık düzeyi, kullanılan antijen tipi ve adjuvan bileşenlerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar, günümüzde veteriner uygulamalarda kullanılan ticari dermatofit aşılarının bileşimi ve etki profillerine de yansımaktadır. Bu nedenle, kedi ve köpeklerde yaygın olarak kullanılan mevcut aşıların içerikleri, adjuvan yapıları ve immünolojik özelliklerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesi, hem etkinlik hem de yol gösterici olması açısından önemlidir. Bu kapsamda kedi ve köpek dermatofitozunda Türkiye’de ve dünyada en yaygın kullanılan dermatofit aşıları açıklanmıştır.

1. Biocan M Plus (Bioveta, Çek Cumhuriyeti)

Biocan M Plus, köpeklerde *Microsporum canis*’e karşı geliştirilen inaktif bir dermatofit aşısıdır. Her 1 mL’inde en az 1×10^6 adet inaktif edilmiş *M. canis* hücresi bulunur ve formülasyonda % 2 alüminyum hidroksit jel adjuvan olarak kullanılır. Aşı intramüsküler (IM) olarak uygulanır; ikinci doz 10–21 gün sonra yapılır. Üretici prospektüsüne göre bağışıklık ikinci dozdan yaklaşık bir ay sonra başlar ve 12 aya kadar sürer. Biocan M Plus hem profilaktik hem de terapötik kullanım için onaylıdır (Bioveta 1, 2024).

2. Biofel M Plus (Bioveta, Çek Cumhuriyeti)

Biofel M Plus, kedilerde *M. canis* kaynaklı dermatofitozun önlenmesi ve tedavisi için kullanılan bir inaktif aşısıdır. Her 1 mL’de 1×10^6 adet inaktif edilmiş *M. canis* bulunur. Aşılama 8 haftalıktan

itibaren yapılabilir; ikinci doz 10–21 gün sonra uygulanır ve bağışıklığın 12 aya kadar sürdüğü bildirilmiştir (Bioveta 2, 2024).

Üreticiye göre Biofel M Plus hem profilaktik hem terapötik olarak kullanılabilir ve inaktif antijen ile oluşturulan bağışıklık, klinik olarak enfeksiyon süresini kısaltmaktadır.

3. Microderm (NPO Microgen, Rusya)

Microderm, Rusya ve çevresindeki bazı ülkelerde veteriner uygulamalarda kullanılan canlı attenüe bir dermatofit aşısıdır. Patent verilerine göre bu aşı, *Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes* antijenlerini içerir ve dermatofitozisojenlere karşı immün cevap oluşturma amacıyla geliştirilmiştir; patent dokümanında aşının “yüksek immünojenik aktivite ve yüksek koruyucu etki” gösterdiği belirtilmektedir (Patent No. RU2084240C1)

Genel dermatofit aşı literatüründe, canlı attenüe dermatofit aşılarının hücresel bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyeline sahip olduğuna değinilmiş, ancak bilimsel kanıtların sınırlı olduğu vurgulanmıştır. Bu durum, canlı aşılarda güvenlik profili, immün yanıt süreleri ve klinik etkinliği üzerine daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Lund & DeBoer, 2008).

4. Vakderm (Rusya ve Kazakistan)

Vakderm, *Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes* suşlarını içeren, hem inaktif hem de canlı formülasyonlarda bulunan bir dermatofit aşısıdır. Köpekler, kediler, tavşanlar ve vizon gibi kürk hayvanlarında kullanılmaktadır. Üretici prospektüslerine göre hem profilaktik hem terapötik uygulamalarda kullanılabilmektedir (Vacderm-F, 2025). Ancak uluslararası klinik veriler sınırlıdır.

5. Insol Dermatophyton (Boehringer Ingelheim, Almanya)

Insol Dermatophyton, *Trichophyton verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. sarkisovii*, *T. equinum*, *Microsporum canis* ve *Nannizzia gypsea* gibi birden çok dermatofit türünü içeren çok bileşenli, inaktif bir dermafitoz aşısıdır. Ürün, at, köpek ve kedilerde bu mantar türlerine bağlı dermatofitozis riskini azaltmak ve tedavi sürecini hızlandırmak üzere aktif immünizasyon sağlamak amacıyla geliştirilmiştir; üretici prospektüsüne göre bağışıklık yanıtı özellikle hücre-aracılı immüniteyi uyarır ve ilk koruyucu etkinin 5 hafta içinde başladığı belirtilmektedir (Boehringer Ingelheim, 2024). Saha ve ürün dokümanları, aşılamının ardından klinik lezyonların iyileşmesini hızlandırdığı ve enfeksiyonun şiddetini azalttığına dair pratik gözlemler paylasa da, bu etkilere ilişkin randomize kontrollü klinik çalışmalar sınırlıdır veya kamuya açık bilimsel literatürde yeterince belgelendirilmemiştir (Insol, 2025). Bu nedenle, profilaktik bağışıklık kapasitesinin küresel çapta güçlü şekilde desteklendiğine dair kapsamlı bilimsel kanıt mevcut değildir.

Genel olarak Rusya ve Doğu Avrupa’da kullanılan Microderm, Vakderm ve LTF-130 gibi canlı veya attenüe aşılar, yüksek immünojeniteye sahip olmakla birlikte virülansın geri dönüş riski ve lokal reaksiyonlar gibi yan etkiler nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır. Buna karşılık, inaktif aşılar daha güvenli olup klinik olarak enfeksiyonun şiddetini azaltmakta ve lezyonların iyileşmesini hızlandırmaktadır (Moriello & DeBoer, 2012; Lund & DeBoer, 2008).

Tablo 1. Kedi ve köpeklerde kullanılan aşılar ve özellikleri

Aşı Adı	Üretici / Ülke	Aşı Tipi	Hedef Tür	Adjuvan	Kullanım / Etki
Biocan M Plus	Bioveta / Çekya	İnaktive	Köpek	Alüminyum hidroksit jel	Profilaktik ve terapötik, 1 yıl koruma
Biofel M Plus	Bioveta / Çekya	İnaktive	Kedi	Alüminyum	Profilaktik ve terapötik,

				hidroksit jel	1 yıl koruma
Microderm	NPO Microgen / Rusya	Canlı attenüe	Kedi & Köpek	Yok	Koruyucu ve tedavi edici, saha uygulama sı yaygın
Vakderm / LTF-130	Rusya / Kazakista n	Canlı veya İnaktive	Kedi, Köpek, Kürk hayvanla rı	Yok	Çoklu konak koruması
Insol Dermatophyt on	Boehring er Ingelhei m / Almanya	İnaktive multivale nt	At, Kedi, Köpek	Tiomersal	Terapötik amaçlı kullanım

Deneysel çalışmalar göstermiştir ki hem inaktif hem de canlı–inaktif kombine dermatofit aşıları, bağışıklık sistemini uyarabilir; ancak bu uyarım tam koruyucu immünite sağlamada sınırlı kalmıştır. Özellikle *Microsporum canis* ile deneysel enfeksiyon modellerinde yapılan bir çalışma, inaktif (IDV) ve canlı–inaktif kombine aşıların uygulamasının, kontrol grubuna göre enfeksiyon şiddetini biraz azaltabileceğini ancak topikal challenge sonrası koruyucu immünite oluşturmadığını göstermiştir. Bu çalışmada aşılanan kedilerde dermatofit enfeksiyonu gelişti ve aşılama hem humoral hem de hücrel yanıtarda belirgin üstünlük göstermemiştir (DeBoer ve ark., 2002)

Başka bir çalışmada da terapötik amaçlı non-adjuvan inaktif dermatofit aşılarının güvenliliği incelenmiş; bunun sonucunda yerel veya sistemik ciddi yan etkilerin önemli ölçüde farkı olmadığı ve sadece birkaç hafif lokal reaksiyon görüldüğü raporlanmıştır (Westhoff ve ark., 2010).

Bu mevcut bilimsel kanıtlar doğrultusunda aşağıdaki değerlendirmeler yapılabilir:

- İnaktif dermatofit aşıları, belirli klinik koşullarda bağışıklık yanıtını uyarabilir ve tedavi sürecini kısmen destekleyebilir; ancak tam koruyucu immünite sağladığına dair güçlü kanıtlar sınırlıdır.

- Canlı veya kombine canlı–inaktif aşılar, belirli bağışıklık tepkileri oluşturabilse de, çalışma sonuçları etkinlik açısından net üstünlük göstermemiştir ve bazı lokal reaksiyonlara yol açabilmiştir (DeBoer ve rak., 2002).

Sonuç

Kedi ve köpeklerde dermatofit enfeksiyonları, özellikle *Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes* gibi zoofilik türlerin neden olduğu, zoonotik karakterli yüzeysel mikozlardır. Bu enfeksiyonlar yalnızca hayvan sağlığını değil, aynı zamanda insan sağlığını da tehdit eden önemli bir halk sağlığı problemidir. Tedavi sürecinin uzun, çevresel kontaminasyonun yaygın ve yeniden enfeksiyon riskinin yüksek olması nedeniyle, sadece antifungal ilaç uygulamalarıyla kalıcı kontrol sağlamak çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Bu durum, dermatofitlere karşı bağışıklık temelli koruyucu stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, dermatofit aşılarının hem canlı attenüe hem de inaktif formülasyonlar halinde geliştirildiğini göstermektedir. Canlı aşılar, konakta güçlü bir hücrel bağışıklık yanıtı oluşturabilmekte, ancak immünsüpresif veya genç hayvanlarda güvenlik açısından riskler taşımaktadır. İnaktive aşılar ise daha güvenli ve stabil formülasyonlar olup, özellikle terapötik amaçla kullanıldığında enfeksiyonun klinik şiddetini ve süresini azaltabilmektedir (Lund & DeBoer, 2008). Bununla birlikte, inaktif aşıların yeterli düzeyde hücrel bağışıklık yanıtı oluşturabilmesi için uygun adjuvan kombinasyonlarına ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir.

Güncel dermatofit aşı çalışmalarında Monofosforil Lipid A (MPLA), Montanide™ ISA serisi ve alüminyum hidroksit (alum)

gibi adjuvanların kullanımı, antijenin immünojenisitesini artırarak daha güçlü, dengeli ve uzun süreli bir Th1/Th17 temelli bağışıklık yanıtı sağlamaktadır. Bu kombinasyonlar, hem güvenli hem de etkili immün koruma sunmaları nedeniyle kedi ve köpeklerde geliştirilecek yeni nesil dermatofit aşıları için umut verici adjuvan sistemleri olarak değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, kedi ve köpeklerde dermatofit enfeksiyonlarının kontrolünde aşı temelli koruyucu yaklaşımlar, yalnızca hayvan sağlığı ve refahını artırmakla kalmayıp, zoonotik bulaşın önlenmesi yoluyla halk sağlığının korunmasına da önemli katkı sağlayacaktır.

Kaynakça

Anonim. (2025). Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: <https://www.seppic.com/el/article/seppic-widens-its-range-dedicated-animal-health-new-adjuvant-oral-vaccination>.

Antipov A, Petrovsky N. One Health adjuvant selection for vaccines against zoonotic infections. *Explor Med.* 2025;6:1001316

Bioveta.1 (2024). Biocan M Plus suspension for injection (dogs) – Product information. Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: <https://www.bioveta.cz/tr/urunlerimiz/hayvan-sagligi/biocan-m-plus-kopekler-icin-enjeksiyon-suspansiyonu.html>.

Bioveta.2 (2024). Biofel M Plus suspension for injection (cats) – Product information. Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: <https://www.bioveta.cz/tr/urunlerimiz/hayvan-sagligi/biofel-m-plus-enjeksiyon-suspansiyonu-kediler-icin.html>.

Boehringer Ingelheim. (2024). Insol Dermatophyton suspension for injection. Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: <https://www.vetmedica.de/produkte-tierarzt/Katze/insol-dermatophyton/3721-Grove-Technology+1>.

Burstein, V. L., Guasconi, L., Beccacece, I., Theumer, M. G., Mena, C., & Prinz, I. (2020). Skin immunity to dermatophytes: From experimental models to host defense mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 11, 605644

De Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, J. B., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., & Gräser, Y. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(1–2), 5–31.

DeBoer, D. J., Moriello, K. A., Blum, J. L., Volk, L. M., & Bredahl, L. K. (2002). Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated dermatophytosis vaccines in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 63(11), 1532–1537.

Deng, R., Wang, X., & Li, R. (2023). Dermatophyte infection: From fungal pathogenicity to host immune responses. *Frontiers in Immunology*, 14, 1285887.

Domínguez-Odio, A., et al. (2022). Technology surveillance in veterinary vaccine adjuvants: Trends and applications in companion and production animals. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacognosy Research*, 10(5), 876–889.

Gautam, S. S., Navneet, Babu, N., & Kumar, S. (2021). Current perspective of dermatophytosis in animals. In A. Gupta & N. P. Singh (Eds.), *Fungal diseases in animals* (pp. 93–115). Springer Nature Switzerland AG.

Grable, S. (2020). Dermatophytosis. In K. Horne, M. Schwassmann & D. Logas (Eds.), *Small animal dermatology for technicians and nurses* (pp. 65–89). John Wiley & Sons

Heinen, M. P., Cambier, L., Antoine, N., Gabriel, A., Gillet, L., & Bureau, F. (2019). Th1 and Th17 immune responses act

complementarily to optimally control superficial dermatophytosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(3), 626–637.

Insol (2025). Insol Dermatophyton product information. Tierarzneimittelkompendium — Immunization details and species indications. HTM. Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: <https://compendiumveterinaire.ch/HTD/00000000/VAK01500>.

Jartarkar, S. R., Ghosh, S., Dogra, S., Singh, A., & Das, S. (2021). Pathogenesis, immunology and management of dermatophytoses. *Journal of Fungi (Basel)*, 8(1), 39.

Lund A, Deboer DJ. Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals. *Mycopathologia*. 2008 Nov-Dec;166(5-6):407-24.

Mata-Martínez, P., Martín-Sánchez, M., & López-Robles, M. D. (2022). Dectin-1 signaling update: New perspectives for trained immunity. *Frontiers in Immunology*, 13, 812148.

Moriello, K. A. (2020). Dermatophytosis. In C. Noli & S. Colombo (Eds.), *Feline dermatology* (pp. 265–296). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29836-4_11.

Moriello, K. A. (2021). Dermatophytosis. In H. Jackson & R. Marsella (Eds.), *BSAVA manual of canine and feline dermatology* (4th ed., pp. 187–205). British Small Animal Veterinary Association

Moriello, K. A., & DeBoer, D. J. (2012). Dermatophytosis. In K. A. Moriello & D. J. DeBoer (Eds.), *Feline Dermatology: Infectious Diseases, Parasitic Infestations and Immune-Mediated Disorders* (pp. 55-68). Wiley-Blackwell.

Paixão, G. C., Rocha, M. F. G., Sidrim, J. J. C., & Brilhante, R. S. N. (2023). Dermatophytes and dermatophytosis: A new look at an old mycosis. In A. L. S. dos Santos, M. H. Branquinha, & L. F. Kneipp (Eds.), *The book of fungal pathogens* (Chapter 9, pp. 201–226). Nova Science Publishers. ISBN 979-8-88697-454-6.

Paryuni, A. D., Indarjulianto, S., & Widyarini, S. (2020). Dermatophytosis in companion animals: A review. *Veterinary World*, 13(6), 1174–1181.

Patent No. RU2084240C1. Live vaccine for dermatophytosis control in animals (1997). Russian Federation Patent. Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: <https://patents.google.com/patent/RU2084240C1/en>.

Sardana K, Gupta A, Mathachan SR. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. *Indian Dermatol Online J*. 2021 May 12;12(3):389-399.

Savelkoul HF, Ferro VA, Strioga MM, Schijns VE. Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015 Mar 5;3(1):148-71

Vacderm-F (2024). Vacderm-F vaccine for animals – product data sheet. Erişim tarihi: 17.12.2025. Erişim adresi: https://zoofarmagro.md/en/product/6563-vaccine_vacderm_f.

Westhoff, D., Orveillon, F. X., Farnow, D., Klös, M-C., & Elbers, K. (2010). Safety of a non-adjuvanted therapeutic vaccine for the treatment of feline dermatophytosis. *Veterinary Record*, 167(23), 899–903.

BÖLÜM 5

ADENOVIRUS INFECTIONS IN CHICKENS AND ANTIBACTERIAL- ANTIVIRAL MEDICINAL PLANTS

ORKUN BABACAN¹
SEHER ÖZGE KAYAN²
SELAMİ SELVİ³

1. INTRODUCTION

The family *Adenoviridae* is divided into five main genera: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, and *Ichtadenovirus* (Marek et al., 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Within the genus *Aviadenovirus*, *Fowl aviadenovirus* (FAdV), which causes significant infections in poultry, has been classified into five genotypes (FAdV-A to FAdV-E) and twelve different serotypes (1–8a, 8b–11) (Hess, 2000; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019; Zhang et al., 2017). *Fowl aviadenovirus* (FAdV), first

¹ Assoc. Prof. Dr., Balıkesir University, Kepsut Vocational School, Department of Veterinary, Laboratory and Veterinary Health Program, Orcid: 0000-0003-0258-1825

² MSc Student, Veterinarian, Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology, Orcid: 0000-0002-6937-8293

³ Prof. Dr., Balıkesir University, Altınoluk Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Medicinal and Aromatic Plants Program, Orcid: 0000-0002-9959-6945

identified in the 1950s and subsequently isolated in various regions, is represented by these five genotypes and twelve serotypes (McFerran & Adair, 1977; Hess, 2000; Schachner et al., 2016; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

These serotypes are known to cause several diseases in poultry, primarily affecting chickens. These include inclusion body hepatitis (IBH), characterized by intranuclear inclusion bodies in hepatocytes; hydropericardium syndrome (HPS), associated with fluid accumulation around the heart; gizzard erosion and ulceration (GEU); and Egg Drop Syndrome (EDS). Mortality rates are particularly high in young broilers and immunosuppressed flocks (Zhao et al., 2015).

While hygiene, sanitation, and biosecurity measures are critical in preventing bacterial infections in poultry, vaccination remains an indispensable tool for controlling viral diseases. Although vaccines used against high-mortality viral pathogens offer partial protection, associated losses in productivity continue to pose a significant economic burden on the poultry industry.

This book chapter aims to present an overview of FAdV and EDS infections, including clinical manifestations, preventive measures, and control strategies.

2. ETIOLOGY

The family *Adenoviridae* is divided into five different genera based on genetic structure and replication strategies, although they share morphological similarities: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, and *Ichtadenovirus*. The genus *Aviadenovirus* includes species that infect avian species such as chickens, turkeys, ducks, and geese. Within this group, *Fowl aviadenovirus* (FAdV) is classified into 5 main genotypes (FAdV-A to FAdV-E) and a total of 12 serotypes (1–8a, 8b–11)

(Hess, 2000; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019; Pouladi et al., 2024).

The distribution of genotypes to serotypes is as follows:

- Genotype A: FAdV-1
- Genotype B: FAdV-5
- Genotype C: FAdV-4, FAdV-10
- Genotype D: FAdV-2, FAdV-3, FAdV-9, FAdV-11
- Genotype E: FAdV-6, FAdV-7, FAdV-8a, FAdV-8b

FAdV-4, which belongs especially to genotype C, has recently been associated with high-mortality Hydropericardium Syndrome (HPS) outbreaks, primarily in China as well as in other parts of Asia and South America (Zhao et al., 2015; Li et al., 2017; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Fowl aviadenoviruses are classified into five genotypes (FAdV-A to E) and 12 serotypes (1-8a, 8b-11) based on their genetic and serological differences (McFerran & Adair, 1977; Meulemans et al., 2001). It was declared that nucleotide similarity differentiations between some serotypes and genotypes has been reported to vary widely (52% to 72%) (Schachner et al., 2016; Şahindokuyucu & Yazıcı, 2019; Swayne, 2013). Among these, FAdV-4, FAdV-8b, and FAdV-11 serotypes have been particularly linked to severe clinical conditions (Zhao et al., 2015).

Recent studies have shown that some FAdV strains can cause more severe clinical presentations in poultry when accompanied by immunosuppressive conditions, such as infections with IBDV and CIAV. This suggests that the virus can act synergistically with other agents rather than acting alone (Gomis et al., 2006; Schachner et al., 2018; Elbestawy et al., 2020).

2.1. Morphology (Structural Features)

Fowl aviadenoviruses (FAdVs) are non-enveloped viral particles with icosahedral symmetry, approximately 90–95 nm in diameter. Their genetic material consists of double-stranded linear DNA, with genome sizes ranging from about 26 to 48 kilobase pairs (kbp). The virion is surrounded by a protein shell composed of 252 capsomers. Of these, 240 are hexon structures, and 12 are vertex capsomers forming the penton bases. The penton bases carry fiber proteins that extend outward. These fibers play a crucial role in initiating infection by binding to specific receptors on the cell surface. Experimental studies have demonstrated that fiber proteins are especially critical for attachment to host cells in certain serotypes, such as FAdV-1 (Gelderblom & Maichle-Lauppe, 1982; Tan et al., 2001; Russel, 2009; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019; Hess, 2000; Schachner et al., 2016; Shah et al., 2017; Zhao et al., 2015).

FAdV particles are highly resistant. They can withstand lipid solvents such as ether, chloroform, and sodium deoxycholate; hence, as non-enveloped viruses, they tend to be more resistant to disinfectants. However, quaternary ammonium compounds and glutaraldehyde are effective against them. They also show resistance to pH variations between 3 and 9. Thermal inactivation can be achieved by exposure to 60 °C for 1 hour or 80 °C for 10 minutes. These characteristics allow the virus to persist for extended periods in environmental conditions (Swayne, 2013; Afzal et al., 1991; Şahindokuyucu & Yazıcı, 2019).

2.2. Virus Replication

The replication process of *Adenovirus* occurs in the nucleus of the host cell and is divided into three main stages: early, intermediate, and late transcription phases (Matthews, 2005; Fenner's Veterinary Virology, 2017; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019; Kataria et al., 2013).

Early gene expression includes regions encoding proteins that initiate viral replication. The E1A region activates the cell cycle to prepare the environment for viral DNA replication. E1B inhibits the p53 tumor suppressor gene to prevent apoptosis in the cell. The E3 region modulates the host immune response, contributing to the suppression of viral infection. For example, it was declared the E3/19K protein can inhibit MHC-I expression, preventing T cell recognition. E3/19K inhibits major histocompatibility complex class I expression, thereby preventing the recognition of infected cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells (Fenner's Veterinary Virology, 2017; Kataria et al., 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

During the intermediate phase (generally the synthesis of IX and IVa2 proteins), the viral genetic material is organized. The late phase is when structural proteins (hexon, penton, fiber, etc.) are synthesized. After viral genome replication, expression of these structural proteins begins, and virions accumulate in crystalline arrays within the cell nucleus (Şahindokuyucu ve Yazıcı, 2019).

In the final stage, virions are released through cell lysis. The lysis process causes severe structural damage in the infected cell and leads to the formation of characteristic eosinophilic intranuclear inclusion bodies (McFerran & Adair, 1977; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

FAdV infections can be transmitted both vertically and horizontally. Vertical transmission occurs from infected breeder animals to offspring via eggs, which is critically important in breeder management (Toro et al., 2001). Viral particles can be detected in the yolk and allantoic fluid of infected eggs, and these embryos generally serve as suitable hosts for viral replication (Saifuddin & Wilks, 1991; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

The incubation period of the virus occurs between 24-48 hours following infection after natural transmission (Swayne, 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Following infection, the virus is shed into the environment through feces and secretions of infected animals. Virus shedding lasts approximately 4–6 weeks in broilers and 5–9 weeks in laying hens (McFerran & Adair, 1977; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

In horizontal transmission, feces, tracheal, and nasal secretions are the main sources of viral spread. In addition to direct contact, aerosol transmission over short distances is also possible (Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019; Fitzgerald et al., 2020). Within-farm spread is significantly influenced by personnel, transport vehicles, egg handling equipment, and poultry crates (Swayne, 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). It has been reported that multiple serotypes can be isolated simultaneously when broilers from different breeder flocks are kept in the same poultry house (Cowen et al., 1978; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

3. PATHOGENESIS AND IMMUNITY

FAdV primarily causes infections in avian species such as chickens, turkeys, ducks, geese, and pigeons. Although there is a distinct host specificity, some strains have been shown to replicate in different species (McFerran, 1997). For example, experimental studies demonstrated that the FAdV-1 serotype, when inoculated into hamsters, can induce tumoral formations such as fibrosarcoma, hepatoma, and ependymoma (McFerran, 1977; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

The natural reservoirs of EDS '76 are ducks and geese. Infections in these species have been reported worldwide. Chickens of all ages and breeds are susceptible. The disease tends to be more severe in broiler breeders and brown egg-laying breeds. Japanese quails can also be infected. Rarely, respiratory disease or decreased

egg production may be seen in turkeys, ducks, geese, and quails (Smyth & McFerran, 2000).

The virus enters the cell through the binding of fiber proteins to specific receptors on the cell surface. Virions are transported to the nucleus via endosomes, where eosinophilic or basophilic intranuclear inclusion bodies form. Viral DNA replication begins within the first 10 hours of infection (Matthews, 2005; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

It was declared that the neutralizing antibody response in the infected animal usually begins within the first week and reaches its peak by the third week. This humoral response can provide protective immunity following primary infection for approximately 45 days . However, secondary infections with the same serotype may occur after 8 weeks (Swayne, 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Additionally, FAdV infections have been reported to cause reductions in CD4⁺ (helper) and CD8⁺ (cytotoxic) T lymphocytes in the spleen and thymus. Marked atrophy and necrosis have been observed in lymphoid cells in the bursa Fabricius. This immunosuppression facilitates viral spread within the body and predisposes to secondary infections (Haiyilati et al., 2021; Kataria et al., 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

After horizontal transmission, the EDS virus initially replicates at low titers in the nasal mucosa, followed by viremia and replication in lymphoid tissues. The most intense replication occurs in the shell gland mucosa approximately 5 days post-infection. This phase is followed by seroconversion (antibody development), providing important diagnostic clues (Smyth & McFerran, 2000; Merck Veterinary Manual, 2024; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Virus replication in shell gland epithelial cells is characterized by karyomegaly with basophilic or eosinophilic intranuclear inclusions (Abdellatif et al., 2025; Smyth & McFerran, 2000; Merck Veterinary Manual, 2024; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Infected cells degenerate and slough off, temporarily replaced by squamous/cuboidal cells, and later normal pseudostratified ciliated epithelium regenerates. During this process, the mucosa undergoes heterophilic cell infiltration and mixed exudate forms with sloughed epithelium (Smyth & McFerran, 2000; Merck Veterinary Manual, 2024).

The virus can be found in eggshells and contents for 8 to 18 days post-infection, spreading to the environment through oviduct secretions and feces (Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019; Smyth & McFerran, 2000; Merck Veterinary Manual, 2024). However, EDSV does not replicate in intestinal epithelial cells (Smyth & McFerran, 2000; Merck Veterinary Manual, 2024).

4. CLINICAL FINDINGS

Fowl aviadenovirus (FAdV) and *Duckadenovirus* infections cause various clinical disease presentations. The most commonly encountered are classified as Inclusion Body Hepatitis (IBH), Hydropericardium Syndrome (HPS), Muscular Stomach Erosion and Ulcer Syndrome (GEU), and Egg Drop Syndrome (EDS-76) (Anjum et al., 1989; Abe et al., 2001; Zhao et al., 2015; Smyth & McFerran, 2000; Merck Veterinary Manual, 2024; Bayraktar et al., 2024).

4.1 Inclusion Body Hepatitis (IBH)

IBH was first described in the USA in 1963 and is generally observed in 3–6-week-old broiler chickens (Abe et al., 2001; Helmboldt and Frazier, 1963, Hafez, 2009). Clinically, it is characterized by sudden deaths, crouching posture, ruffled feathers, lethargy, and anorexia. Mortality rates range between 5% and 30%,

but when co-infected with immunosuppressive viruses, this rate can increase up to 80% (Pouladi et al., 2024; Grimes et al., 1977; Kataria et al., 2013; Dutta et al., 2017; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Macroscopically, the liver appears pale, swollen, and friable; petechial or ecchymotic hemorrhages can be seen on the liver and striated muscles (Hafez, 2009; McFerran et al., 1976). Histopathological examinations reveal intranuclear inclusion bodies within hepatocyte nuclei (Zadravec et al., 2013; Rahimi et al., 2015; Itakura et al., 1974; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

4.2 Hydropericardium Syndrome (HPS)

HPS was first reported in 1987 in the Karachi region of Pakistan and caused high mortality, severely affecting the national broiler industry (Anjum et al., 1989; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). This disease is typically seen in 2–4-week-old poultry, with FAdV-4 serotype identified as the main causative agent (Anjum et al., 1989; Abe et al., 2001; Kim et al., 2008; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Clinical signs include rapid weight loss, lethargy, ruffled feathers, anorexia, and respiratory distress. Mortality rates vary between 30% and 70% depending on the case; in some outbreaks in China, this rate has reached up to 90% (Zhao et al., 2015; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

At necropsy, accumulation of clear yellow fluid around the heart (hydropericardium), liver enlargement, and edema with urate deposits in the kidneys are observed (Cheema et al., 1989).

4.3 Gross Muscular Erosion and Ulcer Syndrome (GEU)

GEU is mostly associated with the FAdV-1 serotype and has been reported mainly in broiler chicks and young layers. Clinically, it presents with reduced feed intake, growth retardation,

and rarely mortality (Lim et al., 2012; Ono et al., 2003; Swayne, 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Macroscopically, ulcerative black-colored areas and hemorrhagic erosions are observed in the koilin layer of the gizzard (muscular stomach) (Abe et al., 2001; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Histological evaluation reveals intranuclear inclusion bodies containing adenovirus antigen beneath the necrotic areas (Gjevre et al., 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

4.4 Egg Drop Syndrome (EDS-76)

The causative agent of EDS '76 is *Duck atadenovirus A* (*Duck adenovirus 1*, also known as Egg Drop Syndrome virus, EDSV), a double-stranded DNA virus. This virus is classified within the Duck atadenovirus A species and belongs to the genus Atadenovirus. All Duck adenovirus 1 strains studied to date belong to the same serotype. The virus commonly infects wild and domestic ducks as well as geese. Infection evidence has also been found in species such as rams, diving birds, seagulls, owls, storks, swans, and quails. Unlike other avian adenoviruses, EDSV has a strong ability to agglutinate bird erythrocytes. Therefore, the hemagglutination inhibition (HI) test can be used to detect antibodies against the virus (Fitzgerald et al., 2020; Hess, 2020).

The virus can be transmitted via contaminated eggs, equipment (trays, cages, trucks), personnel, and feces. Since the agent can survive in feces for weeks, fecal-oral (horizontal) transmission plays an important role. The virus is found in feces, tracheal and nasal mucosa, kidneys, intestines, and cecal tonsils. Thus, it can be transmitted through all excretions, but the highest viral titer is detected in feces. The virus can also be present in semen, which poses a potential risk in artificial insemination practices (Fitzgerald et al., 2020; Hess, 2020).

Three main clinical forms have been described in chickens (Merck Vet Manual, 2024):

Classic EDS '76: Develops in breeder flocks through vertical transmission. The virus passes to chick progeny through infected eggs, remains latent, and becomes active when the birds reach sexual maturity, shedding through eggs and feces.

Endemic EDS '76: Occurs in commercial laying flocks through horizontal transmission. Contaminated egg collection trays are important sources of infection. Outbreaks are often associated with shared packaging facilities.

Sporadic EDS '76: Rarely seen. Usually transmitted by direct contact with ducks or geese or by using water contaminated with wild waterfowl feces (Merck Vet Manual, 2024; Smyth and McFerran, 2000).

Clinically, there is a sudden drop in egg production, with thin-shelled, misshapen, and colorless eggs, and mucus in feces. Systemic signs are rarely observed. The most prominent finding is the presence of pale, thin-shelled, soft-shelled, or shell-less eggs. Internal egg quality is not affected. A 10–40% reduction in egg numbers has been reported in hens infected during the laying period. Latent infections can be activated especially during stress and may become epidemic (Roberts et al., 2011; McFerran et al., 1978; Merck Vet Manual, 2024; Fitzgerald et al., 2020; Hess, 2020).

Inactivated EDS vaccines for protective purposes are widely used, especially in breeder flocks (Merck Vet Manual, 2024; Fitzgerald et al., 2020; Hess, 2020).

4.5 Importance of Clinical Findings

Recognition of these clinical syndromes is critical for flock health management and maintaining productivity. In addition to

high-mortality conditions such as IBH and HPS, more chronic diseases like EDS can also cause significant economic losses. Therefore, early diagnosis, necropsy evaluation, and laboratory confirmation should be fundamental components of preventive veterinary medicine.

5. DIAGNOSIS

Accurate identification of *Fowl aviadenovirus* (FAdV) infections is crucial for developing effective control strategies targeting the pathogen. The diagnostic process should be conducted through a comprehensive approach including clinical signs, necropsy findings, histopathological evaluation, virus isolation, molecular diagnostic techniques, and serological tests (Hess, 2000; McFerran & Adair, 1977; Swayne, 2013).

5.1 Clinical and Pathological Findings

The clinical signs of the disease are generally nonspecific. In IBH, sudden deaths and pale liver are observed; in HPS, fluid accumulation in the pericardial cavity; and in GEU, ulceration in the gizzard mucosa is notable. Therefore, careful evaluation of macroscopic changes in target organs such as the liver, gizzard, heart, and kidney during necropsy is essential (Helmboldt & Frazier, 1963; Anjum et al., 1989; Ono et al., 2003).

5.2 Histopathological Examination

Histologically, especially in IBH cases, intranuclear inclusion bodies are identified within the nuclei of hepatocytes. These inclusions are highly characteristic of FAdV and serve as one of the first diagnostic clues (Itakura et al., 1974). Similarly, in GEU cases, similar inclusions have been observed in the glandular epithelium of the proventriculus (Abe et al., 2001).

5.3 Virus Isolation

The most suitable samples for FAdV isolation are tissues with high viral replication, such as liver, kidney, spleen, intestinal mucosa, pharynx, and cecal tonsils (McFerran & Adair, 1977; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). These tissues are prepared as 10% suspensions and inoculated into susceptible systems such as primary chicken embryo liver (CEL), chicken embryo kidney (CEK) cells, or LMH cell lines. Additionally, for virus isolation of some serotypes the yolk sac and chorioallantoic membranes of embryonated chicken eggs can be used. Although virus isolation is technically time-consuming, it is still considered the gold standard, especially for the characterization of new strains (Swayne, 2013; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

5.4 Molecular Diagnostic Methods

Molecular analyses of FAdV isolates have revealed significant genetic variation among serotypes. This directly impacts both vaccine efficacy and epidemiological monitoring (Zhao et al., 2015; Çizmecigil et al., 2020).

Today, the most commonly used method for FAdV diagnosis is PCR (Polymerase Chain Reaction). This test is generally performed using primers specific to variable regions of the hexon gene, particularly the L1 loop. Since the L1 region varies at the genotype and serotype levels, it serves as a reliable target for molecular differentiation (Steer et al., 2009; Marek et al., 2010; Meulemans et al., 2001; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Highly sensitive methods such as Nested PCR and Real-Time PCR (qPCR) enable both detection and quantitative analysis (Romanova et al., 2009; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). qPCR tests are especially useful for identifying clinically asymptomatic but virus-carrying individuals (Romanova et al., 2009; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Discrepancies between these loci suggest that combined sequencing approaches may provide

more comprehensive characterization than single-gene PCR assays (Schachner et al., 2016).

In recent years, rapid diagnostic kits based on RAA-CRISPR/Cas12a have been developed for the swift detection of more virulent types like FAdV-4, demonstrating specificity above 98%. Molecular diagnosis can determine serotype by targeting the L1 region of the hexon gene via PCR. Additionally, CRISPR/Cas12a-based diagnostic systems provide highly specific detection of FAdV-4. (Lei et al., 2025).

5.5 Serological Tests

Serologically, virus neutralization test (VNT), ELISA (especially commercially widespread), Dot-ELISA, indirect immunofluorescence assay (IFA), and double immunodiffusion (DID) tests are used for detecting antibodies developed against FAdV (Shamim et al., 2009; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

VNT, in particular, allows differentiation at the serotype level because type-specific antibodies are formed against hexon proteins (McFerran and Adair, 1977; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). However, this test is time-consuming and costly. Therefore, ELISA is considered more practical, especially at the field level.

While Egg Drop Syndrome virus agglutinates erythrocytes, other adenoviruses do not exhibit hemagglutination activity (Hess, 2000).

5.6 Electron Microscopy

Adenovirus particles can be easily identified under an electron microscope due to their typical icosahedral structure. (Russell, 2009). Electron microscopy is useful for identifying adenoviruses at the family or genus level, whereas species and serotype differentiation requires molecular techniques (Hess, 2000; Fenner's Veterinary Virology, 2017).

In summary, clinical and necropsy findings should raise suspicion. Histopathology can reveal characteristic inclusions. PCR-based tests are rapid and reliable. Virus isolation remains important for the identification of new serotypes. Serological tests are used to monitor flock immunity.

6. PROTECTION, CONTROL, AND VACCINATION

Control of fowl aviadenovirus (FAdV) infections is achievable through a comprehensive approach encompassing biosecurity measures, protection of susceptible flocks, prevention of vertical transmission, environmental hygiene, and effective vaccination strategies. Vaccination is the most critical intervention, especially in preventing diseases associated with highly mortal strains (Hess, 2000; Kataria et al., 2013; Romanova et al., 2009; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

In next-generation vaccine research, solutions based on recombinant technologies and prototypes developed from attenuated live strains show promising protective efficacy (De Luca and Hess, 2025).

6.1 Biosecurity and Environmental Control

The effectiveness of biosecurity practices is critical not only for preventing infection but also for limiting the spread of the virus within the farm (Meirhaeghe et al., 2019; Conan et al., 2012).

FAdVs are non-enveloped viruses, making them highly resistant to environmental conditions. The virus can remain viable in feces for weeks. Therefore, thorough poultry house cleaning and appropriate disinfection protocols, adequate ventilation and lighting, visitor and personnel control, as well as regular disinfection of equipment and transport vehicles are critically important (Swayne, 2013). Because fowl adenoviruses can be transmitted vertically, the infection status of breeder flocks plays a

crucial role in the health of progeny flocks (Saifuddin and Wilks, 1991).

6.2 Existing Vaccines

6.2.1 Inactivated Vaccines

Inactivated vaccines, especially those used in breeder chickens, are highly effective in preventing vertical transmission of the infection to offspring. Inactivated vaccines developed against It was declared that FAdV-D and FAdV-E genotypes, administered to breeders at 10 and 17 weeks of age, have provided protection against IBH for approximately up to 50 weeks (Alvarado et al., 2007; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).). Similarly, inactivated HPS vaccines prepared against FAdV-4 are commercially and successfully used in countries such as Pakistan, China, and India (Song et al., 2023; Afzal & Ahmad, 1990; Anjum, 1990; Zhao et al., 2015; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

6.2.2 Live Vaccines

In some regions, the use of live vaccines derived from the FAdV-8b serotype in breeder flocks has been reported to confer protection to the progeny (Takase et al., 1990; Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). However, the risks associated with live vaccines- such as viral shedding and the potential to cause disease in immunosuppressed animals- must be carefully considered. It should also be noted that live vaccines may mask subclinical infections in certain cases (Schonewille et al., 2010).

6.3 Next-Generation Vaccine Studies

In recent years, particularly with the widespread emergence of highly virulent FAdV-4 strains, safer and more effective next-generation vaccine platforms have been under development (Lin et al., 2024).

6.3.1 DNA Vaccines and Subunit Vaccines

The FAdV-4 100K protein has been tested as a vaccine by Shah et al., 2016. Immunization of chickens with recombinant 100K protein induced robust serum antibody responses; however, challenge experiments demonstrated only limited protective efficacy against pathogenic viral infection, with a protection rate of approximately 40%. Molecular characterization revealed that the 100K gene is 2397 bp in length and encodes a recombinant protein with an estimated molecular weight of 95 kDa. Despite its critical role in the intracellular transport and proper folding of viral capsid proteins during replication, the 100K protein is not exposed on the viral surface at any stage of the infection cycle, which likely accounts for its limited capacity to elicit a protective immune response (Shah et al., 2016).

6.3.2 Cell Culture and Embryo-Adapted Attenuated Vaccines

Virulent FAdV-4 isolates have been attenuated in the QT35 cell line to develop live vaccine prototypes. Chickens vaccinated with these strains have been shown to be protected against FAdV-4 infections (Schonewille et al., 2010; Şahindokuyucu ve Yazıcı, 2019).

7. CONCLUSION

Fowl aviadenovirus (FAdV) infections cause serious clinical syndromes in both broiler and layer flocks, leading to significant economic losses in the poultry industry. Diseases such as Inclusion Body Hepatitis (IBH), Hydropericardium Syndrome (HPS), Muscular Stomach Erosion-Ulcer Syndrome (GEU), and Egg Drop Syndrome (EDS-76) notably impact flock health and productivity.

The virus's resilience to environmental conditions, its ability for vertical transmission, and serotype diversity complicate its control. In this context, biosecurity measures alone are

insufficient to combat FAdV infections. Vaccination programs play a vital role, especially in breeder flocks, both in preventing the disease and in blocking vertical transmission (Hess, 2000; Saifuddin & Wilks, 1991).

Currently, although commonly used inactivated and live vaccines on the market are effective against certain genotypes, cases have been reported where they fail to provide cross-protection and are insufficient against emerging strains (Zhao et al., 2015). Therefore, developing autogenous vaccines based on locally circulating, molecularly characterized isolates should be one of the primary objectives (Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019).

Comprehensive molecular epidemiological studies on the serotype distribution of FAdV should be conducted (Şahindokuyucu and Yazıcı, 2019). Vaccination of breeder flocks must be made mandatory to protect flock health and prevent vertical transmission. The production of autogenous vaccines based on FAdV isolates specific to countries should be encouraged. Next-generation vaccine technologies (DNA, subunit, vector-based) should be supported by research funding within the country.

Rapid PCR and CRISPR-Cas-based diagnostic systems should be made available for field use (Lei et al., 2025). Considering the immunosuppressive effect of FAdV (Niu et al., 2019), combined strategies should be planned against co-infecting agents such as CIAV and IBDV.

Training and field guidance should be enhanced for veterinarians and producers.

In conclusion, effective control of FAdV infections can only be achieved through a comprehensive strategy that encompasses not only biosecurity and vaccination but also field surveillance, molecular characterization, rapid diagnosis, and collaborative research and development efforts.

8. ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL MEDICINAL PLANTS

In the second half of the 20th century, the antiviral activities of certain plant-derived tannins and flavonoids were discovered. Among these are polyphenols from *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*), and triterpenoids such as dammaradienol and ursolic acid. Flavonoids have rapidly been shown to possess antiviral activity against a wide range of viruses, including adenoviruses, Rous sarcoma virus, Sindbis virus, pseudorabies virus, severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), respiratory syncytial virus, and influenza A virus H1N1. Epigallocatechin gallate (EGCG), a compound derived from the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Theaceae*), has demonstrated broad-spectrum antiviral activity against both DNA and RNA viruses. Various plants such as *Vaccinium angustifolium* Aiton (*Ericaceae*), *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*), and *Cinnamomum* species (*Lauraceae*) contain procyanidins, which have been shown to inhibit the replication of influenza A virus at multiple stages of its life cycle. However, studies on the bioavailability and bioequivalence of polyphenols in humans have revealed considerable variability in the absorption of different polyphenols following digestion. Gallic acid and isoflavones are among the most efficiently absorbed polyphenols, followed by catechins, flavanones, and quercetin glucosides; however, their absorption rates vary. Proanthocyanidins, galloylated tea catechins, and anthocyanins exhibit the lowest absorption levels. Nevertheless, these data cannot be directly extrapolated to animals. The bioavailability and bioequivalence of polyphenolic compounds must be studied separately for each animal species. The prominent antiviral mechanisms of these plant-derived compounds include the inhibition of viral entry and replication in host cells through various pathways. Certain phytochemicals have been shown to interfere

with cellular signal transduction by inhibiting receptor kinases. Challenges in antiviral drug therapies include low efficacy, cytotoxic effects, and the development of viral resistance. In the past decade, the in vitro efficacy of numerous biologically active substances with antiviral properties has been demonstrated through newly developed assay methods. While many studies have investigated the antiviral effects of plant extracts against human viruses—particularly HIV and herpesviruses—there is a notable scarcity of similar studies focusing on animal viruses (Jaydari et al., 2023; Zitterl-Eglseer and Marschik, 2020).

Green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae) is one of the most widely consumed beverages worldwide and is derived from the buds of the *Camellia sinensis* plant. The primary active constituents of green tea are catechins, a group of polyphenolic compounds. These compounds, along with other bioactive components present in green tea, have been reported to activate host defense mechanisms against bacteria, fungi, and viruses. Owing to its widespread consumption, the potential biological effects of green tea have been extensively studied both in vitro and in vivo, drawing considerable attention as a potential agent for reducing the risk of various diseases. Green tea is a non-fermented type of tea, processed by steaming or pan-firing the leaves to inactivate enzymatic activity. The major catechin compounds found in green tea include epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECG), and gallocatechin gallate (GCG). The polyphenols in green tea, particularly catechins, exhibit a wide range of biological and pharmacological properties, including antioxidant, antibacterial, anticancer, and antiviral activities. The galloyl group present in catechins has been shown to inhibit the endonuclease activity of the RNA polymerase enzyme of the influenza virus. The maturation, infectivity, and disassembly of adenoviruses are largely dependent

on the proper function of a viral protease known as adenain. This suggests that adenoviral protease may serve as a promising target for the development of antiviral agents. Both green tea and its major constituent EGCG have demonstrated antiviral activity against human adenovirus type 2 (HAdV-2) in vitro through multiple mechanisms, including direct inactivation of viral particles, inhibition of intracellular viral replication, and suppression of adenain activity. Moreover, green tea extract (GTE) has been shown to restore the normal histological appearance of testicular tissue in cases of nicotine-induced toxicity. With respect to hepatic effects, GTE caused minimal macroscopic, pathological, and histopathological alterations, supporting findings by Avwioro et al. (2010), who reported no adverse effects on liver histology or biochemical markers. GTE has exhibited maximal antiviral activity in both in vitro cell culture studies and in vivo experiments conducted in broiler chickens. These data provide a scientific basis for the potential use of GTE in poultry health management (Aslam et al., 2014).

A study conducted in Iran reported a strong antiviral effect of *Chelidonium majus* against human adenovirus type 5 (HAdV-5). In another study from Brazil, the ethanol extracts of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon nardus* were evaluated for their activity against HAdV-5. The results showed that these plant extracts were effective at an average concentration of 75 µg/mL [136]. In a study from Pakistan, *Ocimum basilicum* demonstrated antiviral activity against multiple adenovirus types, with effective concentrations of 74.1 and >1000 µg/mL for HAdV-3, 129.6 and >200 µg/mL for HAdV-8, and 91.9 and 129.1 µg/mL for HAdV-11. These findings collectively suggest that various plant species exhibit antiviral activity against different adenovirus types (Mohammed et al., 2023).

Green tea catechins block adenovirus proteases, which are involved in cancer spread. Green tea and EGCG in particular are effectively absorbed by the cells and prevent one or more of the late stages of viral infection against adenovirus. According to, green tea and its separated catechins have antiviral activity against the fowl adenovirus type-4 when tested in vitro in cell culture and in vivo against an IBH-HPS virus challenge in broiler chickens (Aslam et al., 2014; Ullah ve ark., 2024).

Numerous plants have been reported to exhibit antibacterial potential against *Salmonella* species. The methanol extract obtained from the stem bark of *Sarcocephalus latifolius*, native to West Africa, demonstrated strong inhibitory activity against *Salmonella* Typhi with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 32 µg/mL. The essential oils of *Tanacetum polycephalum* have shown notable antibacterial activity with remarkably low MIC values ranging from 0.36 to 10 µg/mL against various pathogens, including *Salmonella* Typhi. Similarly, the essential oils of *Artemisia indica* have been found effective against Gram-negative bacteria, with MIC values ranging from 32 to 128 µg/mL. The widely used essential oil of *Ocimum basilicum* (basil) inhibited *Salmonella* Typhimurium with MIC values ranging between 0.6 and 50 µg/mL, while the essential oil of *Mentha × piperita* (peppermint) exhibited strong activity with MIC values ranging from 0.5 to 8 µg/mL. Additionally, the essential oil of *Glycyrrhiza triphylla* demonstrated moderate activity against *Salmonella* Typhi with an MIC value of 87 µg/mL, and leaf extracts of *Psidium guajava* (guava) showed activity at an MIC of 78 µg/mL. Furthermore, essential oils of culinary herbs such as thyme, coriander, basil, mint, and clove have been reported to suppress the growth of *Salmonella* spp. when used as preservatives in food products (Chassagne et al., 2021). In a study by Babacan et al. (2012), the first protocol employed the disc diffusion method using

antibiogram discs containing different concentrations of thyme extract. At a 1:10 dilution, inhibition zone diameters were measured as 15 mm for *Salmonella* Gallinarum, 19 mm for *Salmonella* Enteritidis, and 16 mm for *Salmonella* Typhimurium. In the second protocol of the same study, thyme extract was added directly to the culture medium at concentrations of 20 and 30 $\mu\text{L/mL}$, and bacterial growth was evaluated. Colony counts for *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* were reported as 952 and 536, and 1600 and 440, respectively, for the 20 and 30 $\mu\text{L/mL}$ concentrations. Based on these results, Babacan et al. (2012) concluded that thyme extract exhibits antibacterial activity against various *Salmonella* serotypes.

ACKNOWLEDGE

The section of this chapter on adenovirus infections in poultry is based on the master's seminar conducted by the second author.

REFERENCES

Abdellatif DM, El-Sawah AA, Elkady MF, Ali A, Abdelaziz K, Shany SA. (2025). Widespread Detection of Fowl Adenovirus Serotype 2/11 Species D Among Cases of Inclusion Body Hepatitis–Hydropericardium Syndrome in Chickens in Egypt. *Microorganisms*, 13(5), 1107.

Abe T, Nakamura K, Tojo T, Yuasa N. (2001). Gizzard erosion in broiler chicks by group I avian adenovirus. *Avian Diseases*, 45(1), 234–239.

Afzal M, Ahmad I. (1990). Efficacy of an inactivated vaccine against hydropericardium syndrome in broilers. *Veterinary Record*, 127(20), 502.

Alvarado IR, Villegas P, El-Attrache J, Jensen E, Rosales G, Perozo F, ve Purvis LB (2007) Genetic characterization, pathogenicity, and protection studies with an avian adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. *Avian Dis*, 51(1), 27–32.

Anjum, AD, Sabri MA, Iqbal, Z. (1989). Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. *Veterinary Record*, 124(10), 247–248.

Anjum AD. (1990) Experimental transmission of hydropericardium syndrome and protection against it in commercial broiler chickens. *Avian Pathol*, 19, 655–60.

Aslam A, Mahmood MS, Hussain I, Khan MN. (2014). Evaluation of antiviral effect of epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate and green tea extract against fowl adenovirus-4. *Pakistan Journal Zoology*, 46, 1283-94.

Avwioro G, Iyiola S, Aghoghovwia B. (2010). Histological and biochemical markers of the liver of Wistar rats on subchronic

oral administration of green tea. *North American Journal of Medical Sciences*, 2(8), 376.

Babacan, O., Cengiz, S., Akan, M. (2012). Detection of antibacterial effect of oregano plant on various *Salmonella* serotypes. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 59(2), 103-106.

Bayraktar E, Aydın O, Tali HE, Yilmaz SG, Yilmaz A, Turan N, Bamac OE, Ozturk A, Erdem A, Kelleci M, Sadeyen JR, Chang P, Yilmaz H, Iqbal, M. (2024). Molecular characterisation of fowl adenovirus associated with hydropericardium hepatitis syndrome in broiler and layer breeders in Azerbaijan. *BMC veterinary research*, 20(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04081-0>

Chassagne, F., Samarakoon, T., Porras, G., Lyles, J. T., Dettweiler, M., Marquez, L., & Quave, C. L. (2021). A systematic review of plants with antibacterial activities: A taxonomic and phylogenetic perspective. *Frontiers in pharmacology*, 11, 586548.

Cheema A, Ahmad J, Afzal M (1989) An adenovirus infection of poultry in Pakistan. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 8, 789-795.

Conan A, Goutard FL, Sorn S, Vong S. (2012). Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries: a systematic review. *BMC veterinary research*, 8(1), 240.

Cowen B, Mitchell GB, Calnek BW (1978) An adenovirus survey of poultry flocks during the growing and laying periods. *Avian Dis*, 22(1), 115–21.

Cizmecigil UY, Umar S, Yilmaz A, Bayraktar E, Turan N, Tali B, & Yilmaz H. (2020). Characterisation of fowl adenovirus (FAdV-8b) strain concerning the geographic analysis and pathological lesions associated with inclusion body hepatitis in

broiler flocks in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 64(2), 231.

De Luca C, Hess M. (2025). Vaccination strategies to protect chickens from fowl adenovirus (FAdV)-induced diseases: A comprehensive review. *Vaccine*, 43, 126496.

Dutta B, Deka P, Gogoi SM, Sarmah M, Bora MK, Pathak DC. (2017). Pathology of inclusion body hepatitis hydropericardium syndrome (IBH-HPS) in broiler chicken. *International Journal of Chemical Studies*, 5(3), 458-461.

Elbestawy AR, Ibrahim M, Hammam H, Noreldin AE, Bahrawy AE, & Ellakany HF. (2020). Molecular characterization of fowl adenovirus D species in broiler chickens with inclusion body hepatitis in Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 64(1).

Fenner's Veterinary Virology Fifth Edition. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00001-5> ©2017 Elsevier Inc.

Fitzgerald SD, Rautenschlein S., Mahsoub HM, Pierson FW, Reed WM, Jack SW. (2020). Adenovirus infections. In Diseases of poultry, Editor(s):David E. Swayne, Martine Boulianne, Catherine M. Logue, Larry R. McDougald, Venugopal Nair, David L. Suarez, Sjaak de Wit, Tom Grimes, Deirdre Johnson, Michelle Kromm, Teguh Yodiantara Prajitno, Ian Rubinoff, Guillermo Zavala. John Wiley & Sons, Inc. 321-363. Print ISBN:9781119371168, Online ISBN:9781119371199 DOI:10.1002/9781119371199

Gelderblom H, Maichle-Lauppe I (1982) The fibers of fowl adenoviruses. *Arch Virol*, 72(4), 289–98.

Gjevre AG, Kaldhusdal M, Eriksen GS (2013) Gizzard erosion and ulceration syndrome in chickens and turkeys: a review

of causal or predisposing factors. *Avian Pathol*, 42(4), 297-303.
doi: 10.1080/03079457.2013.817665.

Gomis S, Goodhope R, Ojkic D, & Willson P. (2006). Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. *Avian diseases*, 50(4), 550-555.

Grimes TM, King DJ, Kleven SH, Fletcher OJ (1977). Involvement of a type-8 avian adenovirus in the etiology of inclusion body hepatitis. *Avian Dis*, 21(1), 26–38.

Hafez, HM (2009). Avian Adenoviruses Infections with Special Attention to Inclusion Body Hepatitis/Hydropericardium. *Pak. J. Zool*, 41, 269-276.

Haiyilati A, Li X, Zheng SJ. (2021). Fowl Adenovirus: Pathogenesis and Control. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 11, 566-589.

Helmboldt CF, Frazier MN (1963) Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. *Avian Dis*, 7, 446-450.

Hess, M. (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian pathology*, 29(3), 195-206.

Itakura C, Yasuba M, Goto M (1974) Histopathological studies on inclusion body hepatitis in broiler chickens. *Nihon Juigaku Zasshi*, 36(4), 329–40.

Jaydari A, Sobhani E, Mehrabi S. (2023). The Antiviral Potential of Medicinal Plants in Treating Viral Infections. *Herbal Medicines Journal (Herb Med J)*, 8(3), 156-169.

Kataria, J. M., Dhama, K., Nagarajan, S., Chakraborty, S., Kaushal, A., & Deb, R. (2013). Fowl adenoviruses causing hydropericardium syndrome in poultry. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 1(4S), 5-13.

Kim JN, Byun SH, Kim MJ, Kim JJ, Sung HW, Mo IP. (2008). Outbreaks of hydropericardium syndrome and molecular characterization of Korean fowl adenoviral isolates. *Avian diseases*, 52(3), 526-530.

Lei M, Wang X, Zhang M, Zhu M. (2025). Rapid detection of FAdV-4 by one-tube RPA-CRISPR/Cas12a assay. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1541943.

Lim TH, Kim BY, Kim MS, Jang JH, Lee DH, Kwon YK., Song CS. (2012). Outbreak of gizzard erosion associated with fowl adenovirus infection in Korea. *Poultry science*, 91(5), 1113-1117.

Lin Y, Jiang W, Ma L, Zhang J, Tang Y, Kan Q, Xiong H, Wu J, Zhang J, Niu Y, Zhang W, Wang S, Wang W, Xie Q, Li T, Wan Z, Gao W, Shao H, Qin A, Ye J. (2024). Protective Efficacy of an Inactivated Recombinant Serotype 4 Fowl Adenovirus Against Duck Adenovirus 3 in Muscovy Duck. *Vaccines*, 12(12), 1357. <https://doi.org/10.3390/vaccines12121357>

Marek A, Kosiol C, Harrach B, Kaján GL, Schlötterer C. & Hess M (2013) The first whole genome sequence of a Fowl adenovirus B strain enables interspecies comparisons within the genus Aviadenovirus. *Vet Microbiol*, 166, 250-256.

Matthews TD. (2005) Protection of Broiler Breeders Against a Strain of Fowl Adenovirus and Characterization of Several Fowl Adenovirus Serotypes. Thesis submitted to the Graduate Faculty of The University of Georgia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree. B.S.A., The University of Georgia, 2003.

McFerran JB, McCracken RM, Connor TJ, Evans RT (1976) Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol*, 5(4), 315–24.

McFerran JB, & Adair BM. (1977). Avian adenoviruses—A review. *Avian Pathology*, 6(3), 189–217.

McFerran JB (1997) Group I adenovirus infections. In: Diseases of Poultry. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR ve Saif YM. eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 608-620. 1997.

Meirhaeghe HV, Schwarz A, Dewulf J, Immerseel FV, Vanbeselaere B, & Gussem MD. (2019). Transmission of poultry diseases and biosecurity in poultry production. In *Biosecurity in animal production and veterinary medicine: from principles to practice* (pp. 329-356). Wallingford UK: CABI.

Meulemans G, Boschmans M, Van den Berg TP, & Decaesstecker M. (2001). Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathology*, 30(6), 655-660.

Merck Veterinary Manual. (2024). Egg Drop Syndrome '76. Access: <https://www.merckvetmanual.com/poultry/egg-drop-syndrome-76/egg-drop-syndrome-76>.

Mohammed FS, Uysal I, Sevindik M. (2023). A review on antiviral plants effective against different virus types. *Prospects in Pharmaceutical Sciences*, 21(2), 1-21.

Niu Y, Sun Q, Shi Y, Ding Y, Li Z, Sun Y, Liu S. (2019). Immunosuppressive potential of fowl adenovirus serotype 4. *Poultry Science*, 98(9), 3514-3522.

Ono M, Okuda Y, Yazawa S, Imai Y, Shibata I, Sato S, ve Okada K (2003). Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. *Vet Pathol*, 40(3), 294–303.

Pouladi I, Najafi H, Jaydari A. (2024). Research Note: Overview of fowl adenovirus serotype 4: Structure, pathogenicity,

and progress in vaccine development. *Poultry Science*, 103(4), 103479.

Rahimi M, Minoosh Siavosh Haghighi Z. (2015). Adenovirus-like inclusion body hepatitis in a flock of broiler chickens in Kermanshah province, Iran. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 6(1), 95–98.

Roberts JR, Souillard R, & Bertin J. (2011). Avian diseases which affect egg production and quality. In *Improving the safety and quality of eggs and egg products* (pp. 376-393). Woodhead Publishing.

Romanova N, Corredor JC, & Nagy É. (2009). Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *Journal of virological methods*, 159(1), 58-63.

Russell WC (2009) Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90(Pt1), 1–20.

Saifuddin M, Wilks CR (1991) Vertical transmission of avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis. *N Z Vet J*, 39(2), 50–2.

Schachner A, Marek A, Grafl B, Hess M. (2016). Detailed molecular analyses of the hexon loop–1 and fiber genes of fowl aviadenovirus B, D and E reference strains and field isolates reveal close relationship to their respective type strains. *Veterinary Microbiology*, 186, 13–20.

Schachner A, Matos M, Graf B, Hess M. (2018). Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a review on the current global situation. *Avian Pathology*, 47(2), 111-126.

Schonewille E, Jaspers R, Paul G, ve Hess M (2010) Specificpathogen-free chickens vaccinated with a live FAdV-4

vaccine are fully protected against a severe challenge even in their absence of neutralizing antibodies. *Avian Dis*, 54(2), 905–10.

Shah MS, Ashraf A, Khan MI, Rahman M, Habib M, Chughtai MI, Qureshi JA. (2017). Fowl adenovirus: history, emergence, biology and development of a vaccine against hydropericardium syndrome. *Archives of virology*, 162(7), 1833–1843.

Shamim S, Rehmani SF, Siddiqi AA, Qureshi MA ve Khan TA (2009) Characterization of avian adenovirus type-4 causing hydro-pericardium syndrome in broilers in Karachi, Pakistan. *Iranian J. Vet. Res., Shiraz University*, 1, 38–43.

Smyth JA and McFerran JB. (2000). Avian adenoviruses. *Revue Scientifique et Technique*, 19, 589–601.

Song C, Zhao S, Song M, Qiao Q, Yang P, Wang B, Zhao J. (2023). An Inactivated Novel Trivalent Vaccine Provides Complete Protection against FAdV-4 Causing Hepatitis-Hydropericardium Syndrome and FAdV-8b/11 Causing Inclusion Body Hepatitis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023(1), 5122382.

Steer PA, Kirkpatrick NC, O'Rourke D, Noormohammadi AH, Browning GF. (2009). Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene. *Avian Diseases*, 53(4), 502–507.

Swayne, D. E. (Ed.). (2013). *Diseases of Poultry* (13th ed.). Wiley-Blackwell.

Şahindokuyucu İ, Yazıcı Z. (2019). An Overview of Poultry Adenovirus Infections: Fowl Aviadenovirus Infections. *Turkish Veterinary Journal*, 1(1), 30-41.

Takase K, Yoshinaga N, Egashira T, Uchimura T, Yamamoto M (1990) Avian adenovirus isolated from pigeons affected with inclusion body hepatitis. *Nippon Juigaku Zasshi*, 52(2):207–15.

Tan PK, Michou AI, Bergelson JM, Cotten M (2001) Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins. *J Gen Virol*, 82(Pt 6), 1465–72.

Toro H, Gonzalez O, Escobar C, Cerda L, Morales MA, Gonzalez C (2001) Vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus. *Avian Disease*, 45(1):215–22.

Ullah A, Ramzan M, Hussain J, Waqas M, Hameed S, Awais M. (2024). Use of botanicals for prevention and treatment of different poultry diseases. *Complementary and alternative medicine: Botanicals/homeopathy/herbal medicine*, 65-75.

Zadravec M, Slavec B, Krapež U, Kajan GL, Račnik J, Juntos P, Zorman-Rojs O. (2013). Inclusion body hepatitis (IBH) outbreak associated with fowl adenovirus type 8b in broilers. *Acta veterinaria*, 63(1), 101-110.

Zitterl-Eglseer K, Marschik T. (2020). Antiviral medicinal plants of veterinary importance: a literature review. *Planta Medica*, 86(15), 1058-1072.

Zhang H, Jin W, Ding K, Cheng X, Sun Y, Wang J, Zhang C. (2017). Genetic characterization of fowl adenovirus strains isolated from poultry in China. *Avian Diseases*, 61(3), 341-346.

Zhao J, Zhong QI, Zhao Y, Hu YX, Zhang GZ. (2015). Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China. *Plos one*, 10(7), e0133073.

BÖLÜM 6

ANTIBACTERIAL PLANTS AND ANTIBACTERIAL NANOPARTICLES: THEIR USE IN VETERINARY MEDICINE

ORKUN BABACAN¹

1. Antibacterial Plants Used in Veterinary Medicine

1.1 Introduction

The global up-trend of antimicrobial resistance in animal pathogens (for example, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Salmonella* spp.) is compromising the efficacy of standard veterinary antibiotics and increasing the urgency for alternative strategies (Saeed et al., 2024). Plant-derived compounds are receiving increasing attention because of their multiple mechanisms of action (membrane disruption, enzyme inhibition, anti-biofilm, quorum-sensing interference) and potential for synergy with conventional antimicrobials (Chassagne et al., 2021). In veterinary contexts, especially for food-producing animals, botanicals may contribute to antimicrobial stewardship by reducing antibiotic use and mitigating

¹ Assoc. Prof. Dr., Balıkesir University, Kepsut Vocational School, Department of Veterinary, Laboratory and Veterinary Health Program, ORCID: 0000-0003-0258-1825

residue/resistance issues (Wynn & Fougère, 2009). However, despite promising in vitro findings, translation to routine veterinary clinical practice is still limited by standardisation, formulation, dosing, species differences and regulatory gaps (Caneschi et al., 2023). This chapter reviews and synthesises the evidence, aiming to inform veterinary researchers and clinicians about the state of the art, potential applications, limitations and future directions.

1.2. Mechanisms of Antibacterial Action

Understanding the mechanisms by which plant-derived substances exert antibacterial effects is essential for rational veterinary application.

1.2.1 Membrane Disruption and Permeability

Essential oil monoterpenes (e.g., carvacrol, thymol, α -pinene) often cause perturbation of bacterial membranes, increasing permeability, causing leakage of cytoplasmic contents and ultimately cell death. This is relevant for Gram-positive as well as some Gram-negative veterinary pathogens, although the latter often require higher concentrations (Caneschi et al., 2023).

1.2.2 Enzyme Inhibition and Protein Binding

Polyphenolic compounds, tannins and flavonoids can bind bacterial proteins/enzymes, inhibit metabolic pathways and impair growth. For example, natural flavones showed inhibitory activity against bovine mastitis pathogen *Klebsiella oxytoca* by interacting with bacterial DNA gyrase, according to Haj Hasan et al. (2024).

1.2.3 Quorum Sensing, Biofilm Disruption and Anti-Virulence Effect

Biofilms and quorum-sensing play a key role in chronic veterinary infections (e.g., mastitis, wound infections). Some phytochemicals interfere with biofilm formation or quorum-sensing

circuits, thereby enhancing antimicrobial action or reducing virulence (Chassagne et al., 2021).

1.2.4 Synergy with Conventional Antibiotics

Several plant extracts have been shown to lower the MIC of conventional antibiotics when used in combination, offering potential to reduce antibiotic dose and delay resistance development (De Fazio et al., 2024).

1.2.5 Immunomodulation and Anti-inflammation

While not strictly antibacterial, many plant extracts exert immunomodulatory or anti-inflammatory effects, which may support the host response to bacterial infection and aid healing (Wynn & Fougère, 2009). Such effects may make botanicals particularly useful as adjuncts, especially in complex infections.

1.2.6 Considerations for Veterinary Use

It is important to note that in many studies, the in vitro concentration required for activity is much higher than practical doses in animals; pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) data in veterinary species are often lacking. Additionally, species-specific differences (ruminants vs monogastrics vs companion animals) mean that dosing/regimen cannot simply be extrapolated from humans (Caneschi et al., 2023).

1.3. Key Plants, Extracts and Products with Veterinary-Relevant Evidence

Below is a table of selected plants/extracts with documented antibacterial activity relevant for veterinary medicine.

Table 1. Selected plant species/products with veterinary-relevant antibacterial evidence

Plant (bold)	Main active compounds	Veterinary target/application	References
Origanum vulgare (oregano)	Carvacrol, thymol (phenolic monoterpenes)	Mastitis pathogens (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Strong in vitro antibacterial activity (Caneschi et al., 2023)
Thymus vulgaris (thyme)	Thymol, carvacrol	Skin/wound and mastitis pathogens	Effective for antimicrobial actions (Caneschi et al., 2023)
Eucalyptus spp. (<i>E. globulus</i>)	1,8-cineole (eucalyptol)	Respiratory and dermal pathogens	Antibacterial and antibiofilm potential (Mezzasalma et al., 2025)
Allium sativum (garlic)	Allicin, ajoene	MDR <i>Salmonella</i> spp.	Antibiofilm and antibacterial effects (El-Demerdash et al., 2023)
Psidium guajava (guava)	Flavonoids, tannins	Support potential us for wound associated isolates <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	Antibacterial effective (Jia et al., 2025)
Aloe vera	Anthraquinones, polysaccharides	Wound and skin infections	Antimicrobial and wound-healing properties (Khan et al., 2025)
Syzygium aromaticum (clove)	Eugenol	Against <i>S. aureus</i>	Antiseptic potential (Caneschi et al., 2023)
Propolis	Flavonoids, phenolic acids	Mastitis (intramammary/topical), wound infections	Accelerates healing in dairy cows (Pinheiro

			Machado et al., 2019)
Herbal essential oils and PFAs (various)	Carvacrol, thymol, cinnamaldehyde, allicin	Gut health and pathogen reduction	Performance enhancement and antibacterial effects (Wang et al., 2024; Aminullah et al., 2025)
Natural flavones (16 compounds)	Flavone skeletons	Bovine mastitis pathogens (in vitro)	Flavones effective against <i>Klebsiella oxytoca</i> (Haj Hasan et al., 2024)

Additional commentary:

The study by Haj Hasan et al. (2024) on natural flavones against bovine mastitis pathogen *K. oxytoca* is a good example of translating phytochemistry + microbiology toward veterinary pathogens.

The review by Aminullah et al. (2025) on PFAs in poultry emphasises the prophylactic strategy rather than direct treatment of overt infection.

The field of “nano-enabled phytogetic feed additives” (Anwar, 2025) indicates the emerging formulation/technology component.

Yusuf et al. (2022) found that methanolic extracts of four medicinal plants significantly inhibited *S. aureus* isolated from dairy-cows with mastitis.

1.4. Veterinary Applications and Evidence

1.4.1 Mastitis in Dairy Ruminants

Mastitis remains one of the most prevalent and costly diseases in dairy cattle and small ruminants. Persistent infections, antibiotic resistance, and residues pose serious challenges. Botanical antibacterials offer potential for intramammary or topical adjunct use. For example, the study by do Nascimento et al. (2025) evaluated teat-dip formulations based on plant extracts (from *Carica papaya*, *Aloe barbadensis*, *Carapa guianensis*, *Copaifera officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Stryphnodendron barbatiman*) and found in vivo antimicrobial efficacy showed comparable to conventional iodine and hydrogen-peroxide based applications (do Nascimento et al., 2025). Furthermore, conceptual reviews (Kaseke et al., 2023) highlight the need for standardised formulations, intramammary dosing studies, and field trials in dairy systems. The flavone study (Haj Hasan et al., 2024) illustrates that even well-defined phytochemicals can show activity against bovine mastitis pathogens in vitro, but in-animal validation is still lacking.

Robledo-Díaz et al. (2025) characterized ethanolic extracts of *Psidium guajava*, *Carica papaya* and others, showing strong activity against bovine mastitis isolates, underscoring the global interest in plant extracts for intramammary use.

From a clinical perspective, might be consider incorporating plant-based teat dips, or adjuncts to antibiotic therapy in subclinical mastitis, provided that product formulation, dosing, residue/withdrawal data and safety are well defined.

1.4.2 Skin/Wound Infections and Dermatology

In companion animals (dogs, cats) and production animals, wound infections (post-surgery, trauma), dermatologic infections (pyoderma, otitis externa) increasingly involve antimicrobial resistance. Plant-derived antibacterials (e.g., thyme, oregano, clove, aloe vera, propolis) may serve as topical antiseptics or adjuncts to systemic therapy. The dual antimicrobial plus wound-healing (anti-

inflammatory) effect is appealing. Nevertheless, caution is required especially in cats and exotic species due to essential oil sensitivity (Caneschi et al., 2023).

1.4.3 Enteric and Respiratory Infections in Production Animals

Enteric and respiratory infections in poultry, pigs, calves and lambs are significant in terms of morbidity, mortality, economic loss and antibiotic use. Botanical extracts and phytogenic feed additives are being studied for their antimicrobial, gut-modulatory, immune-stimulating and performance-enhancing effects. For instance, Yusuf et al. (2022) evaluated methanolic extracts of four medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and found promising in vitro activity (Yusuf et al., 2022). The review by Aminullah et al. (2025) focuses on PFAs in poultry, summarising their antimicrobial, antioxidative and immune-modulatory properties (Aminullah et al., 2025). In a broiler study in 2025 using a PFA containing carvacrol and cinnamaldehyde, improved feed conversion ratio and gut morphology were observed (Anwar, 2025). Moreover, Jia et al. (2025) evaluated medicinal plant extracts against septic-animal wound isolates and found encouraging antibacterial activity, which supports potential use of botanicals.

Thus, botanicals in feed or water may contribute to reduced pathogen burden, may be help to improved gut health, fewer antibiotics, but clear dose–response, safety, species specificity and regulatory compliance must be ensured.

1.4.4 Prophylaxis and Feed Additives

Beyond treatment, botanicals are increasingly used prophylactically to support health and reduce antibiotic dependency. Phytogenic feed additives (PFAs), containing herbs, spices, essential oils or their combinations, are being marketed for

poultry, pigs and ruminants to improve gut health, immune status, feed conversion and reduce pathogen load (Wang et al., 2024; Anwar, 2025). For example, the review by Wang et al. (2024) summarised the decade-long literature on PFAs as antibiotic alternatives. Another review by Anwar (2025) on nano-enabled PFAs documents advanced formulation strategies. However, many of these studies focus on growth/performance rather than direct antibacterial effect against clinical infections. Implementation as part of antimicrobial stewardship in veterinary production systems requires robust field data, cost–benefit analysis and regulatory support. In poultry production, Aminullah et al. (2025) reviewed the antimicrobial, antioxidative and immunomodulatory roles of phytogenic feed additives and suggested their role as antibiotic alternatives.

Among the most promising options are phytogenic feed additives (PFAs), which are plant-derived substances obtained from herbs, spices, and essential oils. These compounds contain diverse bioactive molecules such as terpenes, phenolics, flavonoids, and alkaloids that can enhance animal performance through antimicrobial, antioxidant, digestive, and immunomodulatory actions. Phytogenic additives have been reported to improve nutrient digestibility, regulate gut microbiota, strengthen the immune system, and enhance the quality of poultry meat and eggs. Their multifaceted effects are attributed to the synergistic interactions between different plant constituents, which may promote intestinal health and nutrient utilization. However, the literature also reveals inconsistencies among studies, with variable outcomes depending on the plant species used, extraction method, dosage, feed formulation, and environmental conditions (Abdelli et al., 2021).

One of the main challenges highlighted in this context is the lack of standardization and quality control in commercial

phytogenic products. The concentration and stability of active components often fluctuate due to differences in plant origin, harvest period, and processing. Furthermore, the volatility of essential oils can reduce their efficacy during feed preparation and storage. Therefore, modern formulation technologies such as microencapsulation and nanoemulsion are being explored to enhance the stability and targeted delivery of these bioactive compounds (Abdelli et al., 2021).

Despite these challenges, phytogenic feed additives may represent a key strategy for reducing antibiotic use in poultry production systems. Their integration into feeding programs aligns with the One Health concept by contributing to antimicrobial stewardship and food safety. Continued research should focus on clarifying mechanisms of action, optimizing dosage, and conducting large-scale field trials to confirm their practical benefits and cost-effectiveness in commercial poultry operations (Abdelli et al., 2021).

1.5. Safety, Standardisation, Dosing and Regulatory Considerations

1.5.1 Species-Specific Safety

Not all botanical products are safe in all species. Companion animals (especially cats), exotic species, neonates and food-producing animals each have specific metabolism and sensitivity. For instance, essential oils may be toxic to cats via hepatic metabolism differences (Caneschi et al., 2023). Before clinical use, species-specific toxicology, dose tolerance and safety monitoring are needed.

1.5.2 Standardisation of Plant Products

One of the major barriers to routine veterinary use is lack of standardisation. Plant chemical composition varies by cultivar,

harvest time, part of plant used, extraction method, formulation, storage, age of extract etc. Without consistency in active constituents (e.g., carvacrol content in oregano EO), reproducibility and dosing guidance is problematic (De Fazio et al., 2024). Standardised manufacturing, validated assays and quantification of main bioactive constituents are essential for veterinary translation.

1.5.3 Dosing, Route of Administration and Formulation

The route of administration (topical, intramammary, intranasal, feed additive, water additive) dictates absorption, local vs systemic effect, species differences and safety. For example, the study of do Nascimento et al. (2025) used plant-extract based teat dips; for feed additive use the PFA broiler study (Anwar, 2025) used dietary supplementation. Without PK/PD data in target species, dose selection is empirical and risky (Caneschi et al., 2023). Research should include absorption/distribution/elimination studies, and dose–response trials.

1.5.4 Residue, Withdrawal and Regulatory Issues in Food Animals

In food-producing animals (cattle, sheep, goats, pigs, poultry), use of botanicals must consider residues in milk, meat or eggs. Risk of phytochemical residues, metabolite accumulation or unintended effects must be determined. Withdrawal periods may be required before product approval. Regulatory frameworks differ across jurisdictions; many botanical products lack formal approval as veterinary therapeutic agents (Wynn & Fougère, 2009). Practitioners must ensure compliance with national veterinary regulations, especially in food animals.

1.5.5 Integration into Antimicrobial Stewardship

Use of botanicals should not replace antibiotics when clinically indicated, but can be part of a broader antimicrobial

stewardship program- including hygiene, vaccination, selective therapy, monitoring, and reduction of antibiotic use. In production systems, phytogetic feed additives may support this goal by reducing baseline pathogen load or improving gut health, thereby lowering infection rate and antibiotic need (Wang et al., 2024).

1.6. Research Gaps and Future Directions

Despite promising potential, many gaps remain in the use of plant-derived antibacterials in veterinary medicine:

1. High-quality randomised controlled trials (RCTs) in target animal species (dairy cattle, sheep, goats, pigs, poultry, dogs & cats) with clinically meaningful endpoints (e.g., cure rate, relapse, somatic cell count, feed conversion, mortality) rather than just in vitro data (Kaseke et al., 2023).

2. Standardised botanical formulations with quantified chemical composition (e.g., % carvacrol, % eugenol), validated extraction methods, stability testing, and reproducible dosing (Chassagne et al., 2021; De Fazio et al., 2024).

3. Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD) and toxicology studies in veterinary species and for relevant routes (topical, intramammary, dietary, water) to establish safe and effective dosing (Caneschi et al., 2023).

4. Residue and withdrawal studies in food-producing animals to ensure safety (for milk/meat/eggs), enabling regulatory approval and enabling veterinarians to use botanicals as therapeutic agents in production systems (Wynn & Fougère, 2009).

5. Mechanistic synergy studies that investigate interactions between botanicals and antibiotics (or other antimicrobials), explore anti-biofilm/quorum-sensing action in vivo, and help

identify combinations that reduce antibiotic dose or resistance emergence (Haj Hasan et al., 2024).

6. Implementation and cost-benefit research: real-world farm/clinical studies of botanical use (e.g., teat-dip botanical vs standard of care in dairy herd; PFA inclusion vs antibiotic growth promoter in poultry) to evaluate practical feasibility, economics, acceptance, performance and antibiotic-use reduction (Anwar, 2025; Aminullah et al., 2025).

1.7. Resistance Monitoring and Safety Surveillance

As botanical antibacterials are used, monitoring for resistance development, adverse effects, cross-resistance phenomena and long-term safety is crucial (Saeed et al., 2024).

1.8. Importance of Veterinary Medicine

While full clinical integration awaits stronger evidence, veterinarians may consider the following guidelines for exploring botanical antibacterial use:

Use adjunctive botanicals, not replacements for evidence-based antibiotic therapy, unless a validated product (with species, route, dose, safety data) exists.

Choose products that provide documented chemical composition, have published safety data, and are appropriate to the target species and application (topical vs systemic vs feed additive).

In production animals (food species), ensure that botanical products used are legally permitted (or used under veterinary off-label protocols) and that withdrawal/residue issues are addressed.

Be cautious with essential oil formulations in cats, exotic species or neonates—metabolic differences can increase risk of toxicity.

Must be monitor therapeutic outcomes and adverse events when using botanicals, and maintain records to contribute to evidence base.

Educate clients/farmers: botanical treatments are not “automatic herbal cures”; formulation, dosing, species, disease severity and standard of care matter.

Integrate botanical use into broader antimicrobial stewardship: hygiene, preventive measures (vaccination, biosecurity), selective therapy, and monitoring of antibiotic use.

1.9. Conclusions

Plant-derived antibacterials present a promising complementary strategy for veterinary medicine, especially for topical, intramammary, prophylactic and feed-additive applications. The strongest evidence currently supports essential oil-rich plants (such as oregano, thyme, eucalyptus), propolis in mastitis, and phytogetic feed additives in production-animal systems (Wang et al., 2024; Aminullah et al., 2025). However, routine clinical use in veterinary practice requires standardised products, robust clinical trials in target species, safety/residue/withdrawal data, and regulatory approval frameworks. Future research should prioritise these gaps and support implementation of botanicals into antimicrobial stewardship programmes. With appropriate development, plant-derived antibacterials may become a valuable component of sustainable animal health management.

2. Antibacterial Nanoparticles and Their Use in Veterinary Medicine

2.1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) among animal pathogens is a critical One Health threat that undermines therapeutic efficacy

and food safety. Nanoparticles (NPs) have emerged as versatile antimicrobial agents and delivery platforms that may complement or potentiate conventional antibiotics through multiple physical and biochemical mechanisms (Rodrigues et al., 2023; Khalifa et al., 2025). In veterinary contexts, nanoparticle strategies are proposed for topical wound care, intramammary therapy, targeted respiratory delivery, semen preservation, and as functional feed additives- each application area having distinct efficacy, safety and regulatory requirements (Castro-Valenzuela et al., 2025; Fripiat et al., 2025). However, it is important to note that the vast majority of nano-enabled antibacterial evidence currently derives from in vitro experiments and early-stage in vivo studies, with limited data from large-scale clinical trials in veterinary species.

2.2. Rationale and Clinical Needs in Veterinary Medicine

Veterinary practice faces species-diverse physiological barriers, production constraints and residue concerns that complicate antibiotic stewardship. NPs proposed to offer several theoretically attractive advantages: increased local concentration via topical or intramammary delivery, enhanced penetration into biofilms and intracellular niches, co-delivery of synergistic compounds (e.g., essential oils, metal ions, enzymes), and controlled/extended release that may lower systemic exposure and residues (Zhou et al., 2024; AlQurashi et al., 2025). However, benefits must be balanced with particle biodistribution, elimination, accumulation in edible tissues, and farm-level feasibility (Danchuk et al., 2023; Ngoepe, 2025; Yang et al., 2025). Moreover, only a limited number of long-term pharmacokinetic and residue-depletion studies have been conducted in food-producing animals, leaving significant gaps in the evidence required for establishing safe withdrawal intervals.

2.3. Antibacterial Mechanisms of Nanoparticles: Molecular to Ecological Scales

2.3.1 Direct Physicochemical Bacterial Disruption

Metal and metal-oxide nanoparticles (Ag, ZnO, CuO, TiO₂) can disrupt bacterial membranes through direct particle–membrane interactions, induce oxidative stress (ROS generation), and release bioactive ions that interfere with essential enzymatic systems (Khalifa et al., 2025; Rahman et al., 2022). These multi-target actions reduce the probability that single-point genetic resistance will completely abrogate efficacy (Khalifa et al., 2025). These mechanisms are well demonstrated in vitro, but their quantitative contribution in vivo remains under investigation.

2.3.2 Anti-biofilm Activity And Quorum-Sensing Interference

Many chronic veterinary infections (mastitis, persistent wound infections, chronic otitis) are biofilm-mediated. In in vitro models and limited animal studies, NPs can penetrate extracellular polymeric substances (EPS), deliver antibiofilm agents, or enzymatically degrade the matrix; when combined with antibiotics, they can resensitize biofilm microbes to therapy (Mouzakis et al., 2025; Castro-Valenzuela et al., 2025).

2.3.3 Carrier and Potentiation Functions (Co-Delivery)

Most systems are experimental prototypes, not approved veterinary pharmaceuticals. Polymeric and lipidic nanosystems (chitosan, PLGA, liposomes, nanogels) act as carriers that protect labile drugs from degradation, enhance mucosal uptake, and permit slow release- features useful for intramammary, topical, or inhalation routes in veterinary species (Fakhoury et al., 2024; Zhou et al., 2024). Co-encapsulation of antibiotics with metals or phytochemicals often shows synergistic reductions in MIC values in vitro (Akdaşçı et al., 2025; Godoy et al., 2025).

2.4. Nanomaterial Classes with Veterinary Relevance

2.4.1 Silver Nanoparticles (AgNPs)

AgNPs remain the most extensively examined antibacterial NP due to broad spectrum activity and established topical use. Veterinary applications described in the recent literature include wound dressings, teat dips, semen extenders, and experimental intramammary formulations (Frippiat et al., 2025; Khalifa et al., 2025). Persistent concerns are particle persistence in the environment, dose-dependent cytotoxicity and accumulation in edible tissues, directing attention to controlled-release and coated AgNP designs (Frippiat et al., 2025). Regulatory agencies currently lack standardized thresholds for AgNP residues in milk and meat.

2.4.2 Zinc Oxide (ZnO) and Related Metal-Oxide NPs

ZnO-NPs show potent antibacterial and antibiofilm activities and are being trialed both topically (wound care) and as feed supplements (to reduce enteric pathogens and improve growth). Feed-use ZnO at nanoparticle scale has limited approval status, with environmental concerns dominating regulatory decisions. Recent animal trials examine ZnO-NP effects on gut health, immune markers and parasitic burden; nevertheless, standardized safety thresholds and environmental fate data are still being accumulated (Pangprasit et al., 2025; Yang et al., 2025).

2.4.3 Chitosan and Cationic Polymeric NPs

Chitosan is attractive in veterinary medicine because it is biodegradable, mucoadhesive and intrinsically antibacterial; chitosan NPs have been evaluated for wound dressings, topical gels and intramammary carriers, with demonstrated antibiofilm enhancement and drug-delivery synergy. Antibacterial effects vary with degree of deacetylation and molecular weight (Akdaşçi et al., 2025; Godoy et al., 2025). The polymer's cationic nature promotes

interaction with negatively charged bacterial membranes (Akdaşçi et al., 2025).

2.4.4 Lipidic Systems and Nanogels

Liposomes, solid-lipid nanoparticles and nanogels are suited for localized, controlled release of classical antibiotics and antiseptics. Their biocompatibility and established pharmaceutical pathways make them promising for conditions such as otitis externa, dermatologic infections and pulmonary delivery in large animals. However, only a few formulations have progressed to controlled animal trials (Fakhoury et al., 2024; Soriano Pérez et al., 2025; Akdaşçi et al., 2025).

2.4.5 Green-synthesized and Hybrid NPs

Plant- or microbe-mediated synthesis of AgNPs and ZnO-NPs offers potentially lower-cost and more sustainable production routes with intrinsic capping agents that can modulate toxicity and antimicrobial profile. Several veterinary mastitis and wound models have employed green NPs with promising in vitro and small-scale in vivo results. Batch heterogeneity limits direct comparison across studies (Jayasri et al., 2025; Ondrašovičová et al., 2025). Standardization and batch reproducibility remain critical challenges (Jayasri et al., 2025).

2.5. Species- and Application-Specific Evidence (Selected Examples)

2.5.1 Bovine Mastitis

Mastitis is a high-priority target for nano-therapeutics because of biofilm formation and the need to reduce antibiotic residues in milk. Recent in vitro and translational studies report substantial reductions in planktonic and biofilm burdens of *Staphylococcus aureus* and other mastitis pathogens following

exposure to AgNPs, ZnO-NPs and chitosan NP formulations; a smaller number of studies evaluate intramammary delivery with improved local bacterial clearance, though comprehensive milk residue studies are limited. To date, no nano-enabled intramammary formulation has regulatory approval (Castro-Valenzuela et al., 2025; Jayasri et al., 2025).

2.5.2 Companion Animal Dermatology and Wound Care

Topical AgNP and chitosan NP dressings accelerate wound healing and reduce bacterial load in canine models; nanofiber and hydrogel systems provide sustained release and moist wound environments conducive to tissue repair (Godoy et al., 2025; Wafy et al., 2025). Randomized field trials in clinical populations are still rare but are increasingly reported (Godoy et al., 2025). Most results derive from small pilot studies with limited sample size.

2.5.3 Enteric Disease in Piglets And Poultry (Feed Use)

Long-term gut microbiome effects remain insufficiently studied. ZnO and selected inorganic NPs have been tested as feed additives in piglets to mitigate post-weaning diarrhea and in poultry to reduce enteric pathogens, demonstrating growth and gut-microbiota benefits in some trials. Environmental shedding of particles and tissue retention are safety concerns that require long-term and lifecycle studies (Yang et al., 2025; Rusli et al., 2025).

2.5.4 Reproductive Technologies and Semen Preservation

NPs (e.g., AgNP-coated extenders or antioxidant NP systems) have been trialed to reduce microbial contamination in semen extenders and to preserve sperm viability while limiting bacterial overgrowth during storage. These niche applications combine microbiological control with reproductive performance metrics (Hodkovicova et al., 2025). Evidence remains preliminary, with no commercial NP-based extender yet available.

2.6. Formulation Strategies and Manufacturing Considerations

To maximize clinical safety and efficacy, nanoparticle formulations should include: (1) defined and reproducible size distribution and surface charge; (2) biocompatible coatings (e.g., PEGylation, polysaccharide capping) to reduce off-target toxicity; (3) controlled-release matrices for sustained local delivery; and (4) scalable, GMP-compatible synthesis methods (Mahmoudi et al., 2025; Motrenko et al., 2025). Green synthesis approaches can reduce hazardous reagents, but batch-to-batch variability must be addressed with robust characterization (Mahmoudi et al., 2025; Jayasri et al., 2025). Regulatory agencies increasingly request detailed impurity profiles and surface chemistry characterization.

2.7. Safety, Pharmacokinetics, Residues and Environmental Fate

2.7.1 Species-Specific Toxicology and Pharmacokinetics

Nanoparticle absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) differ across species and routes. For example ruminant digestive physiology, avian gut transit times, aquaculture and feline hepatic peculiarities all influence systemic exposure and toxicity. Controlled PK studies are essential to define therapeutic windows and establish withdrawal periods for food-producing animals. Only a few PK studies include full tissue residue depletion curves needed for withdrawal-time calculations (Danchuk et al., 2023; Rahman et al., 2022; Yang et al., 2025).

2.7.2 Residue Testing and Method Development

Detection of nanoscale residues in milk, meat and eggs is analytically challenging. Validated analytical protocols (ICP-MS for metal quantification, spICP-MS for particle characterization, chromatographic methods for organics) and matrix-specific extraction methods must be developed to support regulatory safety

dossiers. Validated residue methods for nanoparticle forms (not only dissolved ions) are still scarce (Ngoepe et al., 2025; Sumarakova and Statsevich, 2025).

2.7.3 Environmental Considerations and Ecotoxicology

Excreted nanoparticles may persist in manure, soil and water, with potential impacts on microbial ecology and food-chain transfer. Environmental accumulation modeling remains limited and often theoretical. Life-cycle analyses and long-term ecotoxicology studies are required before widespread adoption of nano-feed additives or dispersible NPs for farm use (Yang et al., 2025; Motrenko et al., 2025).

2.8. Regulatory Landscape and Pathways to Approval

Regulatory authorities are increasingly attentive to nanomaterials but have not converged on a single global standard. Currently, no harmonized global definition exists for ‘nanomaterial’ in veterinary medicinal regulation. For veterinary therapeutics, sponsors must supply particle characterization, toxicology, PK, residue studies, and environmental risk assessments. Where nano-enabled products are intended for food animals, demonstration of safe withdrawal intervals and validated residue assays is mandatory. Harmonized guidance and case studies from national regulatory bodies will accelerate translation (Ngoepe et al., 2025; Frippiat et al., 2025; Sumarakova and Statsevich, 2025).

2.9. Practical Guidance for Practitioners and Researchers

a. Prioritize topical and localized applications first (wound dressings, teat dips) where systemic residues are minimal and local efficacy can be robustly measured (Castro-Valenzuela et al., 2025).

b. Use standardized, well-characterized formulations from reputable manufacturers; avoid ad-hoc or uncharacterized “homemade” NPs in clinical practice (Mahmoudi et al., 2025).

c. Monitor treated animals for adverse events and record outcomes to contribute to post-market surveillance and evidence generation (Akdaşçi et al., 2025).

d. In food animals, ensure veterinary oversight and compliance with local residue/withdrawal rules before use (Sumarakova and Statsevich, 2025).

2.10. Recommended Study Designs for Veterinary Medicine

Most published studies lack power calculations or blinded outcome assessment; future trials should incorporate these elements. To support regulatory approval and clinical adoption, investigators should design:

Phase II/III randomized controlled field trials in target species with clinically relevant primary endpoints (cure, relapse rate, production metrics).

Comprehensive PK/PD studies for each route/species including tissue residue kinetics.

Ecotoxicology and manure/soil fate studies for feed additives or dispersible NPs.

Comparative cost–benefit analyses evaluating replacement or adjunctive use vs standard of care (Zhou et al., 2024; Mouzakis et al., 2025; Mahmoudi et al., 2025).

2.11. Case Vignettes (Concise)

Intramammary nano-teat dip (experimental, preliminary pilot study; not generalizable)- A plant-mediated AgNP teat dip suggested a reduction trend new intramammary infection incidence

in a small dairy herd pilot, but milk Ag analyses indicated transient increases that required establishment of a withdrawal interval (Jayasri et al., 2025).

Canine wound nanogel- A chitosan-based nanogel combined with a broad-spectrum antibiotic shortened time to epithelialization and reduced bacterial counts in an experimental dog wound model, suggesting potential to reduce systemic antibiotic days (Godoy et al., 2025).

2.12. Future Directions and Concluding Remarks

Nanoparticle technologies have matured rapidly and have generated robust preclinical evidence across multiple veterinary domains (wound care, mastitis, reproductive tech, feed additives). Translation to practice will depend more on safety, residue clearance, and regulatory validation than on additional antibacterial demonstrations. The major translational bottlenecks are safety/residue data, environmental fate, standardized manufacturing and regulatory clarity rather than lack of antibacterial activity. Interdisciplinary consortia (veterinary clinicians, nanotoxicologists, analytical chemists, regulators) will be necessary to move promising formulations from bench to barn and clinic. If implemented carefully, nano-enabled antibacterials could become an important adjunct within veterinary antimicrobial stewardship programs (Yang et al., 2025).

References

Abdelli, N., Solà-Oriol, D., & Pérez, J. F. (2021). Phytogetic feed additives in poultry: achievements, prospective and challenges. *Animals*, 11(12), 3471.

Akdaşçi, E., Duman, H., Eker, F., Bechelany, M., & Karav, S. (2025). Chitosan and its nanoparticles: A multifaceted approach to antibacterial applications. *Nanomaterials*, 15(2), 126.

AlQurashi DM, AlQurashi TF, Alam RI, Shaikh S, & Tarkistani MAM. (2025). Advanced nanoparticles in combating antibiotic resistance: current innovations and future directions. *Journal of Nanotheranostics*, 6(2), 9.

Aminullah, N., Mostamand, A., Zahir, A., Mahaq, O., & Azizi, M. N. (2025). Phytogetic feed additives as alternatives to antibiotics in poultry production: A review. *Veterinary World*, 18(1), 141.

Anwar, M. M. J. (2025). Nano-enabled Phytogetic Feed Additives for Sustainable Poultry Production: A New Frontier in Meat Quality, Growth Efficiency, and Antibiotic Alternatives. *World*, 9(3), 39-55.

Caneschi, A., Bardhi, A., Barbarossa, A., & Zaghini, A. (2023). Plant essential oils as a tool in the control of bovine mastitis: an update. *Molecules*, 28(8), 3425.

Castro-Valenzuela, B. E., Franco-Molina, M. A., & Rodríguez-Padilla, C. (2025). Nanoparticles as an alternative treatment for bovine mastitis-A review. *Animal bioscience*, 38(7), 1291.

Chassagne, F., Samarakoon, T., Porras, G., Lyles, J. T., Dettweiler, M., Marquez, L., ... & Quave, C. L. (2021). A systematic review of plants with antibacterial activities: A

taxonomic and phylogenetic perspective. *Frontiers in pharmacology*, 11, 586548.

Danchuk O., Levchenko A., da Silva Mesquita R., Danchuk, V., Cengiz S., Cengiz M., & Grafov, A. (2023). Meeting contemporary challenges: development of nanomaterials for veterinary medicine. *Pharmaceutics*, 15(9): 2326.

De Fazio, R., Oppedisano, F., Caioni, G., Tilocca, B., Piras, C., & Britti, D. (2024). Plants with antimicrobial activity against *Escherichia coli*, a meta-analysis for green veterinary pharmacology applications. *Microorganisms*, 12(9), 1784.

do Nascimento GM, Rodrigues RA, Brugnera HC, Barbosa JC, Favaron Jr FR, Rossi GAM, Cardozo MV. (2025). Antimicrobial Activity of Teat Antiseptic Formulations Based on Plant Extracts for Controlling Bovine Mastitis: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Veterinary Sciences*, 12(4), 293.

El-Demerdash, A. S., Orady, R. M., Matter, A. A., & Ebrahim, A. F. (2023). An alternative approach using Nano-garlic emulsion and its synergy with antibiotics for controlling biofilm-producing multidrug-resistant *Salmonella* in chicken. *Indian Journal of Microbiology*, 63(4), 632-644.

Fakhoury, N. E., Mansour, S., Abdel-Halim, M., Hamed, M. M., Empting, M., Boese, A., & Tammam, S. N. (2025). Nanoparticles in liposomes: a platform for increased antibiotic selectivity in multidrug resistant bacteria in respiratory tract infections. *Drug delivery and translational research*, 15(4), 1193-1209.

Frippiat, T., Art, T., & Delguste, C. (2025). Silver nanoparticles as antimicrobial agents in veterinary medicine: current applications and future perspectives. *Nanomaterials*, 15(3), 202.

Godoy, C. A., Balic, I., Moreno, A. A., Diaz, O., Arenas Colarte, C., Bruna Larenas, T., & Caro Fuentes, N. (2025). Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan nanoparticles against *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis milk. *Pharmaceutics*, 17(2), 186.

Haj Hasan, A., Preet, G., Astakala, R. V., Al-Adilah, H., Oluwabusola, E. T., Ebel, R., & Jaspars, M. (2024). Antibacterial activity of natural flavones against bovine mastitis pathogens: in vitro, SAR analysis, and computational study. *In Silico Pharmacology*, 12(2), 78.

Hodkovicova, N., Machacek, M., Cahova, J., Consolacion, J., Siwicki, A., Pejsak, Z., & Svoboda, M. (2025). The use of silver nanoparticles in pigs—An invited review. *Veterinárni medicína*, 70(3), 77.

Jayasri, A., Eswara Prasad, P., Kala Kumar, B. D. P., Padmaja, K., Shivakumar, P., Anil Kumar, B., & Vidya, B. (2025). Green synthesis of silver and zinc oxide nanoparticles with *Thespesia populnea* extract and investigation of their antioxidant potential against mouse mastitis model. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1521143.

Jia, D., Arbab, S., Ullah, H., Alzahrani, K. J., Alzahrani, F. M., Alsharif, K. F., & Li, K. (2025). Antibacterial Activity of Traditional Medicinal Plants: Combating Antibiotics Resistance in Animal Wound Infections. *Veterinary Medicine and Science*, 11(3), e70361.

Kaseke TB, Chikwambi Z, Gomo C, Mashingaidze AB, & Murungweni C. (2023). Antibacterial activity of medicinal plants on the management of mastitis in dairy cows: A systematic review. *Veterinary Medicine And Science*, 9(6), 2800-2819.

Khalifa, H. O., Oreiby, A., Mohammed, T., Abdelhamid, M. A., Sholkamy, E. N., Hashem, H., & Fereig, R. M. (2025). Silver nanoparticles as next-generation antimicrobial agents: mechanisms, challenges, and innovations against multidrug-resistant bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *15*, 1599113.

Khan A, Ullah S, Ramzan F, Rehman AU, Rehman S, Kholik K, Sukri A, Munawaroh M, Sucipto TH. Combined effects of *Aloe vera* leaf extract and vitamin E on wound healing in *Oryctolagus cuniculus* (Rabbits). *Open Vet J*. 2025 Feb;*15*(2):700-708. doi: 10.5455/OVJ.2025.v15.i2.18. Epub 2025 Feb 28. PMID: 40201845; PMCID: PMC11974294.

Mahmoudi, D., Kajani, A. A., & Khorasgani, M. R. (2025). Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities, and computational studies of chitosan nanoparticles loaded with vitamin E and clove essential oil. *Scientific Reports*, *15*(1), 32130.

Mezzasalma, N., Spadini, C., Spaggiari, C., Annunziato, G., Andreoli, V., Prosperi, A., & Cabassi, C. S. (2025). Antibacterial and antibiofilm activity of Eucalyptus globulus leaf extract, asiatic acid and ursolic acid against bacteria isolated from bovine mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, *12*, 1565787.

Motrenko, M., Lange, A., Kalińska, A., Gołębiewski, M., Kunowska-Słószarz, M., Nasiłowska, B., & Jaworski, S. (2025). Green Nanoparticle Synthesis in the Application of Non-Bacterial Mastitis in Cattle. *Molecules*, *30*(6), 1369.

Mouzakis, A., Panagopoulos, P., Papazoglou, D., & Petrakis, V. (2025). A Comprehensive Review of Nanoparticles in the Fight Against Antimicrobial Resistance. *Pathogens*, *14*(11), 1090.

Ngoepe, M. P., Schoeman, S., & Roux, S. (2025). Challenges Associated With the Use of Metal and Metal Oxide Nanoparticles as Antimicrobial Agents: A Review of Resistance Mechanisms and Environmental Implications. *Biotechnology Journal*, 20(7), e70066.

Ondrašovičová, S., Zigo, F., Farkašová, Z., Lacková, Z., Velgosova, O., Mačák, L., & Rehan, I. F. (2025). Green synthesis of silver nanoparticles and their inhibitory effects on resistant udder pathogens. *Journal of Applied Animal Research*, 53(1), 2462578.

Pangprasit, N., Kongkaew, A., Saipinta, D., Pikulkaew, S., Intanon, M., Suriyasathaporn, W., & Chaisri, W. (2025). Evaluation of antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles against bacteria isolated from animal wounds. *Pharmaceutics*, 17(2), 209.

Pinheiro Machado, G. T., Veleirinho, M. B., Mazzarino, L., Machado Filho, L. C. P., Maraschin, M., Cerri, R. L. A., & Kuhnen, S. (2019). Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(4), 713-723.

Rahman, H. S., Othman, H. H., Abdullah, R., Edin, H. Y. A. S., & AL-Haj, N. A. (2022). Beneficial and toxicological aspects of zinc oxide nanoparticles in animals. *Veterinary Medicine and Science*, 8(4), 1769-1779.

Robledo-Díaz, Y. L., Sánchez-Varón, A. A., Van-arcken Aguilar, Y. C., Sánchez-Bonilla, M. D. P., & Hernández-Carvajal, J. E. (2025). In Vitro Antibacterial Activity of Ethanollic Extracts Obtained from Plants Grown in Tolima, Colombia, Against Bacteria Associated with Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 12(9), 903.

Rodrigues, M. P., Pinto, P. N., Dias, R. R. D. S., Biscoto, G. L., Salvato, L. A., Millán, R. D. S., & Keller, K. M. (2023). The

antimicrobial applications of nanoparticles in veterinary medicine: a comprehensive review. *Antibiotics*, 12(6), 958.

Rusli, R. K., Zurmiati, Z., Mutia, R., Reski, S., Darmawan, A., Hidayat, C., & Yuniza, A. (2025). Green-synthesized zinc oxide nanoparticles from *Garcinia mangostana* leaf extract: A promising antibacterial agent for poultry. *Veterinary World*, 18(2), 263.

Saeed, S. I., Kamaruzzaman, N. F., Gahamanyi, N., Nguyen, T. T. H., Hossain, D., & Kahwa, I. (2024). Confronting the complexities of antimicrobial management for *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis: an innovative paradigm. *Irish veterinary journal*, 77(1), 4.

Soriano Pérez, M. L., Flores Bracamonte, M. C., Bellingeri, R., Alustiza, F., & Molina, M. (2025). Recent advances in nanogels in veterinary medicine. *Veterinary Research*, 56(1), 164.

Sumarokova, A. D., & Statsevich, L. N. (2025). Metal nanoparticles, silver nanoparticles and their impact on human and animal health. *Veterinary Science Today*, 90.

Wafy, M. N., Hassan, E. A., Saeed, S., Khattab, M. S., AbuBakr, H. O., & Abu-Seida, A. M. (2025). Therapeutic Efficacy of Zinc Oxide Nanoparticles Ointment in Promoting Wound Healing in Dogs: A Clinical Study. *Journal of Applied Veterinary Sciences*.

Wang, J., Deng, L., Chen, M., Che, Y., Li, L., Zhu, L., & Feng, T. (2024). Phytogetic feed additives as natural antibiotic alternatives in animal health and production: A review of the literature of the last decade. *Animal Nutrition*, 17, 244-264.

Wynn, S. G., & Fougère, B. J. (2009). Veterinary herbal medicine: A systems-based approach. *Veterinary herbal medicine*, 291.

Yang, J., Xiong, D., & Long, M. (2025). Zinc oxide nanoparticles as next-generation feed additives: Bridging antimicrobial efficacy, growth promotion, and sustainable strategies in animal nutrition. *Nanomaterials*, 15(13), 1030.

Yusuf, B., Abraha, B., Salih, K., Abdurahman, A., Alemu, S., Wondimu, A., & Bayu, Y. (2022). In vitro antibacterial evaluation of four selected medicinal plants against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Mieso District West Hararghe Zone, Oromia Regional State, Ethiopia. *The Open Microbiology Journal*, 16(1).

Zhou, Y., Guo, L., Dai, G., Li, B., Bai, Y., Wang, W., & Zhang, J. (2024). An overview of polymeric nanoplatfroms to deliver veterinary antimicrobials. *Nanomaterials*, 14(4), 341.

