

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ALANINDA AKADEMİK TARTIŞMALAR

Editör: Doç.Dr.Aykut ZEREK

yaz
yayınları

Tıbbi Mikrobiyoloji Alanında Akademik Tartışmalar

Editör

Doç.Dr. Aykut ZEREK

yaz
yayınları

2026

Tıbbi Mikrobiyoloji Alanında Akademik Tartışmalar

Editör: Doç.Dr. Aykut ZEREK

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-8996-08-1

Haziran 2026 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

İÇİNDEKİLER

Mikrobiyota	1
<i>Sedef Zeliha ÖNER</i>	
Tıbbi Mikrobiyolojide Dijital PCR Uygulamaları	12
<i>Selahattin ÜNLÜ</i>	
Çiğ Sütlerde Halk Sağlığı Açısından Kritik Patojen: Listeria Monocytogenes	46
<i>Enise Begüm GÖÇMEZ, Umut YILMAZ</i>	
Beyond Antibiotics: Emerging Strategies for the Management of Bacterial Infections in the Era of Antimicrobial Resistance.....	66
<i>Eylül HARAVI</i>	
The Future of Microbiome-Based Neuroprotection: VSL#3 Probiotics, Precision Medicine, and Emerging Strategies in Neurodegenerative Disease.....	105
<i>Eylül HARAVI</i>	

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

MİKROBİYOTA

Sedef Zeliha ÖNER¹

1. GİRİŞ

İnsan bedeni çok sayıda mikroorganizmanın yaşam alanıdır. Bakteriler, virüsler, mantarlar ve arkeleri içeren bu mikroorganizma grubu “mikrobiyota” olarak adlandırılır. Bu grubun genetik materyallerinin tamamı ise mikrobiyom olarak tanımlanmaktadır.

Mikrobiyota yaşamın ilk anından itibaren diyet, çevresel faktörler, antibiyotik kullanımı ve genetik yapı gibi etkenlere bağlı olarak değişim gösterir. Mikrobiyota normalde konak organizma ile simbiyotik bir ilişki içindedir. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, vitamin sentezinde, sindirim gibi fonksiyonlarda yer alır.

Mikrobiyota insan sağlığının korunmasında ve hastalıkların gelişiminde kritik bir role sahiptir. Özellikle bağırsak mikrobiyotası, insan sağlığı üzerinde en belirgin etkiye sahip mikrobiyal topluluktur ve *Lactobacillus* ve *Bacteroides* gibi bakteri grupları, bağırsak homeostazının korunmasında kritik rol oynarlar. Ancak mikrobiyotanın etkileri gastrointestinal sistemle sınırlı değildir. Bununla beraber metabolik, immünolojik ve nörolojik süreçlerde de rol oynamaktadır. Mikrobiyota ile konak arasındaki çift yönlü bir etkileşim bulunmaktadır. Bağırsak-beyin eksenini (gut-brain axis) aracılığıyla mikrobiyota; nörotransmitter

¹ Doçent Doktor, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0000-0002-9964-2526.

üretimi, bağışıklık mediatörleri ve vagus siniri üzerinden merkezi sinir sistemi fonksiyonlarını etkileyebilmektedir.

Mikrobiyotanın yapısal ve fonksiyonel dengesinin bozulmasına “disbiyozis” denir ve disbiyozis birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar. Bu hastalıklardan bazıları; inflamatuvar bağırsak hastalığı, obezite, tip 2 diyabet ve bazı nöropsikiyatrik hastalıklardır. Bununla beraber mikrobiyota değişimlerinin enfeksiyon hastalıklarına yatkınlık üzerine de etkili olabileceği bilinmektedir.

İnsan mikrobiyotası, farklı anatomik bölgelerde özgün çevresel koşullara bağlı olarak çeşitlilik gösteren kompleks ve dinamik bir mikrobiyal ekosistemdir. Bu ekosistem; bakteriler başta olmak üzere virüsler, mantarlar ve arkeleri içermekte olup, her bir vücut bölgesi kendine özgü mikrobiyal kompozisyona sahiptir. Mikrobiyota bileşimi; pH, oksijen düzeyi, nem, besin kaynakları ve konak bağışıklık yanıtı gibi faktörler tarafından şekillendirilmektedir.

İnsanlarda farklı anatomik bölgelere göre farklı mikrobiyal kompozisyonlar bulunmaktadır. Aynı zamanda bu farklı mikrobiyotalar; pH, oksijen düzeyi, nem, besin kaynakları ve konak bağışıklık yanıtı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Gastrointestinal sistem mikrobiyotası, deri mikrobiyotası, oral mikrobiyota, solunum yolu mikrobiyotası, ürogenital sistem mikrobiyotası en yoğun araştırma yapılan alanlar arasında yer almaktadır.

2. GASTROİNTESTİNAL SİSTEM MİKROBİYOTASI

Gastrointestinal sistemde; yoğun ve çeşitliliği fazla mikrobiyal topluluklar bulunmaktadır. Kolon mikrobiyal

yoğunluğun en yüksek olduğu bölgedir burada anaerob bakteriler baskın olarak bulunmaktadır.

Başlıca bakteriyel filumlar arasında, *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* yer almaktadır. *Bacteroides* türleri kompleks karbonhidratların parçalanmasında önemli rol oynar. *Lactobacillus* ve *Clostridium* türleri ise kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine katkıda bulunur. Bağırsak epitel bütünlüğünün korunması ve immün yanıtın düzenlenmesi açısından önemlidir. Aynı zamanda patojenlere karşı kolonizasyon direnci sağlayarak enfeksiyonların önlenmesinde bariyer görevi görürler.

3. DERİ MİKROBİYOTASI

Gastrointestinal sistemde; yoğun ve çeşitliliği fazla mikrobiyal topluluklar bulunmaktadır. Kolon mikrobiyal yoğunluğun en yüksek olduğu bölgedir burada anaerob bakteriler baskın olarak bulunmaktadır.

Başlıca bakteriyel filumlar arasında, *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* yer almaktadır. *Bacteroides* türleri kompleks karbonhidratların parçalanmasında önemli rol oynar. *Lactobacillus* ve *Clostridium* türleri ise kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine katkıda bulunur. Bağırsak epitel bütünlüğünün korunması ve immün yanıtın düzenlenmesi açısından önemlidir. Aynı zamanda patojenlere karşı kolonizasyon direnci sağlayarak enfeksiyonların önlenmesinde bariyer görevi görürler.

4. ORAL MİKROBİYOTA

Ağız boşluğunda birçok mikroniş bulunmaktadır. Diş yüzeyi, dil dorsumu ve gingival sulkus farklı mikrobiyotalara sahiptir. Oral mikrobiyotada *Streptococcus mutans*, *Veillonella*

ve *Actinomyces* gibi bakteriler yaygın olarak bulunur. Ağız sağlığının korunmasında rol oynarlar. Mikrobiyota dengesinin bozulması durumunda diş çürüğü ve periodontal hastalıklar gelişebilmektedir.

5. SOLUNUM YOLU MİKROBİYOTASI

Erken yaşlarda solunum yolu mikrobiyomu dinamiktir ve gelişimi, doğum şekli, beslenme türü, antibiyotik tedavisi ve kardeşlerin varlığı ve kreşe gitme gibi kalabalık ortam koşulları da dahil olmak üzere faktörlerden etkilenir.

Üst solunum yolu, akciğer mikrobiyomunun birincil kaynağıdır. Sağlıklı bireylerde, akciğer mikrobiyomu çoğunlukla geçici mikroorganizmalardan oluşur. Alt solunum yollarının uzun süre steril olduğu düşünülmüşse de şimdi düşük yoğunlukta da olsa kendine özgü bir mikrobiyotaya sahip olduğu bilinmektedir. Nazal kavitede; *Staphylococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Moraxella spp.*, *Streptococcus spp.*, nazofarinkste *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Moraxella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Dolosigranulum spp.*, orafarenkste *Streptococcus spp.*, *Rothia spp.*, *Veillonella spp.*, *Provetella spp.*, *Leptotrichia spp.*, akciğerde ise *Veillonella spp.*, *Provetella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Tropheryma whipplei* bulunmaktadır.

6. ÜROGENİTAL SİSTEM MİKROBİYOTASI

Kadın ürogenital sistem mikrobiyotasında rahim ağzı ve vajinayı içeren alt genital sistem mikrobiyomu düşük çeşitlilik gösterir ve sağlıklı kadınlarda ağırlıklı *Lactobacillus* cinsinden oluşur. *Lactobacillus* cinsinin baskın olması östrojen uyarımı altında vajinal epitelde hücre içi glikojen birikimiyle ilişkilidir. *Lactobacillus*, glikojeni metabolize ederek ve laktik asit üretir bu

da vajinal ortamı asitleştirir Bu asidik ortam, patojenik mikroorganizmaların büyümesini engeller. Üreme çağındaki kadınların vajinal mikrobiyotası genellikle beş topluluk durum tipine (CST) ayrılır. CST I, II, III ve V'in her birinde tek bir *Lactobacillus* türü (sırasıyla *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* ve *Lactobacillus jensenii*) baskınken, CST IV, çeşitli fakültatif ve zorunlu anaerobların varlığı ile karakterizedir. Üst genital sistem mikrobiyomu uterus da hem sağlıklı hem de hastalıklı durumlarda mikrobiyal çeşitlilik sergiler. Sağlıklı kadınlarda, en sık bildirilen baskın cins *Lactobacillus*'tur. Bununla beraber *Prevotella*, *Gardnerella*, *Bifidobacterium*, *Atopobium* ve *Sneathi* a gibi diğer cinslerin küçük miktarları da tespit edilebilir

Erkek ürogenital mikrobiyotası alt genital sisteminde çoğunlukla üretrada ve koronal olukta bulunur. Üretrada en sık görülen filumlar *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ve *Bacteroidetes*'tir; ancak bireyler arasında yüksek bir değişkenlik mevcuttur. Cinsel yolla bulaşan hastalık pozitif ve negatif erkekler (ikincisinde daha az seçici, anaerobik ve kültürlenemeyen bakteriler bulunur) ile sünnetli ve sünnetsiz erkekler arasında farklılıklar görülmektedir (sünnet, Gram negatif ve anaerobik bakterilerin azalmasına neden olur). Üst genital sistem (prostat dokusu ve vas deferens dahil) genellikle enfeksiyonlar (prostatit ve diğer prostat hastalıkları dahil) dışında sterildir.

7. MİKROBİYOTA VE İMMÜN SİSTEM ETKİLEŞİMİ

İnsan vücudu, mikrobiyota birlikte evrimleşmiştir ve bu durum hem doğuştan gelen hem de edinilmiş bağışıklığı etkiler. Düzenleyici T hücreleri ve efektör T hücreleri yanıtlarının farklı düzenlenmesi, bağırsakta bulunan spesifik mikrobiyal türlerin

doğrudan bir sonucudur ve bu ilişki iltihaplanma ve hastalık sırasında düzensizliğe maruz kalır.

Doğuştan bağışıklık, enfeksiyona karşı ilk bariyeri oluşturur ve homeostazın korunmasında, mikrobiyotanın şekillenmesinde rol oynar. Mikrobiyota ile sürekli etkileşim halindedir. Doğuştan bağışıklık sistemi, mikrobiyotayı dengeli bir şekilde düzenlemeli ve korumalıdır. Konak mikrobiyota ilişkisi, karşılıklı fayda sağlamaktan, patojenik olmaya kadar değişen bir yapıya sahiptir.

Mikrobiyota, PRR sinyallemesini ve bağışıklık sonuçlarını önemli ölçüde etkiler. Örüntü tanıma reseptörleri (PRR'ler), bağışıklık sisteminde patojenle ilişkili moleküler örüntüleri ve hasarla ilişkili moleküler örüntüleri algılayan sensörlerdir. PRR'ler; Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), C tipi lektin reseptörleri (CLR'ler), nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptörler (NLR'ler), AIM2 benzeri reseptörler (ALR'ler) gibi reseptörlerden oluşur. Doğuştan gelen ve edinsel bağışıklık tepkileri arasında temel bağlantılar görevi görerek patojenlere karşı savunma mekanizmalarını başlatır ve bağışıklık homeostazını korurlar.

Mikrobiyota üyeleri, özellikle Toll-like receptors (TLR'ler) ve NOD-like receptors (NLR'ler) gibi reseptörler aracılığıyla tanınmaktadır ve reseptör aktivasyonu sonucu sitokin ve kemokin üretimini tetiklenir bu da inflamatuvar yanıtın başlatılmasına katkı sağlamaktadır. Yanıt, sağlıklı bireylerde kontrollü bir şekilde düzenlenir ve aşırı inflamasyon engellenir.

İnsan vücudunda, edinsel bağışıklık sistemide mikrobiyota ile işbirliği içindedir. Edinsel bağışıklık, herhangi bir patojeni, dönüştürülmüş hücrel antijenleri tespit edebilir ve etkili bir şekilde yanıt verir. Edinsel bağışıklık sistemi, çeşitli T hücreleri ve B hücreleri türlerinden oluşur. Bu hücreler, zararsız antijenlere karşı yanıtları baskılayarak, bağırsak mukozasının

bariyer fonksiyonlarını koruyarak uygun bağışıklık fonksiyonunu sağlarlar ve homeostazının korunmasında önemli rol oynarlar. Bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak T hücreleri, bağışıklık sistemi yanıtını oluştururlar. Proinflamatuvar hücreler arasındaki denge ve kontrol sistemi, bağırsak mukozasındaki homeostazdan sorumludur. Bu sistem, IFN- γ üreten Th1 hücrelerini; IL-17A, IL-17F ve IL-22 üreten TH17 hücrelerini; TH2 hücrelerini ve anti-inflamatuvar Foxp3+ düzenleyici T hücrelerini (T-reg'ler) içerir. Mikrobiyota, T hücre diferansiyasyonunu etkileyerek farklı T hücre alt gruplarının (Th1, Th2, Th17 ve Treg) gelişimini düzenler. Bu süreçte *Bacteroides fragilis* gibi bazı bakteriler, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) aktivasyonunu destekleyerek immün toleransın oluşumuna katkı sağlar.

Ayrıca mikrobiyota, immünoglobulin A (IgA) üretimini uyarak mukozal yüzeylerde patojenlere karşı koruyucu bir immün yanıtın gelişmesini sağlar. B hücreleri, yaygın bakterilere yanıt veren büyük miktarda salgısal immünoglobulin A (sIgA) üreterek bağırsak homeostazını koruyabilir. Salgısal IgA, hem T hücre bağımsız hem de T hücre bağımlı süreçler yoluyla üretilir. Bağırsaktaki mikrobiyal topluluğu şekillendirmek için, T hücre bağımlı bir yol aracılığıyla IgA üretimi esastır.

8. DİSBIYOZİS VE HASTALIK İLİŞKİSİ

Disbiyozis, birçok hastalığın patogenezinde önemli bir faktördür. Disbiyozisde mikrobiyal çeşitlilik azalır, yararlı mikroorganizmalar kaybolur ve patojenlerin aşırı çoğalması meydana gelir. Disbiyozis, immün homeostaz kaybına ve kronik inflamasyonun gelişimine ortam oluşturur.

Disbiyozisin hastalık gelişimine katkısı öncelikle bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulması, artmış intestinal geçirgenlik ve mikrobiyal ürünlerin sistemik dolaşıma geçişiyle başlar. Lipopolisakkarit gibi mikrobiyal bileşenler, immün sistemi aktive

eder ve düşük dereceli kronik inflamasyonun gelişimine katkıda bulunur.

Kısa zincirli yağ asitleri üretimindeki azalma, epitel hücre fonksiyonlarının zayıflamasına ve anti-inflamatuvar mekanizmaların yetersiz kalmasına neden olur. Mikrobiyota kaynaklı metabolitlerin azalması, düzenleyici T hücrelerinin aktivitesini düşür ve immün toleransı bozar.

Disbiyozisin gastrointestinal hastalıklarla ilişkine bakıldığında; Crohn hastalığı ve Ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında mikrobiyal çeşitlilikte belirgin azalma ve proinflamatuvar bakterilerin artışı olur. Ayrıca Clostridioides difficile enfeksiyonu gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Antibiyotik kullanımı sonrası mikrobiyota baskılanmakta ve fırsatçı patojenler çoğalmaktadır. Bununla beraber irritabl bağırsak sendromunda da mikrobiyota değişiklikleri önemli rol oynar.

Disbiyozisin metabolik hastalıklarla ilişkine bakıldığında; Obezite ve Tip 2 diyabet gibi hastalıklarda; enerjinin artması, kısa zincirli yağ asidi profillerindeki değişiklikler ve inflamatuvar yanıtın artışı, bu hastalıkların gelişiminde rol oynar. Disbiyozis ayrıca insülin direncinin artmasına katkıda bulunarak metabolik sendromun ilerlemesini destekler. Disbiyozisin immün ve otoimmün hastalıklarla ilişkine bakıldığında; romatoid artrit, multipl skleroz ve astım gibi hastalıklarda immün toleransın kaybına yol açarak proinflamatuvar yanıtların artmasına neden olur.

Nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarla ilişkine bakıldığında; depresyon, otizm spektrum bozukluğu ve parkinson gibi hastalıklarda; mikrobiyota, nörotransmitter üretimini ve immün araçlar üzerinden beyin fonksiyonlarını etkilemektedir.

KAYNAKÇA

1. Alexander KL, Targan SR, Elson CO 3rd. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):206-20. doi: 10.1111/imr.12180
2. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473:174–80.
3. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157:121–41.
4. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:790–801.
5. Chen R, Zou J, Chen J, Zhong X, Kang R, Tang D. Pattern recognition receptors: function, regulation and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Jul 11;10(1):216. doi: 10.1038/s41392-025-02264-1
6. Cheng Q, Lv S, Yin N, Wang J. Microbial regulators of physiological and reproductive health in women of reproductive age: their local, proximal and distal regulatory roles. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2025 Nov 17;11(1):207. doi: 10.1038/s41522-025-00839-y
7. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13:260–70.
8. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health. *Cell.* 2012;148:1258–70.
9. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med.* 2018;24:392–400.

10. Heidari M, Maleki Vareki S, Yaghobi R, Karimi MH. Microbiota activation and regulation of adaptive immunity. *Front Immunol.* 2024 Oct 9;15:1429436. doi: 10.3389/fimmu.2024.1429436
11. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis. *Nature.* 2016;535:75–84.
12. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486:207–14.
13. Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The integrative human microbiome project. *Nature.* 2019;569:641–8.
14. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:321–35.
15. Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease. *Front Microbiol.* 2018;9:1835.
16. Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. Our gut microbiome: the evolving inner self. *Cell.* 2017;171:1481–93.
17. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human microbiota. *Nature.* 2012;489:220–30.
18. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med.* 2016;375:2369–79.
19. Man WH, de Steenhuijsen Pitsers WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017 May;15(5):259-270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14

20. Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):32-41. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.019
21. Pradeu T, Thomma BPHJ, Girardin SE, Lemaitre B. The conceptual foundations of innate immunity: Taking stock 30 years later. *Immunity.* 2024 Apr 9;57(4):613-631. doi: 10.1016/j.immuni.2024.03.007
22. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:341–52.
23. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90:859–904.
24. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for human cells and bacteria. *PLoS Biol.* 2016;14:e1002533.
25. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31:69–75.
26. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:227–38.
27. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature.* 2016;535:65–74.
28. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017;474:1823–36.
29. Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17:279–93.
30. Vemuri R, Shankar EM, Chieppa M, Eri R, Kavanagh K. Beyond gut microbiota. *Microorganisms.* 2020;8:1039.

TIBBİ MİKROBİYOLOJİDE DİJİTAL PCR UYGULAMALARI

Selahattin ÜNLÜ¹

1. GİRİŞ

Moleküler tanı yöntemleri, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında enfeksiyon etkenlerinin saptanması, patojen yükünün izlenmesi, antimikrobiyal direnç belirteçlerinin araştırılması ve salgın yanıtının hızlandırılması açısından temel araçlar hâline gelmiştir. Konvansiyonel kültür, mikroskopik inceleme ve antijen/antikor temelli yöntemler klinik mikrobiyolojinin vazgeçilmez bileşenleri olmakla birlikte, özellikle düşük mikrobiyal yük, yavaş üreyen veya kültürde üretilemeyen mikroorganizmalar, önceden antimikrobiyal tedavi almış hastalar ve hızlı klinik karar gerektiren durumlarda duyarlılık, süre ve kantitatif doğruluk açısından sınırlılıklar gösterebilir. Bu nedenle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR), son otuz yılda enfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında önemli bir dönüşüm yaratmıştır. Bununla birlikte qPCR sonuçlarının güvenilirliği; örnek kalitesi, nükleik asit ekstraksiyonu, inhibitör varlığı, amplifikasyon verimliliği, standart eğrinin doğruluğu ve laboratuvarlar arası raporlama değişkenliği gibi çok sayıda preanalitik ve analitik faktörden etkilenebilmektedir (1).

Dijital PCR (digital PCR, dPCR), nükleik asitlerin kantitatif analizinde qPCR'den farklı bir ölçüm mantığına dayanan, örneği çok sayıda bağımsız mikroreaksiyona bölerek

¹ Dr. Öğr. Üyesi., Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ORCID: 0009-0002-9185-0109.

hedef molekül varlığını her bir bölmede “pozitif” veya “negatif” son nokta sinyali üzerinden değerlendiren üçüncü kuşak PCR yaklaşımıdır. “Digital PCR” terimi literatürde ilk kez Vogelstein ve Kinzler tarafından mutant alellerin nadir diziler içerisindeki kantifikasyonu bağlamında tanımlanmış; daha sonra mikroakışkan, damlacık ve çip tabanlı platformların gelişmesiyle yöntem daha ölçeklenebilir, tekrarlanabilir ve klinik uygulamalara daha yakın bir teknoloji hâline gelmiştir (2,3). Bu yaklaşımda hedef nükleik asit molekülleri teorik olarak çok sayıda bölmeye rastgele dağıtılır; amplifikasyon sonrasında pozitif ve negatif bölme oranı kullanılarak Poisson istatistiği ile başlangıç hedef kopya sayısı hesaplanır (4,5). Böylece dPCR, dış standart eğriye gereksinim duymadan mutlak kantifikasyon sağlayabilen bir yöntem olarak qPCR’den ayrılır (4).

Tıbbi mikrobiyoloji açısından dPCR’nin en önemli katkılarından biri, düşük kopya sayılı hedeflerin güvenilir biçimde saptanması ve kantifiye edilmesidir. Klinik örneklerde patojen yükü her zaman yüksek değildir; erken enfeksiyon dönemi, latent veya persistan enfeksiyonlar, tedavi sonrası rezidüel nükleik asit varlığı, santral sinir sistemi örnekleri, solunum yolu örnekleri, kan ve plazma gibi düşük biyokütleli materyallerde hedef nükleik asit miktarı çoğu zaman sınır düzeylerde bulunabilir. dPCR’nin örneği çok sayıda bağımsız reaksiyona ayırması, nadir hedeflerin arka plan nükleik asit içinde daha görünür hâle gelmesine ve özellikle düşük viral, bakteriyel veya paraziter yüklerde kantitatif duyarlılığın artmasına katkı sağlayabilir (4,6,7). Bununla birlikte dPCR’nin yüksek duyarlılığı, kontaminasyon kontrolü, uygun negatif kontroller, eşik belirleme stratejileri ve preanalitik süreç standardizasyonunu daha da kritik hâle getirmektedir (6,8). dPCR’nin qPCR’ye göre bir diğer önemli avantajı, bazı inhibitör maddelere karşı daha toleranslı olabilmesidir. Klinik örneklerde hemoglobin, heparin, safra tuzları, mukus, doku yıkım ürünleri, dışkı bileşenleri veya

ekstraksiyon kalıntıları gibi inhibitörler amplifikasyon verimliliğini etkileyebilir. qPCR’de bu durum kantifikasyon eğrisini ve döngü eşiği değerlerini doğrudan etkileyerek yanlış düşük kantifikasyon veya yalancı negatiflik riskini artırabilir. dPCR’de son nokta temelli pozitif/negatif bölme okuması ve hedef moleküllerin bölmelere ayrılması, bazı inhibitör etkilerin seyreltilmesine veya kantitatif sonuca etkisinin azalmasına katkı sağlayabilir; ancak bu özellik inhibitörlerden tamamen bağımsız olduğu anlamına gelmez (8,9). Bu nedenle dPCR uygulamalarında internal kontrol, ekstraksiyon kontrolü, inhibisyon değerlendirmesi ve uygun raporlama standartları zorunlu kalite bileşenleri olarak ele alınmalıdır (6,7).

Dijital PCR (dPCR), hedef nükleik asidin çok sayıda bağımsız reaksiyon bölmesine ayrılarak pozitif/negatif son nokta sinyalleri üzerinden kantifiye edildiği genel moleküler tanı yaklaşımını ifade eder; droplet digital PCR (ddPCR) ise bu genel yaklaşımın damlacık tabanlı bir alt tipidir ve reaksiyon karışımı yağ fazı içinde binlerce veya milyonlarca su fazı damlacığına ayrılarak her damlacık bağımsız bir PCR mikoreaktörü olarak değerlendirilir (2–5). Bu nedenle dPCR terimi tüm dijital PCR teknolojilerini kapsayan üst başlık olarak kullanılmalı, ddPCR ise özellikle damlacık tabanlı platformlardan söz edilirken tercih edilmelidir (3,4). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında dPCR’nin kullanım alanları giderek genişlemektedir. Viral yük kantifikasyonu, tedavi yanıtının izlenmesi, düşük düzeyli vireminin değerlendirilmesi, latent veya persistan enfeksiyonlarda rezidüel nükleik asit saptanması, kan dolaşımı enfeksiyonlarında hızlı patojen tanımlama, solunum yolu viral enfeksiyonlarında düşük viral yük örneklerinin analizi, paraziter enfeksiyonlarda düşük yoğunluklu hedeflerin belirlenmesi ve antimikrobiyal direnç genlerinin kantitatif izlenmesi bu uygulama alanları arasında yer almaktadır (7,8,10). COVID-19 pandemisi sırasında yapılan çalışmalar, dPCR’nin özellikle düşük viral

yüklü örneklerde, sınırda pozitifliklerde ve referans yöntemlerle uyumsuz sonuçların değerlendirilmesinde tamamlayıcı bir moleküler araç olarak öne çıkabileceğini göstermiştir (10). Benzer biçimde yoğun bakım pratiğinde kan dolaşımı enfeksiyonlarının hızlı tanısına yönelik çoklu ddPCR yaklaşımları, damlacık tabanlı yüksek bölmeleme kapasitesi sayesinde patojen saptama süresini kısaltma ve kantitatif mikrobiyal yük bilgisi sağlama potansiyeli nedeniyle klinik karar süreçleri açısından önem taşımaktadır (11).

Bununla birlikte dPCR, qPCR'nin doğrudan yerine geçen evrensel bir yöntem olarak değerlendirilmemelidir. Yöntemin klinik laboratuvara entegrasyonu; cihaz altyapısı, örnek başına maliyet, iş akışı kapasitesi, çoklu hedef sayısı, laboratuvar personel eğitimi, sonuç yorumlama algoritmaları, klinik eşik değerlerin tanımlanması ve kalite güvence süreçleri gibi değişkenlere bağlıdır (7,8). Ayrıca dPCR sonuçlarının klinik anlamı yalnızca analitik duyarlılık üzerinden yorumlanamaz; hedef nükleik asidin canlı mikroorganizmayı temsil edip etmediği, enfeksiyon ile kolonizasyon ayrımı, tedavi sonrası nükleik asit kalıcılığı ve örnek tipine özgü kantitatif eşikler klinik bağlamla birlikte değerlendirilmelidir (8,10,11). Bu nedenle dPCR, tıbbi mikrobiyolojide en yüksek değeri; iyi tanımlanmış klinik endikasyonlarda, validasyonu yapılmış hedeflerle, uygun kalite kontrolleriyle ve klinik-laboratuvar iletişimi içinde kullanıldığında sağlar.

Bu bölümünde dijital PCR'nin temel prensipleri, platform türleri, analitik performans özellikleri, kalite kontrol ve validasyon gereklilikleri ile tıbbi mikrobiyolojideki başlıca uygulamaları bilimsel literatür temelinde ele alınacaktır. Bölümün temel amacı, dPCR'nin enfeksiyon hastalıkları tanısındaki potansiyelini abartılı bir teknoloji söyleminden uzak biçimde, güçlü yönleri ve sınırlılıklarıyla birlikte değerlendirmek; viral, bakteriyel, fungal, parazitler ve antimikrobiyal direnç odaklı

kullanım alanlarını klinik laboratuvar gerçekliği içinde tartışmaktır.

2. DİJİTAL PCR'IN TEMEL PRENSİPLERİ

Dijital PCR, hedef nükleik asit moleküllerinin çok sayıda bağımsız mikoreaksiyona ayrılması, her mikoreaksiyonun amplifikasyon sonrası pozitif veya negatif olarak sınıflandırılması ve pozitif reaksiyon oranından başlangıç hedef kopya sayısının hesaplanması esasına dayanır (2,4,5). Bu yönüyle dPCR, amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak izlendiği ve kantifikasyonun döngü eşiği değerleri ile standart eğriye dayandığı qPCR'den ayrılır. dPCR'de temel ölçüm birimi döngü eşiği değil, hedef molekül içeren ve içermeyen bağımsız reaksiyon bölmelerinin sayısıdır (4,5). Bu nedenle yöntem, uygun deneysel koşullarda dış standart eğri gerektirmeden mutlak kantifikasyon sağlayabilir (4,12).

Dijital PCR süreci genel olarak dört ana aşamadan oluşur: nükleik asit ekstraksiyonu ve reaksiyon karışımının hazırlanması, örneğin çok sayıda bağımsız bölmeye ayrılması, her bölmede son nokta PCR amplifikasyonunun gerçekleşmesi ve pozitif/negatif bölme sayılarından hedef kopya sayısının hesaplanması (4,6,8). DNA hedefleri için süreç ekstrakte edilmiş DNA üzerinden yürütülürken, RNA hedeflerinde ters transkripsiyon basamağı gereklidir. RNA hedeflerinde elde edilen sonuç, yalnızca dPCR basamağının değil, aynı zamanda örnek işleme, RNA stabilitesi, ekstraksiyon verimi ve ters transkripsiyon etkinliğinin birleşik sonucunu yansıtır (6,8). Bu nedenle özellikle viral RNA kantifikasyonu gibi uygulamalarda internal kontrol ve süreç kontrolü kritik öneme sahiptir (6,8).

Yöntemin “dijital” olarak adlandırılmasının nedeni, her bölmenin amplifikasyon sonrası ikili bir sonuç üretmesidir: hedef molekül varsa pozitif, yoksa negatif sinyal elde edilir (2,4).

Pozitif bölmelerde floresan sinyal eşik değerinin üzerine çıkar; negatif bölmelerde ise hedef amplifikasyonu olmadığı için sinyal eşik altında kalır. Böylece sürekli bir amplifikasyon eğrisi yerine, çok sayıda bağımsız reaksiyondan oluşan pozitif/negatif bir veri matrisi elde edilir (4,5). Bu yaklaşım, düşük kopya sayılı hedeflerin arka plan nükleik asit içerisinden ayrılmasını kolaylaştırabilir; ancak bu üstünlük, eşik belirleme, yeterli bölme sayısı, uygun kontroller ve doğru istatistiksel düzeltme koşullarına bağlıdır (5,6,8).

Dijital PCR'ın kantitatif temelinde hedef moleküllerin bölmelere rastgele dağıldığı varsayımı yer alır. Örnek çok sayıda bölmeye ayrıldığında bazı bölmeler hedef molekül içermezken, bazı bölmeler bir veya daha fazla hedef molekül içerebilir. Sadece pozitif bölme oranına bakmak, özellikle aynı bölmede birden fazla hedef molekül bulunabildiği durumlarda gerçek başlangıç kopya sayısını olduğundan düşük gösterebilir. Bu nedenle dPCR'de kantifikasyon Poisson istatistiği ile düzeltilir (4,5). Pozitif bölme oranı p olarak tanımlandığında, bölme başına ortalama hedef molekül sayısı $\lambda = -\ln(1 - p)$ formülüyle hesaplanır; daha sonra bu değer bölme hacmi, toplam reaksiyon hacmi ve varsa dilüsyon faktörü dikkate alınarak kopya/reaksiyon, kopya/ μL veya klinik örnek hacmine göre kopya/mL gibi birimlere dönüştürülür (4,5).

Poisson temelli hesaplama, dPCR'nin mutlak kantifikasyon gücünü oluşturmakla birlikte, belirli varsayımlara dayanır. Bölme hacimlerinin mümkün olduğunca eşit olması, hedef moleküllerin reaksiyon karışımı içinde homojen dağılması, bölmeler arasında çapraz kontaminasyon olmaması ve her bölmenin bağımsız bir PCR mikroreaktörü gibi davranması beklenir (5,6,8). Bölme hacmindeki değişkenlik, yetersiz karışım, damlacık kaybı, eksik bölme oluşumu, pipetleme hataları veya inhibisyon gibi faktörler pozitif/negatif oranını etkileyerek kantitatif doğruluğu azaltabilir (5,6,8). Bu nedenle dPCR yalnızca

cihazın ürettiği sayısal sonuca indirgenmemeli; örnek hazırlama, bölme kalitesi, amplifikasyon başarısı ve veri analizi birlikte değerlendirilmelidir (6,8).

Dijital PCR’da analitik duyarlılık, yalnızca teorik olarak tek molekül saptayabilme kapasitesiyle açıklanamaz. Gerçek laboratuvar koşullarında duyarlılık; örnek hacmi, ekstraksiyon verimi, reaksiyona eklenen nükleik asit miktarı, hedef dizinin bütünlüğü, primer-prob tasarımı, bölme sayısı ve negatif kontrollerdeki arka plan sinyali gibi çok sayıda değişkene bağlıdır (6,8). Çok düşük hedef konsantrasyonlarında pozitif bölme sayısı azaldığı için rastlantısal dağılımın etkisi artar ve güven aralığı genişler (5,6). Buna karşılık çok yüksek hedef konsantrasyonlarında bölmelerin büyük kısmı pozitif hâle gelir ve sistem doyumluğa yaklaşır; bu durumda negatif bölme sayısı azaldığından Poisson düzeltmesinin belirsizliği artar (4,5). Bu nedenle klinik uygulamalarda uygun dilüsyon aralığının belirlenmesi ve ölçümün dinamik aralık içinde yapılması gerekir (5,6). Sonuçların doğru yorumlanmasında eşik belirleme önemli bir basamaktır. dPCR’de pozitif ve negatif bölmeler çoğu zaman floresan amplitüdlerine göre ayrılır; ancak bazı bölmeler net negatif veya net pozitif kümeler arasında yer alabilir. Bu ara sinyal alanı, damlacık dijital PCR literatüründe sıklıkla “rain” olarak tanımlanır ve kısmi amplifikasyon, inhibitör etkisi, hedef/prob etkileşimindeki değişkenlik, düşük şablon kalitesi veya teknik faktörlerle ilişkili olabilir (8). Eşik değerinin hatalı belirlenmesi yalancı pozitif veya yalancı negatif bölme sınıflamasına yol açabilir. Bu nedenle eşik belirleme yalnızca yazılımın otomatik çıktısına bırakılmamalı; negatif kontrol, pozitif kontrol, no-template kontrol, klinik örnek kümelenmesi ve deneyler arası tekrarlanabilirlik birlikte değerlendirilmelidir (6,8). Dijital PCR’da kesinlik ve doğruluk kavramları da birbirinden ayrılmalıdır. Kesinlik, tekrarlanan ölçümlerin birbirine yakınlığını; doğruluk ise ölçülen değer gerçek hedef

konsantrasyona yakınlığını ifade eder. Çok sayıda bölme kullanılması, pozitif/negatif sayımına dayalı istatistiksel belirsizliği azaltarak kesinliği artırabilir (5). Ancak doğruluk; hedef dizinin doğru seçimi, nükleik asit ekstraksiyonunun verimi, inhibisyon kontrolü, bölme hacminin güvenilirliği ve kalibrasyon/validasyon süreçleriyle ilişkilidir (6,8,12). Dolayısıyla yüksek bölme sayısı tek başına analitik güvenilirlik için yeterli değildir; yöntem, hedefe ve örnek türüne özgü olarak valide edilmelidir (6,8).

Dijital PCR'in önemli özelliklerinden biri de kantitatif sonucun amplifikasyon verimliliğindeki bazı değişkenliklerden qPCR'ye kıyasla daha az etkilenebilmesidir. qPCR'de kantifikasyon, floresan sinyalin belirli bir döngü eşiğine ulaşma zamanına bağlıdır ve bu nedenle amplifikasyon verimliliği, standart eğri kalitesi ve reaksiyon inhibitörleri sonucu doğrudan etkileyebilir (1). dPCR'de ise amplifikasyon son noktada pozitif veya negatif olarak değerlendirildiğinden, hedef yeterli düzeyde amplifiye olduğu sürece kantifikasyon pozitif/negatif bölme sayısına dayanır (4,9). Ancak bu durum, dPCR'nin inhibisyonla tamamen bağımsız olduğu anlamına gelmez. Güçlü inhibitör varlığında pozitif bölmelerin floresan amplitüdü düşebilir, ara sinyal alanı genişleyebilir veya bazı hedef içeren bölmeler negatif sınıflandırılabilir (8,9). Bu nedenle klinik örneklerde inhibisyon kontrolü ve uygun internal kontrol kullanımı zorunludur (6,8,9).

Dijital PCR'da raporlanan sonuç, kullanılan platforma ve klinik bağlama göre farklı birimlerle ifade edilebilir. Araştırma uygulamalarında kopya/ μ L reaksiyon veya kopya/ μ L ekstrakt sık kullanılırken, klinik mikrobiyoloji uygulamalarında sonuçların örnek hacmine, örnek tipine veya klinik karar eşiklerine göre dönüştürülmesi gerekebilir (6,8). Örneğin plazmada viral yük değerlendirilirken kopya/mL, solunum yolu örneklerinde ekstrakt hacmine göre normalize edilmiş kopya sayısı veya direnç geni kantifikasyonunda hedef genin toplam bakteri yüküne oranı

raporlanabilir. Bu dönüşümlerde ekstraksiyon hacmi, elüsyon hacmi, reaksiyona eklenen nükleik asit miktarı ve dilüsyon faktörleri açık biçimde belirtilmelidir (6,8).

Sonuç olarak dPCR'nin temel prensibi, hedef nükleik asitlerin çok sayıda bağımsız reaksiyon bölmesine ayrılması, son nokta amplifikasyonu sonrası pozitif/negatif bölme sayısının yapılması ve Poisson istatistiğiyle mutlak kopya sayısının hesaplanmasıdır (2,4,5). Bu yapı, dPCR'ye düşük kopya sayılı hedeflerde yüksek kantitatif duyarlılık, standart eğriden bağımsız ölçüm ve bazı inhibitör etkilerine karşı görece dayanıklılık gibi avantajlar sağlayabilir (4,9,12). Bununla birlikte yöntemin güvenilirliği; uygun örnek hazırlığı, doğru bölmeleme, yeterli kontrol kullanımı, eşik belirleme, Poisson varsayımlarının geçerliliği ve kantitatif dijital PCR deneylerinin yayınlanması için gerekli asgari bilgileri tanımlayan dMIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments) kılavuzuna uygun raporlama ile doğrudan ilişkilidir (6,8).

3. DİJİTAL PCR PLATFORMLARI

Dijital PCR platformları, aynı temel kantifikasyon prensibini paylaşmakla birlikte örneğin bölmelere ayrılma biçimi, bölme sayısı, bölme hacmi, floresan okuma yöntemi, iş akışı ve veri analiz algoritmaları açısından farklılık gösterir. Tüm platformlarda amaç, reaksiyon karışımını çok sayıda bağımsız mikrореaksiyona ayırmak, amplifikasyon sonrasında her bölmeyi pozitif veya negatif olarak sınıflandırmak ve pozitif bölme oranından Poisson istatistiğiyle başlangıç hedef kopya sayısını hesaplamaktır (4,5). Bu nedenle platformlar arasındaki temel fark, PCR kimyasından çok bölmeleme teknolojisi ve sinyal okuma sisteminden kaynaklanır (4).

Günümüzde dPCR sistemleri genel olarak damlacık tabanlı, çip/plaka tabanlı ve nanofluidik/mikroakışkan tabanlı platformlar olarak sınıflandırılabilir (4,13). Damlacık dijital PCR sistemlerinde reaksiyon karışımı yağ fazı içerisinde binlerce veya milyonlarca su fazı damlacığına ayrılır; her damlacık bağımsız bir PCR mikoreaktörü gibi davranır (3,4). Amplifikasyon sonrasında damlacıklar floresan sinyaline göre pozitif veya negatif olarak okunur. Bu format, yüksek bölme sayısı sayesinde düşük kopya sayılı hedeflerin saptanması, nadir varyantların ölçülmesi ve hassas kantifikasyon açısından önemli avantaj sağlar (3,12). Bununla birlikte damlacık oluşumu, damlacık stabilitesi, emülsiyon bozulması ve ara floresan sinyallerinin yorumlanması analitik performansı etkileyebilir (6,8).

Çip veya plaka tabanlı dPCR sistemlerinde örnek, önceden tanımlanmış mikrokuyucuklara ya da sabit hacimli reaksiyon bölmelerine dağıtılır (4,13). Bu sistemlerde bölme hacimleri fiziksel olarak tanımlandığı için kantitatif hesaplama daha standart bir mimariye dayanır. Ancak eksik dolum, hava kabarcığı, yükleme verimliliği ve çip yüzeyine bağlı teknik değişiklikler sonuçları etkileyebilir (4,13). Nanofluidik sistemlerde ise mikrokanaallar, valfler ve çok küçük hacimli reaksiyon odacıkları kullanılır. Bu yaklaşım, kopya sayısı değişikliklerinin analizi ve düşük hacimli reaksiyonların kontrollü yürütülmesi açısından erken dönem dPCR uygulamalarında önemli bir yer tutmuştur (14).

Platform seçiminde yalnızca bölme sayısı veya analitik duyarlılık dikkate alınmamalıdır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için örnek sayısı, hedef çeşitliliği, sonuç verme süresi, cihaz ve sarf maliyeti, kontaminasyon riski, otomasyon düzeyi, personel deneyimi ve kalite kontrol altyapısı birlikte değerlendirilmelidir (6,7,8). Aynı primer-prob seti farklı dPCR platformlarında tamamen aynı performansı göstermeyebilir; çünkü bölme hacmi, termal döngü koşulları, optik okuma sistemi

ve eşikleme algoritmaları sonuçları etkileyebilir (6,13). Bu nedenle qPCR'den dPCR'ye yöntem aktarımı yapılırken yalnızca primer-prob uyumluluğu değil, tüm analitik süreç yeniden valide edilmelidir (6,8).

Sonuç olarak dPCR platformları, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarına yüksek duyarlılık ve mutlak kantifikasyon olanağı sunar; ancak hiçbir platform tüm klinik uygulamalar için evrensel olarak üstün değildir. En uygun platform seçimi, hedef patojen veya gen, beklenen kopya sayısı, örnek türü, klinik karar gereksinimi, validasyon kapasitesi ve maliyet-etkinlik dengesi birlikte değerlendirilerek yapılmalıdır (7,8,13).

4. QPCR VE DİĞER MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRMA

Dijital PCR, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan moleküler yöntemler içinde en çok qPCR ile karşılaştırılır. Her iki yöntem de hedef nükleik asidin primer ve prob temelli amplifikasyonuna dayanır; ancak kantifikasyon mantıkları farklıdır. qPCR'de floresan sinyal amplifikasyonun her döngüsünde izlenir ve hedef miktarı çoğunlukla döngü eşiği değeri ile standart eğriye göre hesaplanır (1). dPCR'de ise reaksiyon çok sayıda bağımsız bölmeye ayrılır, amplifikasyon sonrasında her bölme pozitif veya negatif olarak sınıflandırılır ve hedef kopya sayısı Poisson istatistiği ile hesaplanır (4,5). Bu nedenle dPCR, uygun koşullarda dış standart eğriye ihtiyaç duymadan mutlak kantifikasyon sağlayabilir (4,12).

Dijital PCR'in en önemli üstünlükleri yaygın laboratuvar altyapısına sahip olması, kısa sonuç verme süresi, yüksek örnek işleme kapasitesi ve klinik tanıda iyi standardize edilmiş iş akışlarıdır (1,7). Viral solunum yolu enfeksiyonları, gastrointestinal patojen panelleri, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve kantitatif viral yük izlemi gibi birçok alanda

qPCR halen temel moleküler yöntemdir. Bununla birlikte qPCR’de kantifikasyon amplifikasyon verimliliği, standart eğri kalitesi, örnek inhibitörleri ve eşik döngüsü yorumundan etkilenebilir (1,9). dPCR ise son nokta pozitif/negatif okuma yaptığı için bazı inhibitör etkilerine karşı qPCR’ye göre daha toleranslı olabilir ve düşük kopya sayılı hedeflerde daha hassas kantitatif değerlendirme sağlayabilir (7,9).

Konvansiyonel uç nokta PCR, hedef varlığını göstermek açısından yararlı olmakla birlikte kantitatif bilgi sağlamaz ve kontaminasyon riski, jel elektroforezi gereksinimi ve sınırlı dinamik aralık gibi nedenlerle klinik mikrobiyolojide yerini büyük ölçüde gerçek zamanlı PCR temelli yöntemlere bırakmıştır (1,7). dPCR ise uç nokta okuma yapmasına rağmen pozitif/negatif bölme sayımı sayesinde kantitatif sonuç üretebilir (4,5). Bu yönüyle dPCR, teknik olarak son nokta amplifikasyonuna dayansa da analitik çıktı bakımından klasik PCR’den belirgin biçimde ayrılır.

İzotermal amplifikasyon yöntemleri, özellikle LAMP, sabit sıcaklıkta hızlı amplifikasyon sağlayabilmesi ve karmaşık termal döngü cihazlarına gereksinim duymaması nedeniyle saha koşulları ve hızlı tanı uygulamaları açısından önemlidir (16). LAMP tabanlı testler hızlı ve pratik olmakla birlikte, kantitatif doğruluk, çoklu hedef analizi ve düşük düzeyli hedeflerin güvenilir ölçümü açısından dPCR ile aynı analitik çerçeveye sahip değildir (7,16). Buna karşılık dPCR, daha karmaşık cihaz altyapısı gerektirse de mutlak kantifikasyon, nadir hedeflerin saptanması ve direnç gen yükünün izlenmesi gibi uygulamalarda avantaj sağlayabilir (7,8).

Metagenomik yeni nesil dizileme, örnekteki tüm nükleik asit içeriğinin sekanslanmasına dayandığı için beklenmeyen, nadir veya kültürde üretilmeyen patojenlerin saptanmasında güçlü bir yöntemdir (15). Ancak mNGS; örnek hazırlığı, insan

DNA'sı baskınlığı, biyoinformatik analiz, kontaminasyon ayrımı, maliyet ve sonuç verme süresi bakımından önemli sınırlılıklar taşır (15). dPCR ise hedefe yönelik bir yöntemdir; bu nedenle bilinmeyen patojeni keşfetmez, fakat bilinen bir hedefin düşük kopya düzeylerinde hassas ve kantitatif olarak izlenmesine olanak sağlar (7,8). Bu açıdan mNGS ve dPCR birbirinin alternatifi olmaktan çok tamamlayıcı yöntemler olarak değerlendirilmelidir. mNGS ile tanımlanan bir patojen veya direnç geni, dPCR ile doğrulanabilir ve kantitatif olarak izlenebilir (7,15).

Sonuç olarak qPCR, rutin tanıda hız, erişilebilirlik ve standardizasyon avantajı nedeniyle temel yöntem olmayı sürdürmektedir. dPCR ise düşük kopya sayılı hedeflerin kantifikasyonu, inhibitör içeren örneklerde daha dayanıklı ölçüm, nadir varyantların saptanması ve standart eğriden bağımsız mutlak kantifikasyon gibi alanlarda qPCR'ye tamamlayıcı değer sağlar (7,8,9). LAMP gibi hızlı izotermal yöntemler saha ve hızlı tarama uygulamalarında; mNGS ise geniş kapsamlı patojen keşfi ve kompleks enfeksiyonların çözümünde öne çıkar (15,16). Bu nedenle klinik mikrobiyolojide yöntem seçimi, hedef patojen, klinik soru, örnek türü, beklenen mikrobiyal yük, maliyet, süre ve laboratuvar altyapısı birlikte değerlendirilerek yapılmalıdır (7,8).

5. TIBBİ MİKROBİYOLOJİDE TANISAL UYGULAMALAR

Dijital PCR, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında özellikle düşük kopya sayılı hedeflerin saptanması, patojen yükünün kantitatif izlenmesi, tedavi yanıtının değerlendirilmesi ve sınıra yakın moleküler sonuçların doğrulanması açısından önemli bir tamamlayıcı yöntemdir (7,8). Yöntemin temel avantajı, hedef nükleik asidi çok sayıda bağımsız reaksiyon bölmesine ayırarak pozitif/negatif sinyal üzerinden mutlak kantifikasyon sağlamasıdır (4,5). Bu özellik, özellikle klasik

qPCR’de döngü eşiği değerin yüksek olduğu, standart eğriye bağlı belirsizliğin arttığı veya inhibitör etkisinin sonucu etkileyebildiği örneklerde klinik değer taşır (7,9).

Klinik mikrobiyolojide dPCR’nin tanısal kullanımı en belirgin olarak viral enfeksiyonlarda öne çıkmıştır. Viral yük izlemi, antiviral tedavi yanıtının değerlendirilmesi, düşük düzeyli vireminin saptanması ve persistan ya da latent enfeksiyonlarda rezidüel nükleik asit varlığının gösterilmesi bu kapsamda değerlendirilebilir (7,10). SARS-CoV-2 pandemisi sırasında yapılan çalışmalar, dPCR’nin özellikle düşük viral yüklü örneklerde, sınırda pozitif qPCR sonuçlarında ve referans materyal geliştirme süreçlerinde yararlı olabileceğini göstermiştir (10). Bununla birlikte pozitif dPCR sonucu her zaman canlı ve bulaştırıcı virüs varlığı anlamına gelmez; bu nedenle sonuçlar örnek tipi, klinik dönem ve hastanın bağışıklık durumu ile birlikte yorumlanmalıdır (8,10).

Bakteriyel enfeksiyonlarda dPCR’nin potansiyel kullanım alanları arasında kan dolaşımı enfeksiyonlarının hızlı tanısı, düşük düzeyli bakteriyeminin saptanması, kültür negatif ancak klinik olarak enfeksiyon şüphesi güçlü olguların değerlendirilmesi ve hedefe yönelik patojen kantifikasyonu yer alır (7,11). Yoğun bakım pratiğinde multiplex ddPCR yaklaşımları, kan kültürüne göre daha kısa sürede patojen nükleik asidi gösterebilme potansiyeli nedeniyle dikkat çekmektedir (11). Ancak bakteriyel DNA saptanması, canlı bakteri varlığını veya kesin enfeksiyon tanısını tek başına kanıtlamaz. Özellikle kontaminasyon, antibiyotik tedavisi sonrası rezidüel DNA ve kolonizasyon-enfeksiyon ayrımı klinik yorumlamada dikkate alınmalıdır (7,8,11).

Dijital PCR, antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması ve kantifikasyonunda da önemli bir uygulama alanına sahiptir. Direnç genlerinin yalnızca var/yok şeklinde değil, belirli bir

örnekteki yükünün kantitatif olarak değerlendirilmesi; dirençli alt popülasyonların izlenmesi, tedavi baskısı altında direnç gen dinamiklerinin değerlendirilmesi ve süreyans amaçlı analizler için yararlı olabilir (7,8). Bununla birlikte direnç geninin varlığı her zaman fenotipik dirençle bire bir örtüşmeyebilir; gen ekspresyonu, genin bulunduğu bakteri türü, mobil genetik elemanlar ve eşlik eden direnç mekanizmaları sonuçların klinik karşılığını etkileyebilir (7,8).

Fungal, mikobakteriyel ve paraziter enfeksiyonlarda dPCR'nin temel değeri çoğunlukla düşük hedef kopya sayısı, zor kültür koşulları veya uzun sonuç verme süresi olan klinik senaryolarda ortaya çıkar (7). Bu örneklerde yöntemin başarısı, hedef dizinin özgüllüğü kadar örnek hazırlama ve nükleik asit ekstraksiyonunun etkinliğine de bağlıdır (8). Özellikle mikobakteriler ve bazı mantarlarda hücre duvarı yapısı nedeniyle ekstraksiyon verimi değişken olabilir; bu nedenle internal kontrol, ekstraksiyon kontrolü ve uygun validasyon basamakları zorunludur (8).

Sonuç olarak dPCR, tıbbi mikrobiyolojide rutin qPCR'nin yerini alan genel bir tarama yöntemi olmaktan çok, belirli klinik sorulara yüksek duyarlılık ve kantitatif doğrulukla yanıt verebilen tamamlayıcı bir teknolojidir (7,8). En uygun kullanım alanları; düşük mikrobiyal yük, sınırda qPCR pozitifliği, tedavi yanıtının kantitatif izlemi, direnç gen yükünün değerlendirilmesi ve kültürle sonuç alınması güç enfeksiyon senaryolarıdır (7,10,11).

5.1. Viral Enfeksiyonlar

Dijital PCR, viral enfeksiyonların laboratuvar tanısında özellikle düşük viral yüklerin saptanması, viral yükün mutlak kantifikasyonu, tedavi yanıtının izlenmesi ve sınırda pozitif qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi açısından önemli bir tamamlayıcı yöntemdir (7,10). Viral enfeksiyonlarda klinik karar çoğu zaman yalnızca etkenin varlığına değil, viral yük düzeyine,

viral yük kinetiğine ve hastanın bağışıklık durumuna bağlıdır. Bu nedenle dPCR'nin standart eğriye bağımlı olmadan kopya sayısı verebilmesi, özellikle immünsüpre hastalarda, transplant alıcılarında, kronik viral enfeksiyonlarda ve antiviral tedavi izlemlerinde analitik açıdan değerli olabilir (7,8).

Sitomegalovirüs (CMV), dPCR uygulamalarının en iyi çalışılmış viral örneklerinden biridir. CMV enfeksiyonu özellikle hematopoetik kök hücre ve solid organ transplant alıcılarında morbidite açısından önem taşır ve viral yük takibi preemptif tedavi kararlarında kritik rol oynar (17,18). Hayden ve arkadaşları, CMV yük testinde ddPCR ile gerçek zamanlı PCR'yi karşılaştırmış ve her iki yöntemin geniş bir dinamik aralıkta kantitatif sonuç sağlayabildiğini, ancak klinik örneklerde qPCR'nin bazı koşullarda daha yüksek duyarlılık gösterebildiğini bildirmiştir (17). Sedlak ve arkadaşları ise plazma örneklerinde ddPCR'nin qPCR'ye benzer duyarlılıkta olduğunu ve özellikle daha yüksek viral yüklerde kantitatif kesinliği artırabildiğini göstermiştir (18). Bu bulgular, dPCR'nin CMV izlemini tamamen qPCR'nin yerine geçirecek bir yöntem olarak değil, belirli klinik senaryolarda kantitatif belirsizliği azaltabilecek tamamlayıcı bir araç olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (17,18).

HIV enfeksiyonunda dPCR, özellikle hücre ilişkili HIV DNA'sının, proviral rezervuarın ve düşük düzeyli persistan viral genetik materyalin kantifikasyonunda önem taşır (19). Antiretroviral tedavi altında plazma viral RNA baskılansa bile, hücrel HIV DNA rezervuarı kür çalışmaları ve tedavi stratejilerinin değerlendirilmesi açısından kritik bir parametredir. Powell ve arkadaşları, farklı HIV-1 alt tiplerinde kantitatif HIV-1 DNA ddPCR testini klinik olarak valide etmiş ve yöntemin okült HIV enfeksiyonunun araştırılması ve hücre ilişkili HIV dinamiklerinin izlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (19).

HBV enfeksiyonunda dPCR'nin önemli kullanım alanlarından biri, kovalent kapalı sirküler DNA'nın kantifikasyonudur. HBV cccDNA, viral persistansın temel göstergelerinden biri kabul edilir ve karaciğer dokusunda düşük düzeylerde bulunabilir (20). Hayashi ve arkadaşları, HBV cccDNA kantifikasyonu için ddPCR tabanlı bir yaklaşım geliştirmiş ve yöntemin qPCR'ye göre daha özgül ve duyarlı ölçüm sağlayabileceğini bildirmiştir (20). Bu tür uygulamalar, özellikle fonksiyonel kür hedefleyen tedavilerin değerlendirilmesinde önem taşır; ancak cccDNA ölçümü örnek türü, doku miktarı ve ekstraksiyon verimi gibi değişkenlerden etkilenir (8,20).

SARS-CoV-2 pandemisi, dPCR'nin viral tanıdaki potansiyelini daha görünür hâle getirmiştir. dPCR, düşük viral yüklü örneklerde, qPCR ile sınırda sonuç veren olgularda ve referans materyal standardizasyonunda yararlı olabilir (10,21). Sun ve arkadaşları, dPCR'nin düşük viral yüklü SARS-CoV-2 örneklerinde duyarlı bir yaklaşım sağlayabileceğini bildirmiştir (21). Bununla birlikte viral RNA saptanması, enfeksiyöz virüs varlığını veya bulaştırmacılığı tek başına göstermez. Bu nedenle viral dPCR sonuçları her zaman örnek tipi, klinik evre, immün durum, tedavi öyküsü ve eş zamanlı laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır (8,10).

5.2. Bakteriyel Enfeksiyonlar

Bakteriyel enfeksiyonlarda dijital PCR'ın temel kullanım alanı, hedef bakteriyel DNA'nın hızlı, duyarlı ve kantitatif olarak saptanmasıdır. Klasik bakteriyolojik tanıda kültür hâlen altın standart konumunu korumaktadır; çünkü canlı mikroorganizmanın izolasyonunu, tür düzeyinde tanımlamayı ve fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testlerini mümkün kılar. Ancak kültür sonuçlarının saatler veya günler içinde alınması, önceden antibiyotik kullanımı, düşük bakteri yükü, zor üreyen

mikroorganizmalar ve polimikrobiyal enfeksiyonlar tanısı al duyarlılığı azaltabilir (7,11). dPCR bu noktada, özellikle bilinen hedef bakterilerin veya belirli patojen panellerinin doğrudan klinik örnekten saptanmasında tamamlayıcı bir moleküler yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (7,11).

Kan dolaşımı enfeksiyonları ve sepsis, bakteriyel dPCR uygulamalarının en yoğun çalışıldığı alanlardır. Bu klinik tablolarda erken etken tanısı, uygun antimikrobiyal tedavinin zamanında başlanması ve gereksiz geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının azaltılması açısından kritik önemdedir (11,22). Wu ve arkadaşları, yoğun bakım hastalarında şüpheli kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında multiplex ddPCR yaklaşımını değerlendirmiş ve yöntemin kan kültürüne ek olarak hızlı patojen ve direnç geni saptama potansiyeli taşıdığını bildirmiştir (11). Hu ve arkadaşları ise kritik hastalarda ddPCR, metagenomik yeni nesil dizileme ve kan kültürünü karşılaştırmış; ddPCR'nin yaygın bakteriyel patojenlerin ve bazı antimikrobiyal direnç genlerinin hızlı saptanmasında yararlı olabileceğini, mNGS'nin ise klasik yöntemlerle açıklanamayan kompleks enfeksiyonlarda daha geniş etken araştırması sağladığını göstermiştir (22).

Dijital PCR'ın bakteriyel enfeksiyonlardaki bir diğer avantajı, yalnızca var/yok sonucu üretmemesi, aynı zamanda bakteri DNA yükünü kantitatif olarak verebilmesidir (7,23). Lin ve arkadaşlarının şüpheli kan dolaşımı enfeksiyonlarında yaptığı çalışmada ddPCR ile saptanan patojen yükünün klinik inflamatuvar göstergelerle ilişkili olabileceği ve yöntemin antibiyotik yönetimine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (23). Benzer şekilde Kitagawa ve arkadaşları, *Escherichia coli* kan dolaşımı enfeksiyonlarında tam kanda ölçülen *E. coli* DNA yükünün kan kültürü pozitifleşme zamanı ile ters ilişkili olduğunu göstermiştir (24). Bu bulgular, dPCR'nin yalnızca tanısı al değil, enfeksiyon yükünün izlenmesine yönelik kantitatif bir araç olarak da değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (23,24).

Bununla birlikte bakteriyel dPCR sonuçlarının yorumlanması dikkat gerektirir. Bakteriyel DNA'nın saptanması, her zaman canlı bakteri varlığını veya invaziv enfeksiyonu kanıtlamaz. Antibiyotik tedavisi sonrası rezidüel DNA, örnek alma sırasında kontaminasyon, deri florası kaynaklı sinyaller ve kolonizasyon-enfeksiyon ayrımı klinik değerlendirmede dikkate alınmalıdır (7,8,11). Özellikle düşük kopya sayılı pozitifliklerde negatif kontrol davranışı, örnek türü, klinik bulgular, inflamatuvar belirteçler ve eş zamanlı kültür sonuçları birlikte yorumlanmalıdır (8,23).

Sonuç olarak dPCR, bakteriyel enfeksiyonlarda kültürün yerini alan bağımsız bir yöntemden çok, kültüre ve diğer moleküler yöntemlere tamamlayıcı bir teknolojidir. En güçlü kullanım alanları; sepsis ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında hızlı hedef saptama, düşük bakteri yükü olan örneklerin değerlendirilmesi, polimikrobiyal enfeksiyonlarda kantitatif analiz ve direnç genlerinin eş zamanlı izlenmesidir (7,11,22). Ancak klinik uygulamada yöntemin değeri, validasyonu yapılmış hedef panelleri, uygun kalite kontrolleri ve sonuçların klinik bağlamla birlikte yorumlanması ile doğrudan ilişkilidir (8,11).

5.3. Mikobakteriyel Enfeksiyonlar

Mikobakteriyel enfeksiyonlarda dijital PCR'ın en önemli kullanım alanı, özellikle düşük basil yükü bulunan klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* kompleksine ait DNA'nın duyarlı ve kantitatif olarak saptanmasıdır. Tüberküloz tanısında aside dirençli basil mikroskopisi hızlı ancak düşük duyarlılık; kültür ise duyarlı fakat sonuç verme süresi uzun bir yöntemdir. Moleküler testler bu süreyi kısaltmakla birlikte, paucibacillary hastalık, ekstrapulmoner örnekler, formalinle fikse parafine gömülü dokular ve tedavi başlanmış hastalarda tanısal duyarlılık sınırlı kalabilir (25). dPCR, düşük kopya sayılı hedefleri standart eğriye ihtiyaç duymadan ölçebilmesi nedeniyle

bu klinik boşlukta tamamlayıcı bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (7,25).

Pulmoner tüberkülozda dPCR'nin değeri özellikle yayma negatif ve düşük basil yükü olan olgularda ortaya çıkar. Zhao ve arkadaşları, IS6110 hedefli yeni bir ddPCR yaklaşımının paucibacillary yayma negatif pulmoner tüberkülozda hızlı ve duyarlı *M. tuberculosis* saptamasına katkı sağlayabileceğini göstermiştir (26). Bununla birlikte IS6110 kopya sayısının suşlara göre değişebilmesi ve bazı *M. tuberculosis* kompleks suşlarında düşük kopyalı ya da nadiren negatif olabilmesi, hedef seçiminin dikkatle yapılmasını gerektirir. Bu nedenle tek hedefe dayalı testler yerine IS6110, IS1081 veya tür kompleksine özgü diğer hedeflerin birlikte kullanılması analitik güvenilirliği artırabilir (25,28).

Ekstrapulmoner tüberküloz, dPCR için önemli bir uygulama alanıdır; çünkü bu örneklerde basil yükü çoğu zaman düşük, örnek hacmi sınırlı ve kültür pozitifliği değişkendir. Antonello ve arkadaşları, parafine gömülü doku örneklerinde ddPCR ile *M. tuberculosis* DNA'sının hızlı ve kantitatif olarak gösterilebileceğini bildirmiştir (27). Benzer şekilde Li ve arkadaşları, plevral tüberküloz tanısında plevral sıvıda IS6110 ve IS1081 hedefli dPCR analizinin mikroskopiden, kültürden ve Xpert MTB/RIF'ten daha yüksek duyarlılık sağlayabildiğini ve özgüllüğünün yüksek olduğunu göstermiştir (28). Bu bulgular, dPCR'nin özellikle histopatolojik olarak tüberküloz düşündüren ancak kültür ya da rutin moleküler testlerle doğrulanamayan olgularda destekleyici değer taşıyabileceğini düşündürmektedir (27,28).

Dijital PCR, mikobakteriyel enfeksiyonlarda yalnızca etken saptama amacıyla değil, ilaç direncinin moleküler izlenmesi için de kullanılabilir. Choi ve arkadaşları, *M. tuberculosis* varlığını ve dirençle ilişkili mutasyonları aynı anda

kantitatif olarak değerlendiren multiplex ddPCR yöntemi geliştirmiş; INH, RIF, EMB, florokinolon ve streptomisin direnciyle ilişkili hedeflerde yüksek analitik özgüllük ve değişken fakat klinik olarak anlamlı duyarlılık bildirmiştir (29). Bu yaklaşım, özellikle çok ilaca dirençli tüberkülozda tedaviye yanıtın, dirençli alt popülasyonların ve heterodirenç olasılığının izlenmesi açısından potansiyel taşır (25,29). Bununla birlikte mikobakteriyel dPCR sonuçları klinik bağlamdan bağımsız yorumlanmamalıdır. Pozitif DNA sonucu canlı basil varlığını kesin olarak göstermez; tedavi sonrası rezidüel DNA, kontaminasyon ve kolonizasyon-enfeksiyon ayrımı dikkate alınmalıdır (7,8). Ayrıca mikobakterilerin lipid açısından zengin hücre duvarı nedeniyle ekstraksiyon verimi değişken olabilir. Bu nedenle mikobakteriyel dPCR uygulamalarında mekanik/parçalama basamağı, ekstraksiyon kontrolü, internal kontrol, negatif kontrol ve hedefe özgü validasyon zorunludur (8,25).

5.4. Fungal Enfeksiyonlar

Fungal enfeksiyonlarda dijital PCR, özellikle invaziv hastalık şüphesi bulunan ancak kültür, mikroskopi veya antijen testleriyle kesin tanı konulamayan olgularda tamamlayıcı bir moleküler yöntem olarak değerlendirilmektedir (7,8). İnvaziv kandidiyazis, invaziv aspergilloz, mukormikoz ve *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi gibi enfeksiyonlarda erken tanı klinik sonuçlar açısından kritik önemdedir. Bununla birlikte mantarların bazı klinik örneklerde düşük yükte bulunması, kültür duyarlılığının sınırlı olması, örnek alımının invaziv girişim gerektirmesi ve kolonizasyon-enfeksiyon ayrımının zor olması tanısal süreci güçleştirir (7,30,31).

Kandidemi, fungal dPCR uygulamaları açısından önemli bir örnektir. Kan kültürü kandidemi tanısında temel yöntem olmakla birlikte, sonuç verme süresinin uzun olması ve

duyarlılığın değişkenliği nedeniyle erken antifungal tedavi kararlarında gecikme yaşanabilir (30). Chen ve arkadaşları, kan örneklerinde *Candida* DNA'sının ddPCR ile saptanmasını değerlendirmiş ve yöntemin düşük kopya sayılarında duyarlı kantifikasyon sağlayabildiğini bildirmiştir (30). Bu yaklaşım, özellikle yoğun bakım hastaları, immünsüprese bireyler, neonatal hastalar ve antifungal tedavi altında kültür negatifleşen ancak klinik şüphesi devam eden olgularda destekleyici değer taşıyabilir (30). Ancak pozitif *Candida* DNA sonucu, tek başına invaziv kandidiyazis tanısı olarak yorumlanmamalı; kontaminasyon, geçici DNAemi, kolonizasyon ve klinik bulgular birlikte değerlendirilmelidir (7,8,30).

Pulmoner fungal enfeksiyonlarda dPCR'nin potansiyel katkısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, balgam veya diğer solunum yolu örneklerinde düşük miktardaki fungal DNA'nın hedefe yönelik saptanmasıdır (31,32). Guo ve arkadaşları, pulmoner fungal patojenlerin hızlı ve duyarlı tanımlanması için multiplex ddPCR paneli geliştirmiş ve bu yaklaşımın immünsüprese hastalarda tanısal süreci destekleyebileceğini göstermiştir (31). Bununla birlikte solunum yolu örneklerinde mantar DNA'sının saptanması, her zaman invaziv enfeksiyon anlamına gelmez. Özellikle *Aspergillus* ve *Candida* türlerinde kolonizasyon, çevresel kontaminasyon veya üst solunum yolu florası kaynaklı sinyaller klinik yorumda dikkate alınmalıdır (7,8,31).

Pneumocystis jirovecii pnömonisi, dPCR'nin düşük fungal yük içeren örneklerdeki değerini gösteren önemli bir alandır. Yi ve arkadaşları, solunum yolu örneklerinde *P. jirovecii* DNA'sının ddPCR ile saptanmasını değerlendirmiş ve özellikle düşük patojen yükünde ddPCR'nin qPCR'ye göre daha duyarlı olabileceğini bildirmiştir (32). Jitmuang ve arkadaşları da PCP tanısında ddPCR yaklaşımının klinik performansını değerlendirmiş ve yöntemin hem HIV ilişkili hem de HIV dışı immünsüpresif hasta gruplarında tanıya katkı sağlayabileceğini

göstermiştir (33). Bununla birlikte *P. jirovecii* için temel sorun, aktif pnömoni ile kolonizasyonun ayrılmasıdır. Bu nedenle dPCR ile ölçülen kopya sayısı; radyolojik bulgular, hipoksemi, immünsüpresyon düzeyi, serum beta-D-glukan, mikroskopi ve klinik yanıt ile birlikte yorumlanmalıdır (32,33).

Fungal dPCR uygulamalarında örnek hazırlama basamağı özel önem taşır. Mantar hücre duvarı yapısı nedeniyle nükleik asit ekstraksiyonu bakteriler ve virüslere göre daha değişken olabilir. Bu nedenle mekanik parçalama, ekstraksiyon kontrolü, internal amplifikasyon kontrolü, negatif kontrol ve örnek matrisine özgü validasyon zorunludur (8). Sonuç olarak dPCR, fungal enfeksiyonlarda kültür ve antijen testlerinin yerine geçen tek başına bir yöntem değil; düşük fungal yük, hızlı tanı gereksinimi, tedavi izlemi ve zor örneklerde hedefe yönelik kantifikasyon için tamamlayıcı bir tanı aracıdır (7,8,30–33).

5.5. Paraziter Enfeksiyonlar

Paraziter enfeksiyonlarda dijital PCR'ın temel değeri, düşük parazit yükü bulunan klinik örneklerde hedef DNA'nın duyarlı ve kantitatif olarak saptanabilmesidir. Sıtma, leishmaniasis, Chagas hastalığı, şistozomiyazis ve fırsatçı protozoon enfeksiyonlarında parazit yükü; hastalık evresi, immün durum, tedavi kullanımı ve örnek türüne göre belirgin değişkenlik gösterebilir (7,34). Bu nedenle dPCR, özellikle mikroskobinin negatif veya sınırda olduğu, qPCR sonuçlarının düşük kopya düzeyinde belirsizlik taşıdığı durumlarda tamamlayıcı bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (34,35).

Sıtma tanısında ddPCR'nin en önemli katkısı, düşük yoğunluklu ve asemptomatik *Plasmodium* enfeksiyonlarının saptanması ve parazit yoğunluğunun standart eğriye ihtiyaç duyulmadan kantifiye edilebilmesidir (34). Koepfli ve arkadaşları, ddPCR'nin *P. falciparum* ve *P. vivax* için yüksek tekrarlanabilirlikte kantifikasyon sağlayabildiğini ve özellikle

düşük parazit yoğunluklarında qPCR'ye göre avantaj gösterebildiğini bildirmiştir (34). Pomari ve arkadaşları ise *P. falciparum* DNA'sının tam kan yanında serumda da ddPCR ile saptanabileceğini göstermiştir (35).

Şistozomiyaziste ddPCR, dolaşımdaki hücresiz parazit DNA'sının saptanması açısından önem taşır. Weerakoon ve arkadaşları, farklı klinik örneklerde parazit kaynaklı hücresiz DNA'nın ddPCR ile gösterilebileceğini ve bu yaklaşımın düşük prevalanslı veya düşük yoğunluklu enfeksiyonlarda sürveyans açısından değerli olabileceğini bildirmiştir (36). Chagas hastalığında ise Ramírez ve arkadaşları, *Trypanosoma cruzi* DNA'sını saptamak için ddPCR'yi değerlendirmiş; ancak çalışmada yöntemin rutin kullanımda qPCR'ye belirgin üstünlük sağlamadığı belirtilmiştir (37). Bu bulgu, dPCR'nin her paraziter enfeksiyonda otomatik olarak qPCR'den üstün kabul edilmemesi gerektiğini göstermektedir (37).

Sonuç olarak dPCR, paraziter enfeksiyonlarda özellikle düşük yük, tedavi izlemi, nüks şüphesi ve sürveyans uygulamalarında yararlı olabilir. Ancak sonuçlar örnek türü, parazitin biyolojisi, hedef gen kopya sayısı, DNA kalıcılığı ve klinik bağlamla birlikte yorumlanmalıdır (7,8,34–37).

5.6. Klinik Örnek Türlerine Göre Dijital PCR Uygulamaları

Dijital PCR'ın klinik performansı, yalnızca hedef mikroorganizmaya değil, çalışılan örnek türüne de doğrudan bağlıdır. Kan, plazma, serum, solunum yolu örnekleri, beyin omurilik sıvısı, plevral sıvı, doku örnekleri, dışkı ve idrar gibi farklı klinik materyaller; mikrobiyal yük, inhibitör içeriği, konak nükleik asit miktarı ve ekstraksiyon verimi açısından belirgin farklılık gösterir (7,8). Bu nedenle dPCR uygulamalarında örnek türüne özgü validasyon yapılmadan tek bir analitik performans

değerinin tüm klinik materyallere genellenmesi doğru değildir (8).

Kan ve plazma örnekleri, özellikle viral yük izlemi, kan dolaşımı enfeksiyonları ve kandidemi tanısında öne çıkar. CMV gibi viral enfeksiyonlarda plazma viral yükünün kantitatif izlenmesi tedavi kararları açısından önemlidir ve ddPCR bu alanda qPCR'ye tamamlayıcı bir yöntem olarak değerlendirilebilir (17,18). Benzer şekilde sepsis ve şüpheli kan dolaşımı enfeksiyonlarında tam kan veya plazmada bakteriyel DNA'nın ddPCR ile saptanması, kan kültürüne göre daha kısa sürede sonuç verebilme potansiyeli taşır (11,22,23). Ancak bu örneklerde pozitif DNA sinyali canlı mikroorganizma varlığını kesin olarak göstermez; rezidüel DNA, kontaminasyon ve tedavi sonrası nükleik asit kalıcılığı dikkate alınmalıdır (7,8).

Solunum yolu örneklerinde dPCR; SARS-CoV-2, *Pneumocystis jirovecii*, pulmoner fungal patojenler ve düşük yükte bakteriyel hedeflerin saptanmasında kullanılabilir (10,31,32). Bununla birlikte balgam, nazofarengeal sürüntü ve bronkoalveoler lavaj örnekleri mukus, konak hücreleri ve inhibitör maddeler içerebilir. Bu nedenle internal kontrol ve inhibisyon değerlendirmesi zorunludur (8,9). Ekstrapulmoner tüberkülozda plevral sıvı ve parafine gömülü doku örneklerinde dPCR'nin düşük basil yükünü saptamada yararlı olabileceği gösterilmiştir (27,28). Paraziter enfeksiyonlarda ise tam kan, serum veya hücresiz DNA içeren örneklerde düşük parazit yükünün kantifikasyonu mümkündür (34–36).

Sonuç olarak dPCR'nin klinik değeri, örnek türünün biyolojik özellikleri ve preanalitik süreçlerle yakından ilişkilidir. Her örnek tipi için ekstraksiyon yöntemi, inhibitör kontrolü, hedef seçimi, sonuç birimi ve klinik yorumlama eşikleri ayrı ayrı tanımlanmalıdır (7,8).

6. ANALİTİK VALİDASYON VE KALİTE KONTROL

Dijital PCR’ın klinik laboratuvarlarda güvenilir biçimde kullanılabilmesi için yöntem, hedef mikroorganizma, örnek türü ve platforma özgü olarak valide edilmelidir. Analitik validasyon; analitik özgüllük, limit of blank, limit of detection, limit of quantification, ölçüm aralığı, doğruluk, kesinlik, tekrar edilebilirlik, yeniden üretilebilirlik ve matris etkisinin değerlendirilmesini kapsamalıdır (6,8,38). dPCR mutlak kantifikasyon sağlayabilse de bu özellik, validasyon gereksinimini ortadan kaldırmaz; çünkü bölme hacmi, hedef dağılımı, ekstraksiyon verimi, inhibitör varlığı ve eşik belirleme stratejisi sonucu doğrudan etkileyebilir (8,38).

Kalite kontrol sürecinde no-template kontrol, negatif ekstraksiyon kontrolü, pozitif kontrol ve uygun internal kontrol birlikte kullanılmalıdır (6,8). Klinik örneklerde hemoglobin, heparin, mukus, dışkı bileşenleri veya doku kaynaklı inhibitörler pozitif bölmelerin floresan amplitüdünü düşürebilir ve ara sinyal alanını artırabilir (9). Bu nedenle yalnızca pozitif/negatif sonuç değil, damlacık veya bölme sayısı, pozitif-negatif küme ayrımı, “rain” paterni ve kontrol reaksiyonlarının davranışı da değerlendirilmelidir (8,9). dPCR raporlamasında hedef dizisi, primer-prob bilgisi, örnek hacmi, ekstraksiyon ve elüsyon hacmi, reaksiyona eklenen nükleik asit miktarı, dilüsyon faktörü, kabul edilen bölme sayısı ve sonuç birimi açıkça belirtilmelidir (6,8). Sonuç olarak dPCR’de kalite güvencesi, yalnızca cihaz çıktısını onaylamak değil; preanalitik, analitik ve postanalitik tüm basamakların izlenebilir biçimde kontrol edilmesidir (8,38).

7. AVANTAJLAR, SINIRLILIKLAR VE MALİYET-ETKİNLİK

Dijital PCR'ın başlıca avantajları; standart eğriye gereksinim duymadan mutlak kantifikasyon sağlaması, düşük kopya sayılı hedeflerde duyarlı ölçüm yapabilmesi, bazı inhibitör etkilerine qPCR'ye göre daha toleranslı olması ve nadir varyantların ya da düşük düzeyli patojen yüklerinin saptanmasına olanak vermesidir (7-9). Bu özellikler, özellikle sınırda qPCR sonuçları, düşük mikrobiyal yük, direnç geni kantifikasyonu ve tedavi izlemi gibi klinik senaryolarda değer taşır (7,8). Bununla birlikte dPCR'nin sınırlılıkları arasında cihaz ve sarf maliyeti, platforma özgü iş akışı, sınırlı multiplex kapasite, eşik belirleme güçlükleri, kontaminasyon riski ve klinik yorumlama eşiklerinin her hedef için yeterince standardize edilmemiş olması yer alır (8,13). Bu nedenle dPCR maliyet-etkinliği, rutin taramadan çok seçilmiş klinik endikasyonlarda, yüksek analitik duyarlılığın klinik karar sürecini değiştirebildiği durumlarda daha belirgindir (7,38).

8. GELECEK PERSPEKTİFİ

Dijital PCR'ın gelecekteki gelişimi, daha yüksek multiplex kapasite, kapalı kartuş sistemleri, otomasyon, hızlı örnek hazırlama ve laboratuvar bilgi sistemleriyle entegrasyon ekseninde ilerleyecektir (7,8). Klinik mikrobiyolojide dPCR'nin en güçlü kullanım alanları, düşük mikrobiyal yüklerin saptanması, direnç genlerinin kantifikasyonu, tedavi yanıtının izlenmesi ve salgın dönemlerinde hedefe yönelik doğrulama testleri olacaktır (7,10). Bununla birlikte dPCR'nin rutin kullanıma daha geniş ölçüde girebilmesi için hedefe ve örnek türüne özgü klinik eşiklerin tanımlanması, platformlar arası standardizasyonun güçlendirilmesi ve maliyet-etkinlik verilerinin artırılması gereklidir (8,38). Gelecekte mNGS ile patojen keşfi,

qPCR ile hızlı tarama ve dPCR ile hassas kantifikasyonun birlikte kullanıldığı entegre tanı algoritmaları daha fazla önem kazanacaktır (7,15).

9. SONUÇ

Dijital PCR, tıbbi mikrobiyolojide düşük kopya sayılı hedeflerin saptanması, mutlak kantifikasyon, tedavi yanıtının izlenmesi ve antimikrobiyal direnç gen yükünün değerlendirilmesi açısından güçlü bir moleküler tanı yaklaşımıdır. Viral, bakteriyel, mikobakteriyel, fungal ve paraziter enfeksiyonlarda özellikle sınırda pozitiflikler, düşük mikrobiyal yük ve kültürle tanının güç olduğu klinik senaryolarda tamamlayıcı değer sağlar. Bununla birlikte dPCR, qPCR veya kültürün doğrudan yerine geçen evrensel bir yöntem değildir. Sonuçların klinik anlamı; örnek türü, hedef seçimi, preanalitik süreç, validasyon kalitesi ve hastanın klinik bağlamı ile birlikte değerlendirilmelidir. Bu nedenle dPCR'nin en uygun kullanımı, iyi tanımlanmış klinik endikasyonlarda, standart kalite kontrol süreçleriyle ve mevcut tanı algoritmalarına entegre biçimde uygulanmasıdır.

KAYNAKÇA

1. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
2. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9236–9241.
3. Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610.
4. Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A technology review. *Sensors*, 18(4), 1271.
5. Basu, A. S. (2017). Digital assays part I: Partitioning statistics and digital PCR. *SLAS Technology*, 22(4), 369–386.
6. Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., ... Bustin, S. A. (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 59(6), 892–902.
7. Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2017). Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1621–1628.
8. The dMIQE Group, & Huggett, J. F. (2020). The digital MIQE guidelines update: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, 66(8), 1012–1029.

9. Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of droplet-digital PCR versus real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical Chemistry*, 59(11), 1670–1672.
10. Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Dobnik, D., Neuzil, P., Amoth, P., Mwau, M., & Yu, J. (2022). Digital PCR applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 era: A roadmap for future outbreaks. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3), e00168-21.
11. Wu, J., Tang, B., Qiu, Y., Tan, R., Liu, J., Xia, J., ... Qu, H. (2022). Clinical validation of a multiplex droplet digital PCR for diagnosing suspected bloodstream infections in ICU practice: A promising diagnostic tool. *Critical Care*, 26, 243.
12. Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*, 84(2), 1003–1011.
13. Dong, L., Meng, Y., Sui, Z., Wang, J., Wu, L., & Fu, B. (2015). Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Scientific Reports*, 5, 13174.
14. Dube, S., Qin, J., & Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS ONE*, 3(8), e2876.
15. Chiu, C. Y., & Miller, S. A. (2019). Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), 341–355.

16. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
17. Hayden, R. T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., ... Caliendo, A. M. (2013). Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 540–546.
18. Sedlak, R. H., Cook, L., Cheng, A., Magaret, A., & Jerome, K. R. (2014). Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 2844–2848.
19. Powell, L., Dhumakupt, A., Siems, L., Singh, D., Le Duff, Y., Uprety, P., ... Persaud, D. (2021). Clinical validation of a quantitative HIV-1 DNA droplet digital PCR assay: Applications for detecting occult HIV-1 infection and monitoring cell-associated HIV-1 dynamics across different subtypes in HIV-1 prevention and cure trials. *Journal of Clinical Virology*, 139, 104822.
20. Hayashi, S., Isogawa, M., Kawashima, K., Ito, K., Miyachi, Y., Nakahara, M., ... Chayama, K. (2022). Droplet digital PCR assay provides intrahepatic HBV cccDNA quantification tool for clinical application. *Scientific Reports*, 12, 2133.
21. Sun, Y., Ding, C., Chen, Q., Xie, Y., Wang, Z., Huang, L., ... Li, T. (2021). Digital PCR assay for the effective detection of COVID-19 patients with SARS-CoV-2 low viral load. *Journal of Virological Methods*, 295, 114185.
22. Hu, B., Tao, Y., Shao, Z., Zheng, Y., Zhang, R., Yang, X., ... Sun, R. (2021). A comparison of blood pathogen detection

- among droplet digital PCR, metagenomic next-generation sequencing, and blood culture in critically ill patients with suspected bloodstream infections. *Frontiers in Microbiology*, 12, 641202.
23. Lin, K., Zhao, Y., Xu, B., Yu, S., Fu, Z., Zhang, Y., ... Zhang, W. (2023). Clinical diagnostic performance of droplet digital PCR for suspected bloodstream infections. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e01378-22.
24. Kitagawa, H., Kojima, M., Tadera, K., Kogasaki, S., Omori, K., Nomura, T., ... Ohge, H. (2025). Clinical diagnostic performance of droplet digital PCR for pathogen detection in patients with *Escherichia coli* bloodstream infection: A prospective observational study. *BMC Infectious Diseases*, 25, 22.
25. Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Kering, K. K., & Wei, H. (2019). Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world. *Tuberculosis*, 117, 85–92.
26. Zhao, Z., Wu, T., Wang, M., Chen, X., Liu, T., Si, Y., Zhou, Y., & Ying, B. (2022). A new droplet digital PCR assay: Improving detection of paucibacillary smear-negative pulmonary tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 122, 820–828.
27. Antonello, M., Scutari, R., Lauricella, C., Renica, S., Motta, V., Torri, S., ... Alteri, C. (2021). Rapid detection and quantification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in paraffinized samples by droplet digital PCR: A preliminary study. *Frontiers in Microbiology*, 12, 727774.
28. Li, Z., Sun, Q., Du, B., Jia, H., Dong, J., Lyu, L., ... Pan, L. (2022). Use of pleural fluid digital PCR analysis to improve the diagnosis of pleural tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e0163222.

29. Choi, Y. J., Kim, Y., Park, H. J., Kim, D., Lee, H., Kim, Y. A., & Lee, K.-A. (2024). Development of a multiplex droplet digital PCR method for detection and monitoring of *Mycobacterium tuberculosis* and drug-resistant tuberculosis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23, 29.
30. Chen, B., Xie, Y., Zhang, N., Li, W., Liu, C., Li, D., ... Shi, D. (2021). Evaluation of droplet digital PCR assay for the diagnosis of candidemia in blood samples. *Frontiers in Microbiology*, 12, 700008
31. Guo, J., Tian, W., Lin, H., et al. (2024). Analytical and clinical validation of multiplex droplet digital PCR assay for detecting pathogenic fungal infection in lungs. *Mycology*, 15(1), 110–119.
32. Yi, J., Wang, N., Wu, J., Tang, Y., Zhang, J., Zhu, L., ... Xu, Y. (2021). Development of a droplet digital polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory tract specimens. *Frontiers in Medicine*, 8, 761788.
33. Jitmuang, A., et al. (2021). A novel droplet digital polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: A clinical performance study and survey of sulfamethoxazole-trimethoprim resistant mutations. *Journal of Infection*, 83(6), 705–709.
34. Koepfli, C., Nguitragool, W., Hofmann, N. E., Robinson, L. J., Ome-Kaius, M., Sattabongkot, J., ... Mueller, I. (2016). Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Scientific Reports*, 6, 39183.
35. Pomari, E., Silva, R., Moro, L., La Marca, G., Perandin, F., Verra, F., ... Piubelli, C. (2020). Droplet digital PCR for

the detection of *Plasmodium falciparum* DNA in whole blood and serum: A comparative analysis with other molecular methods. *Pathogens*, 9(6), 478.

36. Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., Williams, G. M., Cai, P., Gobert, G. N., Olveda, R. M., ... McManus, D. P. (2017). Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: Parasite cell-free DNA detection in diverse clinical samples. *Journal of Infectious Diseases*, 216(12), 1611–1622.
37. Ramírez, J. D., Herrera, G., Hernández, C., Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., Flórez, C., & Butcher, R. (2018). Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(12), e0007063.
38. Deprez, L., Corbisier, P., Kortekaas, A.-M., Mazoua, S., Beaz Hidalgo, R., Trapmann, S., & Emons, H. (2016). Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. *Biomolecular Detection and Quantification*, 9, 29–39.

ÇİĞ SÜTLERDE HALK SAĞLIĞI AÇISINDAN KRİTİK PATOJEN: *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

Enise Begüm GÖÇMEZ¹

Umut YILMAZ²

1. GİRİŞ

Süt, yeni doğan bireylerin beslenmesinde temel rol oynayan doğal bir gıda olmasının yanı sıra, insanlar tarafından tüketilen çok sayıda süt ürününün de temel hammaddesini oluşturmaktadır. Süt, yaklaşık %87 su ve %13 kuru maddeden oluşan yüksek biyolojik değere sahip proteinler, vitaminler ve mineraller açısından zengin bir besindir (IDFA, 2026). Sütün bu zengin besin içeriği, patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir ortam oluşturduğundan, çiğ süt ve süt ürünleri gıda kaynaklı hastalıkların bulaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Çiğ süt tüketimiyle ilişkili çok sayıda epidemiyolojik salgın rapor edilmiş olup (FDA, 2024) bu risklerin azaltılması amacıyla çiğ sütün insan tüketimi açısından güvenli hale getirilmesini sağlayan pastörizasyon teknolojisi (ısı-zaman kombinasyonu) geliştirilmiştir (Küçük ve Yıbar, 2019). Ancak son yıllarda doğal, geleneksel ve yerel gıdalara yönelik ilginin artması çiğ süte olan talebin yeniden yükselmesine yol açmıştır. Çiğ sütün duyuşsal ve besleyici özelliklerine ilişkin olumlu algılar ile sağlık yararları

¹ Öğr. Gör. Dr. Dokuz Eylül Üniversitesi Kiraz Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, ORCID: 0000-0001-7364-506X.

² Öğr. Gör. Dr. Dokuz Eylül Üniversitesi Kiraz Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, ORCID: 0000-0002-5793-5742.

sağladığına yönelik yaygın inanışlar bu tercihi desteklese de epidemiyolojik veriler çiğ süt tüketiminin önemli mikrobiyolojik riskler taşıdığını ortaya koymaktadır (Castro vd., 2017). Mikrobiyal kontaminasyona karşı yüksek duyarlılık gösteren süt, güvenlik, kalite ve raf ömrü açısından önemli sorunlara neden olmakta; bozulma etkenleri ve patojen bakterilerin çoğalması sonucunda hem ekonomik kayıplar hem de gıda kaynaklı hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Yalew vd., 2024).

Gıda kaynaklı hastalıklar ise dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmekte olup bu hastalıklar arasında yer alan listeriyoz yüksek hastaneye yatış ve ölüm oranları nedeniyle özel bir öneme sahiptir (EFSA ve ECDC, 2023). 2023 yılında Avrupa’da 30 ülke tarafından toplam 2.993 doğrulanmış listeriyoz vakası bildirilmiş ve bu değer sürveyansın başlangıcından bu yana kaydedilen en yüksek yıllık vaka sayısını temsil ettiği bildirilmiştir (ECDC, 2025). Bu gibi nedenlerle süt ve süt ürünlerinde önemli bir gıda kaynaklı patojen olan *L. monocytogenes*’in biyolojik ve epidemiyolojik özelliklerinin anlaşılması, gıda kaynaklı risklerin değerlendirilmesi ve etkin kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

2. *L. MONOCYTOGENES*’İN MİKROBİYOLOJİSİ, PATOGENEZİ VE KLİNİK HASTALIKLARI

L. monocytogenes, Gram-pozitif, katalaz-pozitif, oksidaz-negatif, sporsuz, fakültatif anaerobik ve kısa çomak morfolojisine sahip bir bakteridir. 20–25°C arasında peritrik flagellaları aracılığıyla karakteristik takla atma hareketi “tumbling motility” sergiler (Shaaban vd., 2025). *L. monocytogenes*, insanlarda hastalığa neden olduğu bilinen tek *Listeria* türüdür ve filogenetik olarak *Listeria sensu stricto* grubunda yer almaktadır. Bir diğer patojenik tür olan *Listeria ivanovii*, başlıca geviş getiren

hayvanlarda abortus, sepsis ve enterit ile ilişkilidir; ancak insanlardan oldukça nadir olarak izole edilmektedir. *Listeria sensu stricto* grubunda yer alan patojenik olmayan türler arasında *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* ve *Listeria marthii* bulunmaktadır (d'Ovidio vd., 2026).

Literatürde *L. monocytogenes*'in dört ana evrimsel soy (lineage I–IV), 13–14 serotip ve 150'den fazla klonal kompleks (CC) içerdiği bildirilmektedir. İnsan klinik izolatlarında özellikle serotip 1/2a, 1/2b ve 4b'nin baskın olduğu ve invaziv listeriyoz vakalarının önemli bir kısmını oluşturduğu rapor edilmiştir (Yin vd., 2019). Süt ve süt ürünleri ile ilişkili ortamlarda sıklıkla CC1, CC3 ve CC101 gibi klonal kompleksler tespit edilmekte; CC1 özellikle hipervirülen suşlarla, CC3 ise gıda işleme ortamları ve çevresel persistans ile ilişkilendirilmektedir (Fritsch vd., 2026).

L. monocytogenes, fakültatif bir hücre içi patojendir ve virülansının temelini bu özellik oluşturmaktadır. Konak hücreye giriş, başta internalin A (InlA) ve internalin B (InlB) olmak üzere yüzey proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. InlA, konak epitel hücrelerinde eksprese edilen E-kaderine bağlanırken, InlB, hepatosit büyüme faktörü reseptörü c-Met ile etkileşime girerek bakterinin non-fagositik hücreler tarafından internalizasyonunu tetikler (Gaillard vd., 1991). Hücre içine alındıktan sonra *L. monocytogenes*, fagozom adı verilen bir vakuol içinde kalır. Bu aşamada Listeriolizin O (LLO), *hlyA* geni tarafından kodlanan ve kolesterol bağımlı bir por oluşturan toksindir. LLO, fagozomal membranda porlar oluşturarak bakterinin fagozomdan sitoplazmaya kaçışını sağlar; bu olay, bakterinin replikasyonu için kritik öneme sahiptir (Ireton vd., 2021). Sitoplazmaya geçen *L. monocytogenes*, burada hızla çoğalır ve ActA (aktin assembly-inducing protein) adlı yüzey proteinini eksprese eder. ActA, konak hücrenin aktin polimerizasyon makinesini (Arp2/3 kompleksi) aktive ederek bakterinin arkasında bir aktin kuyruğu oluşmasını sağlar; bu itme gücü sayesinde bakteri, konak

hücresinin plazma membranına doğru ilerler ve komşu hücrelere invazyon yaparak hücreden hücreye yayılır (Pillich vd., 2017). *iap* (invasion-associated protein) geni de hücre adezyonu ve invazyonunda rol oynamaktadır. Hipervirülan klonal komplekslerde (CC1, CC4, CC6) ayrıca listeriolizin S (LLS) kodlayan LIPI-3 patojenite adası bulunmakta olup, bu faktör bağırsak kolonizasyonuna katkı sağlamaktadır (Vilchis-Rangel vd., 2019).

L. monocytogenes özellikle gebeler, yenidoğanlar, yaşlı bireyler ve immün sistemi baskılanmış hastalar gibi risk gruplarında yüksek mortalite ile seyreden ciddi bir invaziv enfeksiyondur. Vaka-ölüm oranının %20–30 düzeylerine ulaşabildiği bildirilmektedir (Bento ve Tobin, 2026). Hastalığın klinik seyri, kendini sınırlayan ateşli gastroenteritten sepsis, menenjit, meningoensefalit ve beyin sapı tutulumu ile karakterize rombensefalite kadar geniş bir yelpazede değişiklik gösterebilmektedir. Gebelerde ise enfeksiyonun transplasental yolla fetüse geçmesi sonucunda spontan abortus, ölü doğum veya ağır neonatal enfeksiyonlar gelişebilmektedir (Schlech, 2019).

L. monocytogenes, diğer bakteriyel menenjit etkenlerinin ampirik tedavisinde yaygın olarak kullanılan seftriakson ve sefotaksim dahil olmak üzere üçüncü kuşak sefalosporinlere doğal dirençli olması nedeniyle klinik açıdan ayrıca önem taşımaktadır (Li vd., 2025). Tedavide temel yaklaşım, yüksek doz intravenöz ampicilin veya penisilin G uygulanması olup, bakterisidal etkinliğin artırılması amacıyla bu ajanlar sıklıkla gentamisin ile kombine edilmektedir. Günümüzde klinik izolatlarda kazanılmış antimikrobiyal direnç nispeten düşük düzeylerde seyretmekle birlikte, tedavi seçeneklerinin etkinliğinin korunması ve direnç gelişiminin izlenmesi amacıyla antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sürdürülmesi büyük önem taşımaktadır (Luque-Sastre vd., 2018). Penisilin alerjisi bulunan

hastalarda ise trimetoprim-sülfametoksazol önemli bir alternatif tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır.

3. BAZI DIŞ FAKTÖRLERİN *L. MONOCYTOGENES* ÜZERİNE ETKİSİ

L. monocytogenes, gıda işleme ortamlarında kontaminasyona neden olabilmektedir. Gıda ortamına girdikten sonra uzun süre hayatta kalabilmesi, çeşitli stres faktörlerine karşı geliştirdiği yüksek direnç ile ilişkilidir (Jordan ve McAuliffe, 2018). Bu dayanıklılık, bakterinin çevresel koşullara uyum sağlama kapasitesini ortaya koymakta olup söz konusu süreçleri etkileyen bazı dış faktörlerin incelenmesini gerekli kılmaktadır. Bu kapsamda, *L. monocytogenes*'in çevresel stres faktörlerine verdiği yanıtlar arasında sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu gibi temel faktörlerin yanı sıra *L. monocytogenes*'in fizyolojisini etkileyen başka dış faktörler de söz konusudur.

3.1. Sıcaklık

Sıcaklık değişimleri, bakterinin metabolizmasından hücre zarı yapısına kadar birçok fizyolojik süreci etkiler.

Yüksek Sıcaklık: 55–65°C ısı işlemi *L. monocytogenes*'i elimine etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bakteri sıcak şok proteinleri sentezleyerek denatüre olan proteinlerini onarabildiği bildirilmiştir (Bucur vd., 2018; Ricci vd., 2021).

Düşük Sıcaklık: *L. monocytogenes*, soğutulmuş sütte üreyebilen psikrotrof bir mikroorganizmadır (Castro vd., 2017). Soğuk stresine yanıt olarak CspA, CspB, CspD gibi Soğuk Şok Proteinlerini (Csp) sentezler. Ayrıca betain ve karnitin gibi kriyoprotektanları biriktirerek soğukta hayatta kalabilirler (Muchaamba vd., 2021).

3.2. pH Etkisi

L. monocytogenes, gıdaların doğal asitliği ve temizlik kimyasallarının oluşturduğu alkali koşullara karşı direnç gösterebilmektedir.

Asit Stresi: Asidik gıdalarda ve mide ortamında hayatta kalabilmek için Glutamat Dekarboksilaz (GAD) sistemi, Arginin Deiminaz (ADI) yolu ve proton pompası (F_0F_1 -ATPaz) gibi mekanizmaları kullanır. GAD sistemi, hücre içindeki protonları tüketerek sitoplazmik pH'nın yükseltilmesine katkı sağlamaktadır (Wiktorczyk-Kapischke vd., 2021).

Alkali Stresi: Temizlik maddelerinden kaynaklanan alkali stresin adaptasyonunun sıcaklığa bağlı olduğu, 37°C ve 22°C'de adaptasyon gelişirken, 4°C'de bu adaptasyon sınırlı kalmaktadır (Shen vd., 2016). Buna ek olarak alkali koşullarda bakteri, hücre yüzeyinde modifikasyonlar yapar ve proton tutma kapasitesini artırmak amacıyla bazı yağ asitlerinin (özellikle anteiso formları) oranını değiştirir (Osek vd., 2022).

3.3. Tuz (Ozmotik Stres)

Gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılan yüksek tuz konsantrasyonları bakterilerde plazmolize neden olabilmektedir ancak *L. monocytogenes* bu koşullara karşı belirgin bir tolerans sergilemektedir. *L. monocytogenes*'in genellikle %10 NaCl konsantrasyonuna dayanabildiği hatta bazı durumlarda bu toleransın %20'ye kadar çıkabildiği bildirilmektedir (Osek vd., 2022). Ayrıca bu patojen ozmotik dengeyi korumak amacıyla hücre içine glisin betain ve karnitin gibi çözünen maddeler biriktirebilir. Bu süreçte BetL, Gbu ve OpuC taşıyıcı sistemleri görev alır ve bu sistemler alternatif sigma faktörü σ^B tarafından düzenlenmektedir (Wiktorczyk-Kapischke vd., 2021).

4. SÜT ÜRETİMİNDE *L. MONOCYTOGENES* KONTAMİNASYON KAYNAKLARI

L. monocytogenes, toprak, su ve dışkıda yaygın olarak bulunan, süt ve süt ürünlerinde kontaminasyona neden olabilen önemli bir zoonotik patojendir (Gouin vd., 2019). Mikroorganizma; listeriyal mastitli, ensefalitli veya abort yapan hayvanlardan doğrudan süte geçebildiği gibi, asemptomatik taşıyıcı hayvanlar tarafından da sütle çevreye saçılabilir. Ayrıca kontamine yem ve su kaynakları ile sağım, depolama ve nakliye aşamalarındaki yetersiz hijyen uygulamaları kontaminasyonun başlıca kaynakları arasında yer almaktadır (Bangieva ve Rusev, 2017). Gıda üretim ortamlarında uzun süre canlılığını sürdürebilen *L. monocytogenes*'in sağım ekipmanları üzerinde biyofilm oluşturma yeteneği, çevresel kalıcılığını ve dezenfeksiyon işlemlerine karşı direncini artırmaktadır (Osek vd., 2022; Bangieva ve Rusev, 2017). Biyofilm kaynaklı kontaminasyon sonucunda mikroorganizma toplama tanklarındaki süte geçebilmekte, ancak bildirilen kontaminasyon düzeyleri çoğunlukla düşük seviyelerde olduğu bildirilmiştir (Castro vd., 2017).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, çiğ sütte *L. monocytogenes* prevalansının pastörize süte göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Li vd., 2024). Farklı ülkelerde bildirilen prevalans oranları değişkenlik göstermekle birlikte, ABD'de tank sütlerinde %4,3 (Williams vd., 2023), Afrika'da çiğ sütte %5,26 (Oluwafemi vd., 2023) ve Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde %5 düzeyinde prevalans rapor edilmiştir (Barel vd., 2023). Bildirilen prevalans farklılıklarının; örnekleme stratejileri, coğrafi ve mevsimsel koşullar, süt kalitesi, kontaminasyon düzeyi ve kullanılan analiz yöntemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Kupradit vd., 2020).

5. LABORATUVAR TANISI

İnsan klinik ve gıda örneklerinde *L. monocytogenes* tanısı, etkenin yüksek mortalite potansiyeli ve psikrotrofik özellikleri nedeniyle özenli ve standartlara uygun bir yaklaşım gerektirmektedir (Tahoun vd., 2017). Klinik tanıda altın standart yöntem, kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), amniyotik sıvı veya plasenta dokusu gibi normalde steril kabul edilen örneklerden etkenin izolasyonudur. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında BOS analizi genellikle mononükleer hücre ağırlıklı pleositoz, artmış protein düzeyi ve düşük glukoz konsantrasyonu ile karakterizedir; ancak Gram boyamanın duyarlılığı (%24–33), etkenin düşük yoğunluğu ve pleomorfik yapısı nedeniyle düşüktür (Öztürk vd., 2019).

Kültürde elde edilen izolatlar; katalaz pozitifliği, %5 koyun kanlı agar da dar beta-hemoliz zonu oluşturması, 20-25°C’de tipik “tumbling” motilite göstermesi ve *Staphylococcus aureus* ile yapılan CAMP (Christie Atkins Munch Petersen) testinde ok ucu şeklinde sinerjik hemoliz oluşumu ile doğrulanmaktadır (Ramsey vd., 2010). Süt ve süt ürünlerinin analizinde ise Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi Bakteriyolojik Analiz El Kitabı Bölüm 10 veya EN ISO 11290 standartları temel alınmaktadır. Bu yöntemler, subletal hasar görmüş hücrelerin iyileşmesini sağlamak amacıyla sodyum pirüvat içeren Tamponlanmış *Listeria* Zenginleştirme Besiyeri (Buffered *Listeria* Enrichment Broth, BLEB) veya Half-Fraser/Fraser broth gibi aşamalı selektif zenginleştirme basamaklarını içermektedir (Kamisaki-Horikoshi vd., 2017). Zenginleştirme sonrası ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) gibi kromojenik agarlarda mavi-yeşil koloniler etrafında oluşan opak halo, etkenin fosfatidilinozitol-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) aktivitesini göstererek *Listeria* türleri arasında ayırım yapılmasını sağlar (Stessl vd., 2009). Tanı sürecini hızlandırmak amacıyla hem klinik hem de gıda örneklerinde gerçek zamanlı Polimeraz Zincir

Reaksiyonu ve immünomanyetik ayırma yöntemleri güncel laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Rawool vd., 2016).

6. KONTROL, ÖNLEME STRATEJİLERİ

L. monocytogenes'in çeşitli zorlu çevresel koşullara uyum sağlama kapasitesinin yüksek olması ve özellikle risk gruplarında ciddi enfeksiyonlara yol açabilmesi nedeniyle önemli bir gıda güvenliği sorunu oluşturmaktadır (Belias vd., 2024). Bu nedenle, riskin etkin yönetimi için “çiftlikten çatala” yaklaşımı doğrultusunda tüm üretim zinciri boyunca bütüncül kontrol stratejilerinin uygulanması gerekmektedir.

Çiftlik düzeyinde koruma hijyenik su kaynağı, uygun standartlarda hazırlanan silaj, düzenli olarak yapılan ahır hijyeni, personel hijyeni ve hayvan hareketlerinin kontrolü ile sağlanabilir. Çiğ sütün düzenli olarak izlenmesi ve kontamine partilerin sistemden uzaklaştırılması risk yönetiminde temel bir uygulamadır. Ayrıca pastörizasyon, *Listeria* eliminasyonunda en etkili yöntem olarak kabul edilmekte buna ek olarak işletme düzeyinde düzenli temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları biyofilm oluşumu ve çapraz kontaminasyonun önlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Gonzales-Barron vd., 2023). Mikrobiyal kontaminasyonun izlenmesi, gelişmiş tespit tekniklerinin kullanımını ve HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) temelli önleyici kontrol sistemlerinin uygulanmasını gerekli kılmakta ve bu yaklaşımlar gıda güvenliği yönetimini güçlendirmektedir (Farid vd., 2025).

Tüketici düzeyinde ise buzdolabı hijyeni ve uygun soğuk zincir yönetimi, patojen çoğalmasının önlenmesinde önemli bir kontrol basamağıdır. Yüzeylerin düzenli temizliği, döküntülerin uzaklaştırılması ve buzdolabı sıcaklıklarının yaklaşık 4°C'nin, dondurucu sıcaklığının ise -18°C'nin altında tutulmalıdır.

Sıcaklık kontrolünün termometreler aracılığıyla izlenmesi, hedef koşulların sürekliliği sağlanmalıdır (FDA, 2023). Ayrıca özellikle risk grubundaki bireylerin taze veya uygun şekilde işlenmemiş çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimi konusunda bilinçlendirilmesi de gerekmektedir (Kananub vd., 2024). Bu bağlamda *L. monocytogenes*'e karşı korunma ve kontrol stratejileri büyük önem taşımakta ve uygulanan yaklaşımlar çeşitli ülkelerin gıda mevzuatları çerçevesinde düzenlenmektedir.

7. ULUSLARASI GIDA GÜVENLİĞİ SİSTEMLERİ

Uluslararası düzeyde, *L. monocytogenes* için mikrobiyolojik kriterler önemli ölçüde uyum göstermekte olup düzenleyici çerçeveler genel olarak patojenin üremesini destekleyen gıdalar ile desteklemeyen gıdalar arasında ayırım yapmaktadır. Codex Alimentarius Komisyonu *L. monocytogenes*'in üremesini destekleyen gıdalarda 25 g'da bulunmama kriteri uygulanırken, üremeyi desteklemeyen gıdalarda raf ömrü boyunca 100 kob/g'ın altındaki seviyelere izin verebilmektedir (Codex Alimentarius Komisyonu, 2007). Buna karşılık, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration; FDA), yaklaşımında ise tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes*'in varlığı kabul edilmemekte ve ürünlerin güvenliği açısından tespit edilebilir düzeyde bulunmaması hedeflenmektedir. Bu nedenle uygulamada 25 g örnekte bulunmama prensibi, tüketime hazır gıdalar için sıkı bir kontrol kriteri olarak değerlendirilmektedir (FDA, 2017). Avrupa Birliği'nin 2024/2895 sayılı Yönetmeliği'ne göre ise, *L. monocytogenes* için 100 kob/g sınırı, ürünün raf ömrü boyunca bu değerin aşılmayacağı tahmin modelleri ile yetkili otoritelere kanıtlanabildiği durumlarda uygulanabilmektedir. Bu tür bilimsel doğrulamanın sağlanamadığı durumlarda, ürünün raf

ömrü boyunca 25 g’da *L. monocytogenes* bulunmaması kriteri geçerliliğini korumaktadır. Ayrıca söz konusu düzenleme, gıda işletmecilerinin HACCP planları kapsamında raf ömrü süresince ara kontrol limitleri belirlemesini ve izleme programlarını periyodik doğrulama çalışmalarına tabi tutmasını zorunlu kılmaktadır (European Commission, 2024). Ülkemizde ise Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği’ne göre süt ve süt ürünlerinde *L. monocytogenes* için temel kriter, ürünün 25 g veya 25 mL’inde bakterinin bulunmamasıdır. Bu kapsamda, analiz edilen herhangi bir numunede *L. monocytogenes* tespit edilmesi, ürünün mikrobiyolojik açıdan uygunsuz olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır (TGK, 2025).

Sonuç olarak genel bir değerlendirme yapıldığında uluslararası düzenlemeler “sıfır tolerans” yaklaşımını veya ürünün raf ömrü boyunca mikrobiyolojik stabilitesinin kanıtlanmasına dayalı risk temelli limitleri benimseyerek, gıda güvenliğinin sağlanmasında farklı fakat birbirini tamamlayan stratejiler ortaya koymuşlardır.

8. SONUÇ

L. monocytogenes, süt ve süt ürünleri başta olmak üzere gıda zincirinde önemli bir halk sağlığı tehdidi olmaya devam etmektedir. Patojenin psikrofilik yapısı, biyofilm oluşturma yeteneği ve çevresel stres faktörlerine karşı geliştirdiği direnç, gıda işleme ortamlarında kalıcılığını ve kontaminasyon riskini artırmakta. Bu durum başta gebeler, yenidoğanlar, yaşlılar ve immün sistemi baskılanmış bireyler olmak üzere hassas popülasyonlarda ciddi morbidite ve yüksek mortalite ile seyreden listeriyoz vakalarına yol açabilmektedir. Kontaminasyonun çiftlikten tüketiciye uzanan süreçte hijyen eksiklikleri, yetersiz soğutma ve ekipman kaynaklı bulaşma ile yayıldığı bilinmektedir. Etkin kontrol pastörizasyon, hijyen uygulamaları,

soğuk zincir yönetimi ve tüketici eğitimini kapsayan bütüncül bir yaklaşımı gerektirmektedir. *L. monocytogenes* kaynaklı risklerin azaltılması sürveyansın güçlendirilmesi, mevzuatın güncellenmesi ve toplumsal farkındalığın artırılması ile mümkündür.

KAYNAKÇA

- Bangieva, D. R., & Rusev, V. N. (2017). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk—a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(1), 430-436.
- Barel, M., Hızlısoy, H., Köşkeroğlu, K., Gürbulak, E. Ç., & Özkaya, Y. (2023). Hayvansal kökenli gıdalarda *Listeria monocytogenes* prevalansının meta-analizi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(1), 19-29. <https://doi.org/10.32707/ercivet.1259181>
- Bento, D., & Tobin, E. H. (2026). *Listeria monocytogenes* infection (Listeriosis). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Belias, A., Bolten, S., & Wiedmann, M. (2024). Challenges and opportunities for risk-and systems-based control of *Listeria monocytogenes* transmission through food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(6), e70071. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70071>
- Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2700. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>
- Castro, H., Ruusunen, M., & Lindström, M. (2017). Occurrence and growth of *Listeria monocytogenes* in packaged raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 261, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.017>
- Codex Alimentarius Commission. (2007). Guidelines on the Application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in Foods (CXG 61-

- 2007). FAO/WHO. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>
- d'Ovidio, L., de Oliveira, D. P., Ivanova, I. V., Vaz-Velho, M., Franco, B. D. G. M., & Todorov, S. D. (2026). *Listeria monocytogenes*-can we reduce or eliminate it from food commodities?. *Molecular Nutrition & Food Research*, 70(1), e70329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.70329>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2025). Listeriosis – Annual epidemiological report for 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2023>
- European Commission. (2024). Commission Regulation (EU) 2024/2895 of 20 November 2024 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Listeria monocytogenes*. Official Journal of the European Union. <http://data.europa.eu/eli/reg/2024/2895/oj>
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA & ECDC). (2023). The European Union One Health 2022 zoonoses report. EFSA Journal, 21(12), e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- Farid, A., Khan, M. U., Wang, Z., ZhiJie, W., BaoQiu, C., KaiYue, W., ... & Chen, Z. (2025). Mapping research trends in milk microbiology: Rapid detection methods and bibliometric analysis. *LWT*, 118478. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118478>
- Food and Drug Administration (FDA). (2017). Draft guidance for industry: Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.fda.gov>

- Food and Drug Administration (FDA). (2023). Are you storing food safely? <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/are-you-storing-food-safely>
- Food and Drug Administration (FDA). (2024). Raw milk misconceptions and the danger of raw milk consumption. <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/raw-milk-misconceptions-and-danger-raw-milk-consumption>
- Fritsch, L., Schmidt, R. S., & Marti, E. (2026). *Listeria monocytogenes*: Genomic characterization of persistent strains historically isolated from cheese processing facilities. *International Journal of Food microbiology*, 453. 111734. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2026.111734>
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., & Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, 65(7), 1127–1141. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90009-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90009-n)
- Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Guillier, L., & Sanaa, M. (2023). A critical review of risk assessment models for *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Foods*, 12(24), 4436. <https://doi.org/10.3390/foods12244436>
- Gouin, E., Balestrino, D., Rasid, O., Nahori, M. A., Villiers, V., Impens, F., ... & Cossart, P. (2019). Ubiquitination of *listeria* virulence factor inlc contributes to the host response to infection. *MBio*, 10(6), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mBio.02778-19>
- International Dairy Foods Association (IDFA). (2026). Importance of milk in diet. <https://www.idfa.org/importance-of-milk-in-diet>

- Ireton, K., Mortuza, R., Gyanwali, G. C., Gianfelice, A., & Hussain, M. (2021). Role of internalin proteins in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 116(6), 1407–1419. <https://doi.org/10.1111/mmi.14836>
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86, 181-213. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.006>
- Kamisaki-Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Takada, M., Kawamoto, S., & Kawasaki, S. (2017). Evaluation of TA10 Broth for recovery of *Listeria monocytogenes* from ground beef. *Journal of AOAC International*, 100(2), 470–473. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0297>
- Kananub, S., Lertsakkongkul, P., Aryatawong, P., Horhirunkhajohn, W., Pinniam, N., Krajanglikit, P., ... & Kasemsuwan, S. (2024). *Listeria* contamination in milk-processing chain and proficiency in *Listeria monocytogenes* decontamination of small-scale milk retailers. *Journal of Food Quality*, 2024(1), 6263938. <https://doi.org/10.1155/2024/6263938>
- Kupradit, C., Innok, S., Woraratphoka, J., & Ketudat-Cairns, M. (2020). Prevalence and characterization of pathogenic bacteria in bulk tank raw milk, Thailand. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 17(6), 588-599. [10.48048/wjst.2020.4177](https://doi.org/10.48048/wjst.2020.4177)
- Küçük, S.C., Yıbar, A. (2019). Çiğ süt ve pastörize süt tüketiminin halk sağlığı üzerine etkileri. *Food and Health*, 5(3), 197-204. <https://doi.org/10.3153/FH19021>
- Li, X., Zheng, J., Zhao, W., & Wu, Y. (2024). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy product supply chains: A global systematic review and meta-analysis.

Foodborne Pathogens and Disease, 21(9), 526–535.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2024.0029>

- Li, H., Sheng, H., Zhao, J., Zhang, X., Li, M., Zhao, L., Li, L., Zhang, X., Yang, B., Fanning, S., Wang, Y., Yan, S., & Bai, L. (2025). Emerging threats: *Listeria monocytogenes* with acquired multidrug resistance from food in China, 2012-2022. *International Journal of Food Microbiology*, 439, 111236.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111236>
- Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E. M., McMahon, B. J., Bai, L., Li, F., & Fanning, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology Spectrum*, 6(4).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017>
- Muchaamba, F., Stephan, R., & Tasara, T. (2021). *Listeria monocytogenes* cold shock proteins: small proteins with a huge impact. *Microorganisms*, 9(5), 1061.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9051061>
- Oluwafemi, Y. D., Igere, B. E., Ekundayo, T. C., & Ijabadeniyi, O. A. (2023). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk in Africa: a generalized logistic mixed-effects and meta-regression modelling. *Scientific Reports*, 13(1), 12646. 10.1038/s41598-023-39955-0
- Osek, J., Lachtara, B., & Wieczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes*—how this pathogen survives in food-production environments?. *Frontiers in Microbiology*, 13, 866462.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462>
- Öztürk, Ü., Asena, M., & Aydın Öztürk, P. (2019). BOS kültür antibiyogram sonuçları ve olası enfeksiyon nedenleri. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3),

1688–1695.

<https://doi.org/10.30569/adiyamansaglik.574198>

Pillich, H., Puri, M., & Chakraborty, T. (2017). ActA of *Listeria monocytogenes* and its manifold activities as an important listerial virulence factor. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 399, 113–132.
https://doi.org/10.1007/82_2016_30

Ramsey, K. J., Carter, E. C., McKee, M. L., & Beck, B. J. (2010). Reclassification of the *Listeria*-CAMP test strain ATCC 49444 *Staphylococcus aureus* as *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1525–1528. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.8.1525>

Rawool, D. B., Doijad, S. P., Poharkar, K. V., Negi, M., Kale, S. B., Malik, S. V., Kurkure, N. V., Chakraborty, T., & Barbuddhe, S. B. (2016). A multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes* and its lineages. *Journal of Microbiological Methods*, 130, 144–147.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.015>

Ricci, A., Alinovi, M., Martelli, F., Bernini, V., Garofalo, A., Perna, G., ... & Mucchetti, G. (2021). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy matrices involved in mozzarella di Bufala Campana PDO cheese. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581934.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581934>

Schlech W. F. (2019). Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection. *Microbiology Spectrum*, 7(3).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018>

Shaaban, S. I., Awwad, N., Nossair, M., Ayoub, M., & Eid, A. E. (2025). Gene profiling and serotyping of multidrug-

- resistant *Listeria monocytogenes* isolated from humans, animals, and dairy products. *BMC Veterinary Research*, 21(1), 702. <https://doi.org/10.1186/s12917-025-05138-4>
- Shen, Q., Pandare, P., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Mahmoud, B. S., & Sharma, C. S. (2016). Influence of temperature on alkali stress adaptation in *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 62, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.005>
- Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., & Schoder, D. (2009). Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(2), 651-659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x>
- Tahoun, A. B., Abou Elez, R. M., Abdelfatah, E. N., Elsohaby, I., El-Gedawy, A. A., & Elmoslemay, A. M. (2017). *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.008>
- Türk Gıda Kodeksi mikrobiyolojik kriterler tebliği (TGK). Resmî Gazete, (32812), 13 Şubat 2025. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=41291&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>
- Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wałęcka-Zacharska, E., Korkus, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Frontiers in Microbiology*, 12, 710085. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710085>

- Williams, E. N., Van Doren, J. M., Leonard, C. L., & Datta, A. R. (2023). Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, and *Campylobacter* spp. in raw milk in the United States between 2000 and 2019: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Food Protection*, 86(2), 100014. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.11.006>
- Vilchis-Rangel, R. E., Espinoza-Mellado, M. D. R., Salinas-Jaramillo, I. J., Martinez-Peña, M. D., & Rodas-Suárez, O. R. (2019). Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker llsX with invasiveness. *Current microbiology*, 76(5), 637–643. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01671-2>
- Yalew, K., Pang, X., Huang, S., Zhang, S., Yang, X., Xie, N., ... & Li, X. (2024). Recent development in detection and control of psychrotrophic bacteria in dairy production: Ensuring milk quality. *Foods*, 13(18), 2908. <https://doi.org/10.3390/foods13182908>
- Yin, Y., Yao, H., Doijad, S., Kong, S., Shen, Y., Cai, X., Tan, W., Wang, Y., Feng, Y., Ling, Z., Wang, G., Hu, Y., Lian, K., Sun, X., Liu, Y., Wang, C., Jiao, K., Liu, G., Song, R., Chen, X., ... Jiao, X. (2019). A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates. *Nature communications*, 10(1), 4283. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12072-1>

BEYOND ANTIBIOTICS: EMERGING STRATEGIES FOR THE MANAGEMENT OF BACTERIAL INFECTIONS IN THE ERA OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Eylül HARAVI¹

1. INTRODUCTION

The discovery of antibiotics changed modern medicine and is still seen as one of healthcare's biggest wins. Since penicillin came into play, these drugs have really cut down sickness and death from bacterial infections, allowing for progress in surgery, organ transplants, cancer treatments, and intensive care. But the power of these medications is increasingly at risk due to antimicrobial resistance (AMR), which is now considered one of the top public health threats of this century (Davies & Davies, 2010; Murray et al., 2022).

AMR happens when microorganisms develop ways to reduce or even stop the effectiveness of these drugs. While resistance is a part of natural evolution, it's been sped up by the misuse and overuse of antibiotics in human medicine, veterinary care, and farming. Other issues, like poor infection control, lack of sanitation, environmental pollution, and global travel, have made it even easier for resistant germs to spread worldwide (Holmes et al., 2016; Prestinaci et al., 2015).

The global impact of AMR keeps rising, with bacterial resistance linked to about 1.27 million deaths and playing a part in nearly 5 million deaths around the world in 2019 (Murray et

¹ PhD, Çukurova University, ORCID: 0000-0002-3892-6840.

al., 2022). Besides affecting health, AMR comes with hefty economic costs due to longer hospital stays, rising healthcare costs, lost productivity, and the need for more complicated treatments. If we don't act effectively, antimicrobial resistance is likely to pose an even bigger risk to global health and economic stability in the future (O'Neill, 2016).

Seeing how urgent this issue is, the World Health Organization (WHO) has pinpointed several antibiotic-resistant pathogens that need quick research and development attention. It's especially worrying how multidrug-resistant organisms, like carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, resistant Enterobacterales, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), are linked to serious infections with very few treatment options (Tacconelli et al., 2018; WHO, 2024).

Even though developing new antibiotics is still super important, the current pipeline for antibiotic discovery isn't keeping up with how fast resistance evolves. Various scientific, economic, and regulatory hurdles have slowed down the introduction of new antibacterial drugs, and resistance often shows up shortly after these new drugs hit the market (Theuretzbacher et al., 2020). Because of this, there's been a growing interest in creative treatment options that can either work alongside or lessen our dependence on traditional antibiotics.

Recent strides in microbiology, immunology, synthetic biology, and nanotech have brought forth several exciting alternatives, such as bacteriophage therapy, antimicrobial peptides, microbiome-based treatments, anti-virulence methods, CRISPR-Cas technologies, immunotherapies, and nanotechnology-assisted antimicrobial systems. These methods aim at bacterial virulence, interactions between hosts and pathogens, or specific resistance factors, which might help ease

the selective pressures that contribute to resistance development (Czaplewski et al., 2016; Aslam et al., 2021).

This chapter looks at the biological foundations, therapeutic uses, current evidence, and future potentials of these new strategies, emphasizing their possible role in tackling the rising global challenge of antimicrobial resistance.

2. ANTIMICROBIAL RESISTANCE: A GLOBAL CRISIS

Antimicrobial resistance (AMR) is a major threat to global public health, undermining the effectiveness of antibiotics that once revolutionized the treatment of infectious diseases since penicillin was discovered. The widespread, often misuse of antibiotics in human medicine, veterinary practices, and agriculture has sped up the rise and spread of resistant bacterial strains, jeopardizing decades of therapeutic advancement (Davies & Davies, 2010; Ventola, 2015).

The World Health Organization (WHO) has flagged antimicrobial resistance as a priority health challenge and pointed out several antibiotic-resistant pathogens that need urgent research and development efforts. Of particular concern are multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pan-drug-resistant (PDR) bacteria—like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and drug-resistant *Acinetobacter baumannii*—which severely limit available treatment options (World Health Organization [WHO], 2024; Tacconelli et al., 2018).

I mean, while resistance is a natural evolutionary process, its spread has been fueled by inappropriate antibiotic prescribing, self-medication, poor treatment adherence, lax infection control

practices, and extensive antibiotic use in livestock. And globalization—along with international travel—facilitates the rapid spread of resistant microorganisms across different regions (Holmes et al., 2016; Prestinaci et al., 2015).

The effects of AMR reach beyond just treatment failures. Infections that are resistant lead to higher morbidity and mortality rates, longer hospital stays, and huge healthcare costs. Honestly, AMR jeopardizes the safety of various modern medical procedures, like organ transplants, chemotherapy, intensive care treatments, and major surgeries—all of which rely on effective antimicrobial prophylaxis and treatment (O'Neill, 2016; Murray et al., 2022).

Recent estimates suggest that antimicrobial resistance is responsible for millions of deaths globally each year, and this burden is set to grow if current trends keep going. So, there's a pressing need for new therapeutic approaches that can work alongside conventional antibiotics. Emerging strategies—like bacteriophage therapy, antimicrobial peptides, microbiome-based interventions, anti-virulence therapies, CRISPR-based technologies, immunotherapies, and solutions driven by nanotechnology—are increasingly being explored as potential measures to tackle the escalating AMR crisis (Murray et al., 2022; Dadgostar, 2019).

2.1. Mechanisms of Resistance

Bacteria have a variety of molecular mechanisms to dodge the effects of antimicrobial agents. These might come from spontaneous genetic mutations or from acquiring resistance genes through horizontal gene transfer, which includes transformation, transduction, and conjugation. The rapid spread of resistance determinants among bacterial populations has heavily contributed to the global AMR crisis (Blair et al., 2015; Munita & Arias, 2016).

2.1.1. Enzymatic Degradation and Antibiotic Inactivation

One of the most common resistance tactics involves producing enzymes that can degrade or modify antimicrobial agents. β -lactamases are a well-known example, breaking down the β -lactam ring found in penicillins, cephalosporins, and carbapenems. The rise of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases has seriously cut down the effectiveness of many frontline antibiotics. Other bacterial enzymes can chemically alter aminoglycosides, chloramphenicol, and macrolides, making these drugs ineffective (Bush & Bradford, 2020; Tooke et al., 2019).

2.1.2. Efflux Pumps

Efflux pumps are membrane-associated transport systems that help bacteria protect themselves from the harmful effects of antimicrobial agents. These proteins actively expel antibiotics from the bacterial cell before the drugs can reach their intracellular targets and exert their effects. Some efflux pumps are capable of recognizing and removing a wide range of structurally unrelated compounds, allowing bacteria to develop resistance to multiple antibiotic classes simultaneously. Increased expression of these systems is a major contributor to multidrug resistance in clinically important pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and several members of the *Enterobacterales* family (Du et al., 2018; Li et al., 2015).

2.1.3. Target Modification

Many antibiotics act by binding to specific bacterial proteins or cellular structures that are essential for survival. However, bacteria can acquire mutations or resistance genes that alter these targets, reducing antibiotic binding while maintaining normal cellular function. As a result, the antimicrobial agent becomes less effective or completely ineffective. Well-known

examples include modifications of penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA), mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV associated with fluoroquinolone resistance, and structural changes in ribosomal components that confer resistance to macrolides and aminoglycosides (Munita & Arias, 2016; Blair et al., 2015).

2.1.4.Reduced Membrane Permeability

In Gram-negative bacteria, the outer membrane acts as an additional protective barrier against external threats, including antibiotics. Changes in membrane porins, which normally allow molecules to enter the bacterial cell, can reduce antibiotic uptake and limit intracellular drug concentrations. Although this mechanism alone may provide only moderate protection, it frequently works together with efflux pumps and antibiotic-inactivating enzymes to produce high levels of antimicrobial resistance (Delcour, 2009; Blair et al., 2015).

2.1.5.Biofilm-Associated Resistance

Many bacterial species can form biofilms, which are highly organized microbial communities enclosed within a self-produced extracellular matrix. Biofilm formation provides protection against environmental stress, host immune responses, and antimicrobial agents, allowing bacteria to persist in both clinical and environmental settings. Within biofilms, bacterial cells often exhibit slower metabolic activity, reduced antibiotic penetration, and enhanced horizontal gene transfer. These characteristics make biofilm-associated infections particularly difficult to eradicate and contribute to the development of chronic and recurrent infections (Hall & Mah, 2017; Flemming et al., 2016).

Importantly, several of these resistance mechanisms may coexist within a single bacterial strain. The simultaneous presence of enzymatic inactivation, target modification, reduced

permeability, and active efflux can result in multidrug resistance, greatly limiting available treatment options. This complexity highlights the urgent need for innovative therapeutic approaches that act through mechanisms distinct from those of conventional antibiotics (Blair et al., 2015; Munita & Arias, 2016).

2.2. Clinical and Economic Impact

The impact of antimicrobial resistance (AMR) extends far beyond the treatment of individual infections. As resistant bacterial pathogens become increasingly widespread, healthcare systems around the world face growing challenges in controlling common infectious diseases. These challenges translate into increased morbidity and mortality, greater healthcare utilization, and substantial economic costs. The burden is particularly evident in hospitals, where resistant infections are often associated with prolonged hospitalization, treatment failure, and limited therapeutic options (Murray et al., 2022).

From a clinical perspective, AMR has become a major cause of preventable illness and death. Resistant bacteria are responsible for a wide range of healthcare-associated and community-acquired infections, including pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections, and surgical site infections. Compared with infections caused by susceptible organisms, multidrug-resistant infections are more difficult to treat and are frequently associated with delayed recovery, increased complications, and poorer clinical outcomes. A comprehensive global analysis estimated that bacterial AMR was directly responsible for approximately 1.27 million deaths in 2019 and contributed to nearly 5 million deaths worldwide, emphasizing its growing importance as a global health threat (Murray et al., 2022).

The economic consequences of AMR are equally substantial. Resistant infections often require longer hospital

stays, additional laboratory investigations, more expensive antimicrobial agents, and intensive supportive care. These factors increase healthcare expenditures and place considerable pressure on already strained healthcare systems. The burden is especially significant in low- and middle-income countries, where access to advanced diagnostics and novel treatments may be limited. Beyond direct medical costs, AMR also generates important societal costs through productivity losses, long-term disability, and premature mortality, further amplifying its economic impact (O'Neill, 2016).

The consequences of AMR are not limited to the treatment of infectious diseases but extend to many areas of modern medicine. Procedures such as organ transplantation, cancer chemotherapy, neonatal intensive care, and major surgical interventions depend heavily on the availability of effective antimicrobial agents for infection prevention and treatment. As antimicrobial resistance continues to increase, the safety and success of these procedures may be jeopardized, posing a significant challenge to healthcare systems worldwide. Current projections indicate that, in the absence of effective global interventions, AMR could be responsible for millions of additional deaths each year and lead to substantial economic losses over the coming decades. These alarming forecasts highlight the importance of strengthening antimicrobial stewardship, improving infection prevention and control measures, expanding surveillance programs, and accelerating the development of novel therapeutic approaches that reduce reliance on conventional antibiotics (O'Neill, 2016).

Taken together, the clinical and economic burden of antimicrobial resistance demonstrates that AMR is far more than a microbiological problem. It represents a complex global challenge with important implications for public health, healthcare sustainability, and economic development. Addressing

this threat will require coordinated efforts that combine innovative antimicrobial strategies with existing prevention and treatment practices to preserve the effectiveness of infectious disease management in the future.

3. BACTERIOPHAGE THERAPY

3.1. Biology of Bacteriophages

Bacteriophages, or simply phages, are viruses that specifically infect bacteria. They are considered the most abundant biological entities on Earth, with an estimated population exceeding 10^{31} particles distributed across diverse environments, including soil, water, animals, and the human microbiota. Since their discovery by Frederick Twort in 1915 and Félix d'Hérelle in 1917, phages have attracted considerable scientific interest because of their unique ability to recognize and eliminate bacterial cells with remarkable specificity (Kortright et al., 2019).

Although bacteriophages exhibit considerable diversity in morphology and genetic composition, their life cycles are generally classified as either lytic or lysogenic. Lytic phages infect bacterial cells, replicate within them, and ultimately cause cell lysis, releasing newly formed viral particles into the surrounding environment. In contrast, temperate phages can integrate their genetic material into the bacterial genome and remain dormant for extended periods before becoming active. Because lytic phages directly kill their bacterial hosts, they are regarded as the most suitable candidates for therapeutic applications (Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

One of the most distinctive features of bacteriophages is their high degree of host specificity. Unlike broad-spectrum antibiotics, which often affect both pathogenic and beneficial

microorganisms, phages typically target only particular bacterial species or strains. This selective activity offers the possibility of controlling infections while minimizing disruption of the normal microbiota. Another important advantage is their ability to replicate at the site of infection. As long as susceptible bacterial hosts are present, phage populations can increase naturally, potentially enhancing their therapeutic effectiveness without repeated dose escalation (Strathdee et al., 2023).

3.2. Therapeutic Applications

3.2.1. Multidrug-Resistant Infections

The resurgence of interest in phage therapy is largely driven by the rapid increase in multidrug-resistant (MDR) bacterial pathogens. Numerous experimental and clinical studies have demonstrated the capacity of bacteriophages to target pathogens that exhibit resistance to multiple antibiotic classes, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Compassionate-use cases and early clinical investigations have reported successful treatment outcomes in patients with severe infections that were refractory to conventional antimicrobial therapy, highlighting the potential of phages as an adjunct or alternative to antibiotics (Kortright et al., 2019; Strathdee et al., 2023).

3.2.2. Chronic Wound Infections

Chronic wounds, including diabetic foot ulcers, pressure ulcers, and burn-associated infections, frequently involve biofilm-forming bacterial populations that are highly tolerant to antibiotic treatment. Bacteriophages possess several properties that make them particularly attractive for the management of these infections. In addition to directly lysing bacterial cells, certain phages produce depolymerizing enzymes capable of degrading components of the biofilm matrix, thereby improving

bacterial accessibility and enhancing antimicrobial efficacy. Experimental studies and preliminary clinical observations suggest that phage-based formulations may contribute to wound healing by reducing bacterial burden and disrupting persistent biofilms (Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

3.2.3. Respiratory Infections

Respiratory infections caused by antibiotic-resistant bacteria represent another promising target for phage therapy. Chronic pulmonary infections associated with cystic fibrosis, ventilator-associated pneumonia, and hospital-acquired pneumonia frequently involve pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Inhaled or nebulized phage preparations have demonstrated encouraging results in preclinical models by reducing bacterial colonization and improving lung function. Although large-scale clinical evidence remains limited, ongoing studies continue to explore the safety, efficacy, and optimal delivery methods of phage therapy for respiratory infections (Abedon et al., 2017; Strathdee et al., 2023).

3.3. Advantages and Limitations

The growing interest in bacteriophage therapy stems from several unique advantages over conventional antibiotics. Phages exhibit high specificity toward target pathogens, reducing collateral damage to beneficial microbiota and potentially minimizing dysbiosis-associated complications. Their ability to replicate at infection sites enables adaptive amplification, and their effectiveness against antibiotic-resistant and biofilm-associated bacteria offers important therapeutic opportunities in situations where conventional treatments fail. Furthermore, phages can be combined with antibiotics, often producing synergistic antibacterial effects that enhance bacterial eradication

and may reduce the likelihood of resistance development (Kortright et al., 2019).

Despite these advantages, significant challenges continue to limit the widespread clinical implementation of phage therapy. The narrow host range of many phages necessitates careful matching between phage preparations and bacterial isolates, which may delay treatment initiation. Bacteria may also evolve resistance to therapeutic phages, although phages can often co-evolve to overcome such resistance. Additional concerns include regulatory uncertainty, manufacturing standardization, quality control, pharmacokinetic variability, and the potential influence of host immune responses on phage activity. Moreover, large randomized clinical trials remain relatively scarce compared with those available for conventional antibiotics (Strathdee et al., 2023).

Nevertheless, advances in genomic engineering, synthetic biology, and precision medicine are rapidly addressing many of these limitations. As antimicrobial resistance continues to threaten the effectiveness of traditional antibiotics, bacteriophage therapy has emerged as one of the most promising biological alternatives, offering a highly targeted and adaptable approach to the management of bacterial infections in the post-antibiotic era.

4. ANTIMICROBIAL PEPTIDES (AMPS)

4.1. Natural Host Defense Molecules

Antimicrobial peptides (AMPs), also referred to as host defense peptides, constitute an integral part of innate immunity and are present in almost all living organisms including microorganisms, plants, invertebrates and vertebrates. These are small amino acid sequences, usually positively charged peptides that form one of the first lines of defense to pathogenic organisms

and are essential part of maintaining protection of the host from bacterial, fungal, viral, and parasitic disease. In human, AMPs are secreted by epithelial tissue and immune cells, such as neutrophils, macrophages as well as epithelial cells of skin, respiratory tract and gastrointestinal mucosa (Mookherjee et al., 2020).

In contrast to traditional antibiotics, which tend to work by binding to and inhibiting a particular bacterial structure or metabolic process, AMPs are multifunctional molecules with direct antimicrobial activity and immunomodulatory functions. Well-studied human AMPs are defensins and cathelicidins, in particular the peptide LL-37, that not only mediate pathogen clearance but also regulate the inflammatory responses and influence tissue repair. As AMPs are naturally present in host defenses, they are increasingly considered as conceivable substitutes and enhancers of conventional antimicrobial treatment in the face of rising antimicrobial resistance, making them a promising class of therapeutics.

4.2. Mechanisms of Action

The antimicrobial activity of AMPs is largely due to their anionic bacterial membrane interaction. Most peptides from antimicrobials have a positive net charge which allows them to interact electrostatically with the negatively charged bacterial cell envelope components. After binding with the membrane, AMPs may perturb membrane integrity by several mechanisms such as forming pores, destabilizing the membrane structure, disorganizing the lipid bilayer. The consequence of these interactions is release of intracellular components and rapid bacterial cell death. Several antimicrobial peptides are also active intracellularly, in addition to their membrane-mediated actions.

Some AMPs are capable of invading bacterial cells and they inhibit vital processes like protein synthesis, nucleic acid replication, enzyme activity, and cell wall formation. And more importantly, many host defense peptides have immunomodulatory properties and can influence cytokine production, leukocyte recruitment, phagocytosis and wound healing (Mookherjee et al., 2009). Such dual anti-microbial/immune-regulatory activities could be associated with less propensity to generate resistance when compared with more conventional antibiotics that act on a single molecular target (Mookherjee et al., 2020).

The fact that AMPs can exert potent activity not only against sensitive bacteria but also against multidrug-resistant bacteria, has raised high expectations on their utility as therapeutic agents. Certainly, their abilities to modulate host immune responses could add further advantages in infections when these are accompanied by excessive inflammation or defective immunity.

4.3. Clinical Development and Challenges

The growing threat of antimicrobial resistance has accelerated efforts to develop antimicrobial peptides as novel therapeutic agents. Numerous naturally occurring and synthetic AMPs have demonstrated promising activity against clinically relevant pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. Several peptide-based candidates have progressed to preclinical and clinical evaluation for indications such as skin and soft tissue infections, diabetic wounds, respiratory infections, and medical device-associated biofilm infections (Mahlapuu et al., 2020).

Despite these encouraging findings, the clinical translation of antimicrobial peptides remains challenging. One major limitation is their susceptibility to enzymatic degradation by host proteases, which can reduce biological activity and limit systemic administration. Additional concerns include potential cytotoxicity at high concentrations, relatively short half-lives, manufacturing costs, and difficulties associated with large-scale production. Furthermore, pharmacokinetic properties such as tissue distribution and stability require optimization to ensure effective therapeutic performance.

Recent advances in peptide engineering, nanotechnology-based delivery systems, and synthetic biology have provided new opportunities to overcome these limitations. Structural modifications, peptide mimetics, encapsulation technologies, and combination therapies are currently being explored to improve stability, efficacy, and safety profiles. As these technologies continue to evolve, antimicrobial peptides are increasingly viewed as promising candidates for next-generation anti-infective therapies capable of addressing the growing burden of antimicrobial resistance.

Overall, antimicrobial peptides represent a unique class of therapeutic molecules that bridge innate immunity and antimicrobial intervention. Their multifunctional nature, broad-spectrum activity, and potential to complement existing antibiotics position them as attractive components of future strategies aimed at combating resistant bacterial infections.

5. PROBIOTICS, POSTBIOTICS AND MICROBIOME-BASED THERAPIES

5.1. Gut Microbiota and Colonization Resistance

The human small intestine is home to a remarkably diverse array of microbes that are essential for human health and that provide a barrier to infection. Such complex population of microorganisms is involved in nutrient metabolism, development of immune system and host physiological functions. Among its most relevant protective functions, is the so called colonization resistance, a mechanism by means of which autochthonous microorganisms makes difficult that pathogens bacteria settle down and grow. Colonization resistance is mediated via different mechanisms, such as competition for nutrients and ecological niches, synthesis of antimicrobial compounds, altering the intestinal pH, and activation of host immune system (Hill et al., 2014).

The disturbance of the gut microbiota, sometimes called dysbiosis, can result from exposure to antibiotics, disease, diet, or other environmental factors. These changes may reduce diversity and colonization resistance in the microbiota, allowing opportunistic pathogens to thrive. The increased vulnerability to infections after broad-spectrum antibiotic therapy underlines the need for including options for preservation and restoration of healthy microbial communities in future antimicrobial policies.

5.2. Probiotic Interventions

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts, are beneficial to the health of the host. Several recent reviews have highlighted the growing interest for probiotics as a mean for pathogen colonization decrease and for support of microbial homeostasis after antibiotic treatment. Probiotics commonly studied include species of

Lactobacillus, *Bifidobacterium*, and the yeast *Saccharomyces boulardii* (Hill et al., 2014).

The beneficial effects of probiotics are mediated through diverse mechanisms. These include competitive exclusion of pathogenic bacteria, enhancement of epithelial barrier integrity, production of antimicrobial substances such as bacteriocins and organic acids, and modulation of local and systemic immune responses. Although probiotics are not intended to replace antibiotics in the treatment of severe bacterial infections, they may contribute to infection prevention and support host resilience against pathogen colonization, particularly in individuals with disrupted microbiota.

5.3. Postbiotics and Microbial Metabolites

While probiotics rely on the administration of live microorganisms, postbiotics consist of non-viable microbial cells, cell components, or metabolites that exert beneficial biological effects. Interest in postbiotics has grown substantially because these preparations may provide many of the advantages associated with probiotics while avoiding concerns related to microbial viability, storage stability, and potential risks in immunocompromised individuals (Salminen et al., 2021).

Among the most extensively studied postbiotic molecules are short-chain fatty acids, including acetate, propionate, and butyrate. These metabolites contribute to intestinal barrier function, regulate inflammatory responses, and influence interactions between the host and microbial communities. Additional postbiotic components, such as microbial peptides, enzymes, polysaccharides, and cell wall fragments, have demonstrated antimicrobial and immunomodulatory properties. As understanding of host-microbiome interactions continues to expand, postbiotics are emerging as promising candidates for microbiome-targeted therapeutic interventions.

5.4. Fecal Microbiota Transplantation (FMT)

Fecal microbiota transplantation (FMT) is a biontervention that was initially conceived as a relatively direct means to reestablish compromised microbial ecosystems. It is a procedure in which a fecal suspension from a healthy donor is introduced into the intestinal tract of a recipient in an attempt to restore a stable, balanced, and diverse microbial community. FMT has shown to be remarkably effective in treating recurrent *Clostridioides difficile* infection, an illness commonly linked with antibiotic-related dysbiosis and relapsing episodes of disease (Ooijevaar et al., 2019).

In addition to its established use in recurrent *C. difficile* infection, FMT is being explored for an expanding number of potential indications such as colonization with multidrug-resistant bacteria, inflammatory bowel disease, and a variety of other diseases associated with microbiome perturbation. Re-establishment of microbial diversity following FMT may also diminish the intestinal pool of resistant organisms and increase colonization resistance to opportunistic pathogens. Nevertheless, issues related to donor screening and selection, pathogen transmission, the long-term safety, and regulatory oversight are still causing significant problems for widespread uptake.

Taken together, probiotics, postbiotics and microbiome-directed therapies constitute a novel concept in the management of infectious diseases. These strategies do not simply aim to kill the pathogens, but aim to rebalance the host microbiome and promote the endogenous defense mechanisms against infectious diseases, which may also help reduce the dependency on traditional antibiotics.

6. ANTI-VIRULENCE STRATEGIES

Traditional antimicrobial therapies primarily focus on inhibiting bacterial growth or directly killing bacterial cells. While effective, these approaches exert strong selective pressure that can accelerate the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. In contrast, anti-virulence strategies seek to attenuate bacterial pathogenicity without necessarily affecting bacterial viability. By targeting specific virulence factors required for infection and disease progression, these approaches aim to reduce host damage while potentially minimizing the evolutionary pressure associated with conventional antibiotics (Dickey et al., 2017).

6.1. Quorum Sensing Inhibition

Quorum sensing is a bacterial communication system that allows bacteria to collectively control gene expression according to their cell density. Via the synthesis and detection of small signaling molecules, called autoinducers, bacteria in a community coordinate the expression of genes that control various processes that are beneficial for them as multicellular communities. These include production of factors contributing to virulence, biofilm formation, motility through secretion of toxins. A number of the particularly clinically relevant pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio* species, to name a few) employ quorum sensing systems as mediators of infection success (Rutherford & Bassler, 2012).

And because QS controls so many pathogenic traits, disruption of these signaling pathways is a potential therapeutic avenue. Quorum sensing inhibitors may act by inhibiting signal production, degradation of signaling molecules or interfering with signal-receptor binding. These agents, unlike classical antibiotics, do not necessarily kill or inhibit bacterial growth but abate expressed coordinated virulence phenotypes and, thus,

reduce the capacity of pathogens to colonize host tissues and evade immune responses. This strategy may diminish selection for resistance development as well, although evolutionary responses in the long-term remain an area of active study.

6.2. Toxin Neutralization

Bacterial toxins are among the most important mediators of host tissue damage and disease severity. Numerous pathogenic bacteria produce exotoxins or other toxic molecules that disrupt cellular functions, damage tissues, and facilitate bacterial dissemination. In many infections, toxin-mediated injury contributes substantially to clinical manifestations and disease progression.

Toxin neutralization strategies aim to prevent these harmful effects without directly targeting bacterial viability. Approaches include monoclonal antibodies, toxin-binding molecules, receptor decoys, and vaccines designed to neutralize specific virulence factors. By blocking toxin activity, these interventions can reduce tissue damage, improve host survival, and enhance the effectiveness of immune-mediated pathogen clearance. Because bacterial survival is not directly threatened, toxin-targeting therapies may exert less selective pressure for resistance than conventional antimicrobial agents (Dickey et al., 2017).

Recent advances in biotechnology have accelerated the development of highly specific anti-toxin agents. Several antibody-based therapies have demonstrated promising results against toxin-producing pathogens and highlight the growing potential of precision anti-virulence interventions as adjuncts to existing antimicrobial treatments.

6.3. Biofilm Disruption

Formation of biofilms is one of the most important virulence-related traits used by bacterial pathogens. Biofilms are complex microbial communities embedded in an extracellular matrix of polysaccharides, proteins, lipids, and extracellular DNA produced by the community. This matrix shields them against environmental challenges, host immune system and antimicrobial drugs, and is associated with the stability of chronic and relapsing infections.

Biofilm-related infections are prevalent in chronic wounds, indwelling medical devices, respiratory infections, and urinary tract infections. Biofilms resident bacteria may have significantly enhanced antimicrobial tolerance when compared to their free-floating, planktonic counterparts. Thus treatment of these infections is often complicated by the need for extended therapy and/or removal of infected device.

Anti-virulence strategies for biofilms are based on the principle of mode of action directly involving formation, sustenance, or biofilm architecture. Liable approaches include the interference with quorum sensing system, biodegradation of matrix molecules, anti-bacterial adhesion strategies and the regulation of intracellular or intercellular signaling pathways on biofilm progressions. Disrupting biofilm structure, these strategies may sensitize bacteria to host immune defenses and traditional antimicrobials. In addition, biofilm-specific drugs may be of great merit when used along with antibiotics, and could generate synergistic effects in fighting infections (Dickey et al., 2017).

Overall, anti-virulence approaches are a promising new paradigm in the management of infectious diseases. These strategies do not kill bacteria en masse, but rather disarm pathogens and diminish their ability to cause disease. As

knowledge of bacterial pathogenesis continues to grow, anti-virulence therapies could become key elements of novel therapeutic regimens aimed at treating infection and at the same time minimizing the pressure for the development of antimicrobial resistance.

7. CRISPR-Based Antibacterial Technologies

The discovery of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and their associated Cas proteins has transformed modern molecular biology and opened new possibilities for combating bacterial infections. Originally identified as an adaptive immune system used by bacteria and archaea to defend against invading genetic elements such as bacteriophages and plasmids, CRISPR-Cas systems can be programmed to recognize and cleave specific DNA sequences. This remarkable specificity has generated significant interest in the development of CRISPR-based antibacterial technologies capable of selectively targeting pathogenic bacteria and antimicrobial resistance genes (Bikard & Barrangou, 2017).

7.1. Gene-Specific Elimination of Resistant Bacteria

CRISPR-based antibacterials, in contrast to conventional antibiotics that can have an activity against a wide range of microbes, can be engineered to be species-specific or strain-specific or even to target certain genetic traits. Guide RNAs program the Cas nucleases to specific DNA sequences, allowing cleavage of chromosomal genes or resistance-encoding plasmids at a high level of precision. DNA damage can lead to bacterial cell death when vital bacterial genes are the targets. Instead, targeting resistance genes might convert bacteria back to being susceptible to conventional antibiotics without necessarily killing the entire population.

This gene-specific method is particularly appealing for treating multidrug resistant pathogens because it gives the opportunity to remove resistance determinants while maintaining the beneficial members of the microbiota, and the like. That selectivity could mean fewer off-target ecological effects, which commonly occur with broad-spectrum antibiotics and that can contribute to dysbiosis.

7.2. Precision Antimicrobial Approaches

One of the exciting potentials of CRISPR technology is its use as a precision antimicrobial agent. By modifying guide RNA sequences for a particular pathogen or resistance gene the scientists can create specifically targeted treatments that can distinguish even among very similar bacterial strains. This type of accuracy is not achievable with traditional antibiotics.

Currently, several delivery methods are under investigation to deliver CRISPR constructs into bacterial cells such as bacteriophage, phagemids, conjugative plasmids, and nanoparticle-based systems. In this regard, engineered bacteriophages, which take advantage of the natural host specificity of native phages and the programmable target specificity of CRISPR systems, have so far attracted the most attention. These combinations may lead to especially selective agents against resistant bacteria with less impact on the surrounding microbial communities (Rodrigues et al., 2019).

7.3. Current Experimental Evidence

While CRISPR-based antimicrobial applications are still at the early stages of development, a number of proof-of-principle studies have shown promise. In vitro, resistance genes linked with β -lactam, carbapenem, and colistin resistance have been targeted successfully leading to killing of bacteria or re-sensitization to antibiotics. Further, CRISPR systems can be used to strip pathogenic bacteria from heterogeneous microbial

communities without ablating the non-target microbial community members as demonstrated in experimental studies.

Although these results are encouraging, there are several obstacles that need to be overcome for general clinical application. Successful delivery of CRISPR molecules to bacterial cells is still a significant challenge, especially in the context of multicomponent complex infection. Other issues include unintended off-target effects, potential bacterial escape mechanisms, manufacturing considerations, and regulatory issues that can add the burden to the potential challenges brought by this new technology. Yet, new approaches for engineering, genome editing, and delivery methods are rapidly changing and hold tremendous promise applicable to this field.

Overall, CRISPR-based antibacterial products are an innovative, high-specificity option for the treatment of infectious diseases. And these systems may be particularly well suited to be combined with antimicrobial therapies for future strategies designed to help alleviate the global burden of antimicrobial resistance, due to their ability to allow selective killing of resistant bacteria and even targeted editing of resistance determinants.

8. IMMUNOTHERAPEUTIC STRATEGIES

The growing incidence of antimicrobial resistance has prompted renewed interest in treatment approaches that bolster host defenses rather than inhibit bacterial viability directly. Immunotherapeutic strategies establish either the prevention of infection, acceleration of bacterial clearance, or the mitigation of disease severity through exploitation of host immune system components. In contrast to traditional antibiotics which apply selective pressure on the bacteria, immunotherapy intervenes on natural defence systems and has the potential to be an important complementary tool to combat resistant pathogens.

8.1. Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies(mAbs) are selective immunoglobulins that bind to a unique target on microbial antigens, toxins or virulence factors. Recent advances in antibody engineering have led to the generation of antibodies specific for vital bacterial elements implicated in colonization, immune evasion, and tissue damage. Compared with broad-spectrum antimicrobial drugs, monoclonal antibodies have incredible specificity, protecting the beneficial microbes from collateral damage due to their action (Zurawski & McLendon, 2020).

Some experimental antibody therapies have shown promising activity against important bacterial pathogens. Targets include surface adhesins, secreted toxins, and virulence-associated proteins from *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridioides difficile*, among others. In addition, monoclonal antibodies may be combined with conventional antibiotics, to increase bacterial killing and at the same time to minimise toxin-mediated tissue damage. While a small number of antibacterial monoclonal antibodies have become established for clinical use, the ongoing progress in biotechnology will likely unlock new therapeutic options.

8.2. Bacterial Vaccine Development

Vaccination continues to be the best way to prevent infectious diseases and to limit the use of the antibiotics. Vaccines prevent infection and its associated immune selection pressure by eliciting protective immune responses prior to pathogen exposure. Achievements with successful bacterial vaccines for vaccines against the major pathogens *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* have already resulted in major public health benefits in terms of reductions in disease, hospitalization, and death (Jansen & Anderson, 2018). Development of novel, effective

bacterial vaccines is now a critical aspect of the global AMR response. The burst of genomics and proteomics with reverse vaccinology has enabled to identify new antigenic targets, which could elicit protective immune responses against resistant pathogens. Ongoing research lines involve vaccines targeting other MDR pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. Although important scientific and regulatory hurdles still exist, potentially successful immunization approaches may ultimately diminish the burden of resistant infections by stopping disease before antimicrobial treatment is needed.

8.3. Immune Modulation Strategies

Besides antibodies and vaccines, therapeutic influence on the host immune response is an other space of promise for so lutioning infectious diseases. Immunomodulatory therapies attempt to boost host-protective antimicrobial activities and mitigate host-detrimental inflammatory responses that exacerbate tissue injury and disease severity. Such strategies could also be especially beneficial in patients with immune deficiency or severe infections in which immune dysregulation significantly affects clinical outcome (Hancock et al., 2012).

Several immune-modulatory strategies are currently under investigation, including cytokine-based therapies, stimulation of innate immune pathways, administration of host defense peptides, and manipulation of immune cell function. These interventions aim to improve pathogen clearance while preserving immune homeostasis. Importantly, because they target host responses rather than bacterial cells directly, immune-modulatory therapies may be less susceptible to the development of microbial resistance.

Collectively, immunotherapeutic approaches represent a complementary strategy for addressing the growing challenge of

antimicrobial resistance. By preventing infections, neutralizing bacterial virulence factors, and enhancing host defense mechanisms, monoclonal antibodies, vaccines, and immune-modulating therapies have the potential to reduce dependence on conventional antibiotics and contribute to more sustainable infectious disease management in the future.

9. NANOTECHNOLOGY IN ANTIBACTERIAL THERAPY

Nanotechnology has emerged as a promising field in the development of innovative antimicrobial strategies, offering new opportunities to overcome many limitations associated with conventional antibiotics. Nanomaterials possess unique physicochemical properties, including high surface-area-to-volume ratios, tunable surface characteristics, and enhanced interactions with biological systems. These features enable the design of targeted antimicrobial platforms capable of improving drug delivery, enhancing antibacterial efficacy, and reducing the emergence of resistance. As antimicrobial resistance continues to threaten global health, nanotechnology-based approaches are increasingly being explored as complementary or alternative therapeutic options (Makabenta et al., 2021).

9.1. Nanoparticle-Based Drug Delivery

One of the most important applications of nanotechnology in infectious disease management is the development of nanoparticle-based drug delivery systems. Conventional antibiotics often face challenges such as poor bioavailability, rapid degradation, limited tissue penetration, and systemic toxicity. Nanoparticle carriers can improve the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of antimicrobial agents by protecting drugs from degradation and facilitating controlled release at infection sites.

Various nanocarriers, including liposomes, polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, and nanogels, have been investigated for antimicrobial applications. These systems may enhance drug accumulation within infected tissues, improve intracellular delivery, and reduce off-target effects. In addition, targeted delivery strategies can increase local drug concentrations while minimizing systemic exposure, potentially improving therapeutic efficacy and reducing adverse effects. Such approaches may be particularly valuable for the treatment of chronic and biofilm-associated infections that are often difficult to eradicate using conventional antibiotic formulations (Wang et al., 2017).

9.2. Metal Nanoparticles

Nanoparticles, generally metal-based, are another active field of research in the antibacterial nanotechnology. Nanoparticles of silver, gold, copper, zinc oxide and other metals exhibit potent antimicrobial properties over a wide range of bacterial pathogens, including multidrug resistant bacteria. Their antimicrobial activities have been related to several mechanisms, such as disturbance of bacterial membranes, production of reactive oxygen species, alteration in cellular metabolism, and damage of nucleic acids and proteins (Beyth et al., 2015).

Among these materials, Ag NPs have attracted the greatest attention due to their potent antibacterial activity and broad applications in wound dressings, medical devices, and surface coatings. Notably, the multi-target mechanisms underlying the antibacterial effects of metal nanoparticles may significantly reduce the likelihood of resistance development compared with conventional antimicrobial agents that act on a single bacterial pathway. However, concerns regarding toxicity, environmental accumulation, and long-term safety remain important challenges

that must be addressed before their widespread clinical application.

9.3. Hybrid Antimicrobial Systems

Recent advances have led to the development of hybrid antimicrobial systems that combine nanotechnology with other antibacterial approaches. These multifunctional platforms may incorporate antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriophages, metal nanoparticles, or immune-modulatory agents within a single delivery system. By integrating multiple mechanisms of action, hybrid systems aim to enhance antibacterial efficacy while reducing the probability of resistance emergence.

For example, nanoparticle-antibiotic combinations have demonstrated synergistic effects against resistant bacterial strains, while phage-loaded nanomaterials have shown potential for improving phage stability and targeted delivery. Similarly, nanoparticles carrying antimicrobial peptides may enhance peptide stability and prolong biological activity. Such integrated approaches reflect the growing trend toward combination therapies that exploit the advantages of multiple antimicrobial strategies simultaneously (Makabenta et al., 2021).

Overall, nanotechnology offers a versatile platform for addressing many of the challenges associated with antimicrobial resistance. Through improved drug delivery, direct antibacterial activity, and the development of multifunctional therapeutic systems, nanomaterials have the potential to complement existing antimicrobial therapies and contribute to the next generation of infection management strategies. Continued advances in materials science, biotechnology, and translational research are expected to further expand the clinical applications of nanotechnology in combating resistant bacterial infections.

10. FUTURE PERSPECTIVES AND CHALLENGES

The growing threat of antimicrobial resistance has accelerated the search for innovative therapeutic approaches capable of complementing or replacing conventional antibiotics. As discussed throughout this chapter, strategies such as bacteriophage therapy, antimicrobial peptides, microbiome-based interventions, anti-virulence agents, CRISPR-based technologies, immunotherapies, and nanotechnology-driven platforms offer promising alternatives for the management of bacterial infections. Despite substantial scientific progress, however, significant challenges must be addressed before these approaches can be widely integrated into routine clinical practice.

One of the major obstacles involves regulatory and manufacturing considerations. Most existing regulatory frameworks were developed specifically for conventional pharmaceuticals and may not be fully applicable to biologically complex therapies such as bacteriophages, microbiome-based products, or gene-targeting technologies. Establishing standardized procedures for product characterization, quality control, large-scale manufacturing, and clinical evaluation remains a critical requirement for successful translation from laboratory research to clinical implementation (Theuretzbacher et al., 2020).

Safety considerations also represent an important challenge. Although many alternative antimicrobial approaches have demonstrated encouraging efficacy in experimental and early clinical studies, comprehensive long-term safety data remain limited for several emerging technologies. Potential concerns include unintended effects on host microbiota, immune responses to biological therapeutics, horizontal gene transfer, off-target genetic modifications, and nanoparticle-associated toxicity.

Careful risk assessment and post-marketing surveillance will therefore be essential to ensure the safe deployment of these novel interventions (Aslam et al., 2021).

Another promising direction involves the development of personalized antimicrobial therapies. Advances in genomics, microbiome analysis, artificial intelligence, and precision medicine are enabling a more individualized approach to infection management. Future therapeutic strategies may be tailored according to pathogen characteristics, resistance profiles, host immune status, and microbiome composition. Such personalized approaches could improve treatment efficacy while minimizing unnecessary antimicrobial exposure and reducing the risk of resistance development.

Combination therapies are also likely to play an increasingly important role in future infectious disease management. Rather than functioning as direct replacements for antibiotics, many emerging technologies may achieve optimal effectiveness when used alongside conventional antimicrobial agents. For example, bacteriophages may enhance antibiotic susceptibility, anti-virulence agents may reduce bacterial pathogenicity while antibiotics eliminate the pathogen, and nanoparticle-based systems may improve drug delivery to otherwise inaccessible infection sites. The integration of complementary therapeutic mechanisms may provide synergistic benefits and improve clinical outcomes while reducing selective pressure for resistance (Czaplewski et al., 2016).

Importantly, the future of antimicrobial therapy should not be viewed as a transition away from antibiotics but rather as the development of a more diversified therapeutic arsenal. Conventional antibiotics will likely remain indispensable for the treatment of many bacterial infections; however, their effectiveness may be preserved and enhanced through integration

with alternative approaches. The successful management of antimicrobial resistance will therefore depend on combining innovative technologies with antimicrobial stewardship programs, infection prevention strategies, surveillance systems, and continued investment in research and development.

Ultimately, overcoming antimicrobial resistance will require coordinated efforts from researchers, clinicians, regulatory agencies, industry, and public health organizations. Continued advances in biotechnology, synthetic biology, immunology, and materials science provide reason for optimism that future antimicrobial strategies will be more targeted, sustainable, and resilient than those currently available. The challenge moving forward is not only to develop these innovations but also to ensure their safe, effective, and equitable implementation on a global scale.

11. CONCLUSION

Antimicrobial resistance has emerged as one of the most significant threats to global public health, undermining the effectiveness of conventional antibiotics and challenging many of the advances achieved in modern medicine. The continued rise of multidrug-resistant bacterial pathogens has highlighted the urgent need for innovative therapeutic approaches capable of preventing, controlling, and treating infections through mechanisms distinct from those employed by traditional antimicrobial agents.

As discussed throughout this chapter, a diverse range of alternative strategies has demonstrated considerable potential in addressing the growing antimicrobial resistance crisis. Bacteriophage therapy offers highly specific bacterial targeting and the ability to combat multidrug-resistant pathogens. Antimicrobial peptides provide both direct antimicrobial activity and immune-modulatory effects, while microbiome-based

interventions seek to restore colonization resistance and microbial homeostasis. Anti-virulence therapies represent a novel approach focused on disarming pathogens rather than eliminating them, potentially reducing the selective pressures that drive resistance development. Similarly, CRISPR-based technologies introduce unprecedented precision in targeting bacterial genomes and resistance determinants. Immunotherapeutic approaches, including monoclonal antibodies, vaccines, and immune modulation strategies, strengthen host defenses against infection, whereas nanotechnology-based systems provide innovative platforms for antimicrobial delivery and enhanced therapeutic efficacy.

Despite their promise, these emerging technologies face important scientific, regulatory, and practical challenges that must be addressed before widespread clinical implementation can be achieved. Issues related to safety, manufacturing, standardization, delivery methods, cost-effectiveness, and regulatory approval remain critical considerations for future development. Nevertheless, ongoing advances in microbiology, synthetic biology, immunology, biotechnology, and materials science continue to accelerate progress in the field and expand the range of available therapeutic possibilities.

Importantly, the future management of bacterial infections is unlikely to rely on a single universal solution. Instead, successful control of antimicrobial resistance will require integrated and multidisciplinary approaches that combine conventional antibiotics with innovative biological and technological interventions. The strategic use of combination therapies, personalized treatment approaches, antimicrobial stewardship programs, and preventive measures will be essential for preserving the effectiveness of existing treatments while maximizing the benefits of emerging alternatives.

In conclusion, the transition from an antibiotic-dependent paradigm toward a broader anti-infective framework represents a critical step in addressing the global antimicrobial resistance crisis. By leveraging advances across multiple scientific disciplines, next-generation therapeutic strategies have the potential to reshape infectious disease management and contribute to a more sustainable and resilient future for global healthcare.

REFERENCES

- Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Editorial: Phage therapy: Past, present and future. *Frontiers in Microbiology*, 8, 981.
- Aslam, S., Lampley, E., Wooten, D., Karris, M., Benson, C., Strathdee, S., & Schooley, R. T. (2021). Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(9), ofaa389.
- Beyth, N., Houri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R. (2015). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 246012.
- Bikard, D., & Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 155–160.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), e00047-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V. A., Foster, S., Gilmore, B. F., Hancock, R. E. W., Harper, D., Henderson, I. R., Hilpert, K., Jones, B. V., Kadioglu, A., Knowles, D., Olafsdottir, S., Payne, D., Projan, S., Shaunak, S., ... Rex, J. H. (2016). *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 239–251.

- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433.
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), 457–471.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: Structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00066-18.
- Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>

- Hancock, R. E. W., Nijnik, A., & Philpott, D. J. (2012). Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 243–254.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Holmes, A. H., et al. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187.
- Jansen, K. U., & Anderson, A. S. (2018). The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14(9), 2142–2149.
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 219–232.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2020). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 194.
- Makabenta, J. M. V., Nabawy, A., Li, C.-H., Schmidt-Malan, S., Patel, R., & Rotello, V. M. (2021). Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 23–36.
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides:

- Functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, C. J. L., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019. *The Lancet*, 399(10325), 629–655.
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*.
- Ooijselaar, R. E., Terveer, E. M., Verspaget, H. W., Kuijper, E. J., & Keller, J. J. (2019). Clinical application and potential of fecal microbiota transplantation. *Annual Review of Medicine*, 70, 335–351.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318.
- Rodrigues, M., McBride, S. W., Hullahalli, K., Palmer, K. L., & Duerkop, B. A. (2019). Conjugative delivery of CRISPR-Cas9 for the selective depletion of antibiotic-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e01454-19.
- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a012427.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649–667.

- Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., & Sulakvelidze, A. (2023). Phage therapy: From biological curiosity to precision antimicrobial medicine. *Nature Reviews Microbiology*, 21, 181–199.
- Tacconelli, E., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327.
- Theuretzbacher, U., Outterson, K., Engel, A., & Karlén, A. (2020). The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 275–285.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249.
- WHO. (2024). *Antimicrobial resistance fact sheet and global surveillance updates*.
- Zurawski, D. V., & McLendon, M. K. (2020). Monoclonal antibodies as an antibacterial approach against bacterial pathogens. *Antibiotics*, 9(4), 155.

THE FUTURE OF MICROBIOME-BASED NEUROPROTECTION: VSL#3 PROBIOTICS, PRECISION MEDICINE, AND EMERGING STRATEGIES IN NEURODEGENERATIVE DISEASE

Eylül HARAVI¹

1. INTRODUCTION

Probiotics have been defined by the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations and the World Health Organization (WHO) as live microorganisms that provide a health benefit for the host when consumed in sufficient amounts (1). Among these probiotics, VSL#3 is a distinct, potent multi-strain probiotic that contains 8 bacterial species from the *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus thermophilus* genera. The formulation has synergistic effects on intestinal barrier physical, immunologic, and microbial host-barrier communication enhancement (2). Because of its complex microbial composition and high number of colony-forming units (CFU), VSL#3 is the prototypic preparation that has been used to investigate microbiome-related processes mediating neurodegeneration. The growing incidence of neurodegenerative diseases (NDs), especially Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), poses a significant challenge to public health worldwide, mainly as a consequence of the increasing life expectancy. AD is the most common cause of dementia, accounting for more than 30% of people over the age of 85, while PD and ALS, though rarer, cause significant disability and healthcare burden (3). New research is linking these

¹ PhD, Çukurova University, ORCID: 0000-0002-3892-6840.

disorders to intestinal dysregulation, chronic inflammation and immune dysfunction and potentially suggesting that manipulating the gut microbiome could have treatment utility (4). In this respect, the microbiome–gut–brain axis has redefined our perception for neurodegenerative disease pathophysiology. This bidirectional communication network consists of neural, immune and endocrine pathways, and allows the gut microbiome to modulate central nervous system functioning via metabolites such as short chain fatty acids, tryptophan metabolites and polyamines. Dysregulation of these microbial signals can lead to increased oxidative stress, microglia activation, and neuronal injury, major events in the progression of neurodegeneration (5,6).

Importantly, recent clinical trials and mechanistic insights illuminate how probiotics, particularly VSL#3, can make neuroprotective effects by recovering microbial balance, reducing systemic inflammation, and modulating neuroimmune signaling. These chapter approaches in neurodegenerative diseases provide a promising translational framework for understanding how interventions targeting the gut microbiota can complement traditional therapies (7).

2. THE MICROBIOME-GUT-BRAIN AXIS IN NEURODEGENERATIVE DISEASE RESEARCH

An increasing number of studies suggest that the microbiome—gut—brain axis is a core process in brain health. This bidirectional system includes neuronal pathways (e.g., vagus nerve), immune signaling, endocrine regulation, and microbially derived biochemical signaling (8). Gut microbiota metabolites including short-chain fatty acids (SCFAs), neurotransmitters such as γ -aminobutyric acid and serotonin, and immune mediators influence central nervous system activity. Alteration of microbial homeostasis (dysbiosis) has been

associated with neuroinflammation, oxidative stress, and compromised neuronal function-processes intimately involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (8). Thus, intervention of gut microbiota is regarded as a promising strategy for the prevention/treatment for neurodegenerative diseases, with probiotic standing out as one of the most attractive candidates.

3. EXPERIMENTAL EVIDENCE ON THE EFFECTS OF VSL#3 PROBIOTICS

3.1. Animal Models

3.1.1. Alzheimer's Disease (AD)

Transgenic mouse models of AD demonstrate that VSL#3 treatment is able to reduce neuropathological and behavioural hallmarks of the disease. One notable finding is the attenuation of amyloid- β (A β) plaque load after probiotics supplementation. This has been attributed to effects on systemic inflammation and gut barrier permeability leading to decreased levels of peripheral pro-inflammatory cytokines that are known to contribute to amyloidosis in the brain (9). Furthermore, behavioral results reveal that VSL#3-treated AD mice also show better performance in paradigms of spatial learning and memory (Morris water maze), indicative of functional rescue of cognition (10). These effects may be mediated through short-chain fatty acid (SCFA)-dependent modulation of microglial activation and synaptic plasticity.

3.1.2. Parkinson's Disease (PD)

In mouse models of Parkinson's disease including toxin-induced and familial models, VSL#3 reduces α -synuclein accumulation in striatum and substantia nigra (11). Mechanistically, this could result from increased degradation of misfolded proteins via autophagy-related pathways, as well as diminished oxidative damage to dopaminergic neurons. Treated animals also showed better motor coordination and less rigidity, which was correlated

with increased dopamine levels in striatum. VSL#3 importantly also alters the gut microbiota profile of PD models, with increased lactobacilli and bifidobacteria and decreased pro-inflammatory taxa including Enterobacteriaceae (6). These alterations in the microbiota are thought to decrease systemic levels of the endotoxin (lipopolysaccharide, LPS), limiting neuroinflammation.

3.1.3. Multiple Sclerosis (MS)

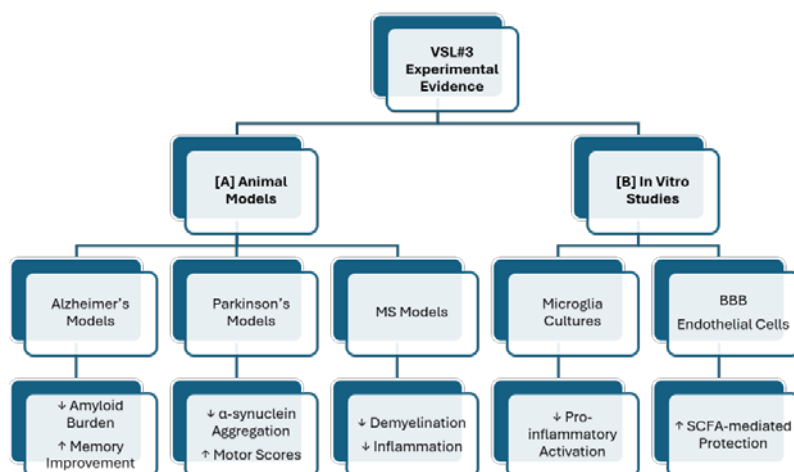
In the mouse model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), VSL#3 treatment results in a marked decrease in demyelination and axonal damage (12). Histopathological examination shows higher myelin sheath sparing, whereas immunological evaluation reveals reduced infiltration of autoreactive T-cells in the CNS. The mechanism seems to include modulation of Th cell differentiation toward Treg expansion and inhibition of pro-inflammatory Th1 and Th17 responses (13). Moreover, SCFAs from probiotic metabolism favor microglial polarization toward the anti-inflammatory M2 phenotype, providing additional support for neuroprotection.

3.2. In Vitro Studies

3.2.1. Microglia Cultures

Microglia are key mediators of neuroinflammation, and conditioned media derived from VSL#3 cultures has been demonstrated to reduce dramatically the production of the pro-inflammatory mediators nitric oxide (NO), TNF- α , and IL-1 β in activated microglia (14). This indicates that metabolites of VSL#3 strains - predominantly indole derivatives and SCFAs - might have a direct effect on microglia. Significantly, the anti-inflammatory shift in microglia is linked with reduced oxidative stress and increased neurotrophic support.

Figure 1. Experimental Evidence on the Effects of VSL#3 Probiotics



3.2.2. Blood–Brain Barrier (BBB) Models

The blood-brain barrier is typically disrupted in neurodegenerative disorders, allowing access to circulating toxins and inflammatory mediators. Human brain microvascular endothelial cells incubated with VSL#3-derived SCFAs demonstrated improved barrier function through increased expression of tight junction proteins (including occludin and claudin-5) (15). In addition, incubation of endothelial cells with VSL#3 supernatants leads to reduced permeability upon inflammatory insult (i.e., TNF- α challenge), indicating a direct involvement in BBB protection. It is these actions that are pivotal because maintenance of the BBB attenuates neuroinflammatory cascades and subsequent neuron damage. Altogether, preclinical data provide a strong rationale for a neuroprotective function of VSL#3 in pathologies characterized by severe neurodegeneration. The underlying mechanistic principles that are common include:

- Reduction of neuroinflammation (e.g., microglial activation, cytokines).
- Restoration of gut microbial balance (probiotic taxa, decrease of endotoxin producing bacteria).
- Increased production of neuroprotective molecules (SCFAs, indole derivatives, GABA).
- Protection of barrier layers (e.g., intestinal epithelium and BBB)
- Amelioration of neuropathological hallmarks (such as amyloid plaques, α -synuclein aggregates, and demyelinating lesions).

These synergistic outcomes indicate that VSL#3 could serve as a disease-modifying adjunct option for such neurodegenerative diseases and demand further translational and clinical research.

4. HUMAN CLINICAL EVIDENCE AND GAPS

The application of probiotic research to the clinical realm for neurodegenerative diseases is still nascent. Although animal and in vitro studies offer powerful mechanistic-driven results, human data are still scant, especially for the high potency, multi-strain formulation, VSL#3. Yet a handful of clinical trials have investigated either VSL#3 or similar probiotic consortia in cognitive impairment, systemic inflammation, and metabolic irregularities—all related to neurodegenerative pathology.

4.1. Present Human Studies with VSL#3

VSL#3 has also been tested in a few clinical trials for neurological diseases and cognitive decline. In a pilot study in elderly subjects with mild cognitive impairment (MCI), VSL#3 supplementation for 12 weeks led to mild improvements in memory recall and executive function, along with decreased systemic inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-6

(16). Another small study in patients with multiple sclerosis (MS) showed reduced fatigue scores and increased gut microbiota diversity after 2 months of VSL#3 supplementation, indicating a possible adjuvant role in neuroimmune regulation (12). Nonetheless, these studies are constrained by small sample sizes (<60 participants) and a lack of long-term follow-up.

4.2. Related Probiotic Trials and Extrapolation

Despite the fact that there is little direct evidence for the efficacy of VSL#3 in neurodegeneration, results of other probiotic interventions are instructive. For instance, *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* were administered in combined form to decrease anxiety and enhance cognitive performance in patients with stress-related disorders (17). Likewise, multi-strain probiotics have shown positive effects on memory, mood and metabolic parameters in patients with Alzheimer's (18). Given that VSL#3 contains several strains with proven anti-inflammatory and neuromodulatory properties (e.g., *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus plantarum*), it is reasonable to hypothesize that its effects may parallel or even surpass those of simpler formulations. Nevertheless, extrapolation must be done cautiously, as probiotic effects are strain-specific and strongly influenced by host factors.

5. MEDICAL MICROBIOLOGY PERSPECTIVE

5.1. VSL#3 as a Microbial Ecosystem Engineer

The gut microbiome is now generally perceived as a dynamic ecosystem rather than a static aggregate of microorganisms in which stability, diversity, and functional redundancy are critical determinants of the health of the host. Within these boundaries, VSL#3 may be regarded as a probiotic supplement not only as a microbial ecosystem engineer (19). All 8 strains that make up VSL#3 (4 belonging to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and 1 to *Streptococcus*

thermophilus) work synergistically to modulate microbial community composition beyond survival of the administered bacteria own (21). One of VSL#3's key ecological contributions is support of cross-feeding networks, which are essential for gut health. For example, lactobacilli in the preparation produce lactate, which may be used as a substrate by butyrate producing commensals, including *Faecalibacterium prausnitzii* and *Roseburia* spp. The enrichment of these butyrate producers is important, as they play a central role in epithelial health, anti-inflammatory signaling, and production of neuroprotective short-chain fatty acids (SCFA) (22).

In contrast, VSL#3 is also inhibitory to certain opportunistic taxa such as Enterobacteriaceae, and *Clostridium* spp. that are included in the risk of pathogenic overgrowth linked to systemic inflammation and deterioration of neurodegenerative pathology (21). In terms of medical microbiology, these ecological changes are particularly pertinent because patients with neurodegenerative disease tend to have fragile gut microbes with diminished diversity and functional instability. The addition of VSL#3 to such a system may serve to re-establish ecological harmony by means of niche replacement, competitive exclusion, and metabolic complementation. Importantly, this is not a simple restoration to a “healthy” microbiome, but rather the engineering of a more resilient ecosystem that is better aligned with host needs (22).

Therefore, Vsl#3 is a microbiological treatment at the level of the whole ecosystem, which can redirect trajectories of microbial community development and greatly reduce dysbiosis related inflammation. This viewpoint emphasizes the ability of multi-strain probiotics to be considered not only as therapeutic agents, but also as ecological tools within the gut-bridging microbiology, ecology, and clinical neurology (19 - 22).

5.2. Personalized Probiotic Therapy Potential Based on Patient Microbiome Sequencing

The advent of precision medicine has transformed treatment approaches in various fields, including probiotics. Probiotic interventions have traditionally been applied generally and it has been presumed that their beneficial effects are quite similar in all individuals. Nonetheless, microbiome sequencing technologies - especially 16S rRNA profiling, shotgun metagenomics, and metabolomics - have disclosed enormous differences among individuals regarding the composition, metabolic potential, and ecological stability of their gut microbiotas. This kind of variability offers both a challenge and an opportunity for the personalized probiotic treatments, like VSL#3 (23).

From a medical microbiology point of view, VSL#3 is a specially formulated multi-strain product that gives it an edge as a unique candidate for personalized use. Various patients may preferentially respond to different members of the consortium. For those with low Bifidobacterium, the B. breve and B. longum strains may offer the biggest benefits, while those with low levels of lactate-utilizing commensals may benefit the most from the lactate-producing Lactobacillus species in VSL#3. In addition L. paracasei and S. thermophilus still may be of interest, especially when neuroinflammation is considered a major pathogenic factor (24).

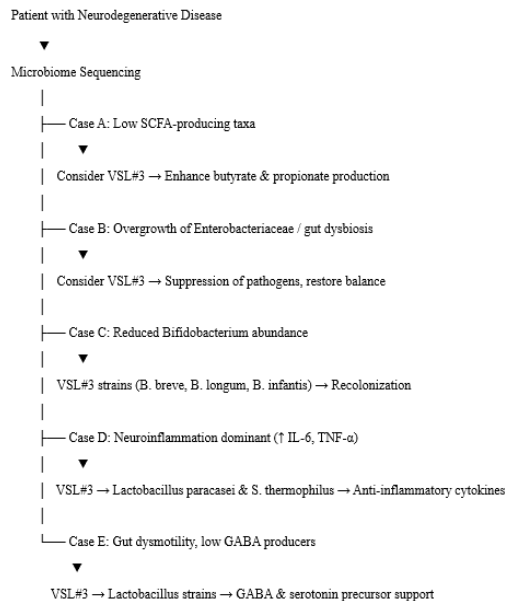
Sequencing-based and thus personalized approaches would therefore enable probiotics to be matched to the specific needs of the patient's microbiota. For instance, the patient with Alzheimer disease whose microbiome suggests a deficit in SCFA-producing taxa might be given VSL#3 as a specific ecological enhancer, supporting metabolic pathways pertinent to neuroprotection. In Parkinson's patients with gut dysmotility, and Enterobacteriaceae overgrowth, VSL#3 could suppress the

expansion of pathogens, restore a loss of commensals, and improve the mucosal barrier function (25).

Crucially, personalization has to extend to considering the host–microbe interactions outside taxonomy. Transcriptomic and metabolomic analyses can offer a more detailed understanding of functional impairments in the gut ecosystem level to inform the use of VSL#3 not simply to replace “missing taxa” in the gut environment but to restore functional networks, representing a move from organism-level therapies towards systems-level ecological engineering (23).

In due course clinical microbiology will need to align more closely with computational biology as machine-learning models begin to predict patient-specific responses to probiotics by linking baseline microbiota configurations with therapeutic outcomes. In this regard, VSL#3 could function as a therapeutic agent and as a model system for the construction of frameworks of personalized probiotic medicine for neurodegenerative diseases (25).

Figure 2. Personalized Application of VSL#3 in Neurodegenerative Diseases



5.3. Laboratory Methods to Study Probiotic-Host Interactions

To decipher VSL#3 for its role in modulating host physiology, classical microbiological methodologies must be combined with complex systems biology. Medical microbiology has been transformed by the advent of multi-omic and in vivo platforms that disclose the complexity of the interaction of probiotics and the host beyond culture-based identification. Principal techniques of this field are summarized below.

5.3.1. Metagenomics

The high throughput sequencing of 16S rRNA genes and metagenomes makes it feasible for researchers to analyze how VSL#3 could influence the structure of gut microbiota. Compared with those traditional culture-based approaches, metagenomics offers taxonomic resolution while detecting low abundant microorganisms and viable but non-culturable microorganisms. Such as *Faecalibacterium prausnitzii* or Enterobacteriaceae in neurodegenerative models upon VSL#3 treatment which further connects changes in microbial composition with immune modulations and production of metabolites (26).

5.3.2. Transcriptomics

RNA sequencing (RNA-seq) makes it possible to analyze how functional gene expression is changed by probiotics. For instance, lactobacilli in VSL#3 increased the expression of SCFA biosynthesis and immune tolerance-related genes. Correspondingly, on the host side, transcriptomics of intestinal epithelial cells or microglia co-cultures treated with VSL#3 demonstrate decreased NF- κ B pathway activity and an enrichment of antioxidant-related gene expression (27).

5.3.3. Metabolomics

Mass spectrometry combined with liquid chromatography (LC-MS) or gas chromatography (GC-MS) as well as nuclear magnetic resonance (NMR) are the most commonly used

methods to profile bioactive metabolites. In terms of neurodegeneration, VSL#3-mediated synthesis of butyrate, indole derivatives and polyamines is modelled, and related to blood brain barrier integrity and neurotransmitter homeostasis (28). It is especially important to apply this strategy to link microbial functions to clinical biomarkers that can be detected.

5.3.4. Gnotobiotic Animal Models

Sterile or gnotobiotic animals colonized by defined microbial consortia offer direct causal proof of probiotic function. With gnotobiotic models, VSL#3 can be administered alone, and effects on behavior, immunology, and neurochemistry can be directly studied sans confounding microbial signals (29). Such models are still considered the gold standard for preclinical microbiome research.

5.3.5. Ex Vivo and In Vitro Systems

State of the art gut on chip models, intestinal organoids, and co-culture systems (e.g., probiotics with epithelial or immune cells) represent ethical feasible, high throughput alternatives. It is possible to investigate strain-specific actions of VSL#3 in these systems in a robust and reproducible manner, such as effects on barrier function, cytokine profiles and metabolite production (30).

Using multi-omics profiling integrated with functional models, they pinpoint host outcomes from the presence of microbes. The application of such techniques unravels how VSL#3 functions as an effective microbiological consortium not only establishing ecological homeostasis in the gut but also delivering mechanistic pathways important in neurodegenerative disease.

5.4. Microbiological Research on the Horizon for VSL#3

Although these techniques are valuable for advancing knowledge, future microbiological research with VSL#3 should point toward precision and personalization, rather than stratification. Emerging multi-omic integration (metagenomics +

metabolomics + transcriptomics) will enable investigators to associate probiotic-mediated microbial changes with host gene expression and metabolic end points in a comprehensive manner (31).

Another exciting frontier is synthetic biology and systems microbiology, in which microbial consortia are modeled to anticipate how VSL#3 strains interact amongst themselves and with host immune pathways. This method may be used to refine dose, strain ratios, and timing of administration for achieving neuroprotective effects (32).

From a translational perspective, personalized medicine frameworks based on patient microbiome sequencing may allow clinicians to select or adjust probiotic formulations like VSL#3 according to the individual's baseline microbial community. Such strategies could overcome inter-individual variability and improve efficacy in neurodegenerative disease interventions (31).

A better focus on longitudinal cohort studies combining microbiological assessment with cognitive and neurological outcomes will be vital. These studies would serve to connect bench microbiology with clinical neurology, thus substantiating the evidence base for VSL#3 as a therapeutic adjunct (32).

6. CHALLENGES AND FUTURE DIRECTIONS

Although evidence continues to grow that supports the potential therapeutic applications of probiotics such as VSL#3 in the context of neurodegeneration, there are significant hurdles to overcome before these interventions could be fully integrated into mainstream clinical care. These challenges exist at the confluence of microbiology, clinical medicine, and translational science, and underscore the importance of future research directions to address scientific and practical voids.

6.1. Strain Viability, Dosing, and Delivery Methods

One key concern is that of strain viability, i.e., live microorganisms being stable during storage, surviving the passage through upper gastrointestinal tract and ultimately colonizing or functioning transiently in the host gut. VSL#3 is available as a multi-strain, high concentration formulation, but uncertainty remains related to the ideal dosing regimens for different patient groups. For instance, it may be that higher doses are required to produce detectable ecological changes in profoundly dysbiotic microbiomes, but such regimens would not be very well tolerated by all patients and might increase the risk of unwanted gastrointestinal effects. In addition, the delivery system capsules, sachets, enteric-coated tablets has a significant impact on the amount of live cells that actually reach the colon. Technological advances (e.g., microencapsulation and freeze-drying with protective excipients) are being actively explored to enhance the uniformity of probiotic delivery in clinical applications (33).

6.2. Need for Long-Term Studies and Standardization of Formulations

Challenges Standardization of Formulations We do not know how long the beneficial effects need to be demonstrated in order to sustain them beyond the intervention period. Yet one other major problem is how to conduct long-term clinical trials. Most probiotic interventions have been evaluated in relatively short-term studies, typically lasting a few weeks to months. However, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's develop over years or even decades, meaning an unanswered question is if probiotics can maintain efficacy or even stably remain integrated into host microbial ecosystems during such long temporal scales. Furthermore, the variability in preparation between manufacturers hinders reproducibility and translation into the clinic. Even if the products have the same strain labels, they may exhibit different biological activities due

to manufacturing differences, such as growth medium or stabilizers used in the production process. The regulatory landscape for probiotics is in flux and in the absence of stringent standardization procedures, we know it will be a challenge to compare results across trials and to formulate evidence-based clinical guidelines (34).

Table 1. Effects of VSL#3 and Related Probiotics on Neurological and Cognitive Outcomes: Summary of Human Studies

Study Type	Findings with VSL#3 / Related Probiotics	Limitations
Alzheimer's (human)	Improved memory scores, reduced inflammation	Small n, short duration
MS (human)	Reduced fatigue, increased microbiome diversity	<50 subjects, pilot only
Other probiotic trials	Improved mood, cognition, reduced anxiety	Different strains, not VSL#3

6.3. Possible synergy with prebiotics: synbiotics strategies

An exciting future perspective of synbiotics is the coencapsulation of probiotics and prebiotics (a class of dietary substrates that are selectively utilized by beneficial microbes). For VSL#3, its constituent strains' survival and activity may be enhanced by co-ingestion with prebiotics such as inulin or resistant starches, and the growth of endogenous commensals may be simultaneously promoted. This could create a synergy with the potential to not only enhance colonization efficiency but also increase the production of neuroprotective metabolites like short-chain fatty acids. In the setting of neurodegenerative disease, where microbial fragility and dietary deficiencies often meld, synbiotic approaches might provide a more effective (or at least more robust) means of re-establishing both ecological steadiness and functional resilience.

6.4. Bridging the Gap between Laboratory Research and Clinical Application

In the end, future prospects will be directed largely by that in-laboratory/clinical-application bridgwork. Animal models and in vitro systems continue to yield valuable mechanistic insights into host–microbe interactions, but those insights must be rigorously validated for translation in human cohorts. The use of systems biology techniques (metabolomics, transcriptomics, metagenomics) in the design of clinical trials will provide novel insights into the interaction of probiotics with host physiology as well as with resident microbiota over time. Moreover, personalized paradigms that customize probiotic applications to individual microbiome signatures of patients will continue to be a major frontier, so that interventions like VSL#3 are not regarded as "one size fits all" treatments but as precision-microbiome medicines.

7. CONCLUSION

Neurodegenerative diseases (NDs) such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) impose an increasing global health burden, largely driven by aging populations. Mounting evidence highlights the gut microbiome as a critical regulator of neuroinflammation, oxidative stress, and neuronal integrity. Among probiotic formulations, VSL#3 a high-potency, multi-strain preparation containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus thermophilus* species-has attracted attention for its capacity to restore microbial balance and modulate host immunity.

Recent findings have linked VSL#3 to neuroprotective outcomes through its effects on the microbiome–gut–brain axis, including enhancement of short-chain fatty acid (SCFA) production, reinforcement of epithelial and blood–brain barrier

integrity, and suppression of pro-inflammatory signaling. Preclinical studies demonstrate reductions in amyloid and α -synuclein aggregation, while early clinical data suggest improvements in cognitive and inflammatory parameters .

From a microbiological standpoint, VSL#3 functions as an ecosystem-based intervention capable of reshaping gut community structure and promoting neuroactive metabolite synthesis. This chapter therefore focuses on Clinical Trials, Mechanistic Insights, and Modern Approaches in Neurodegenerative Diseases, emphasizing how VSL#3 provides a translational framework connecting microbiome modulation with neuroprotection.

REFERENCES

1. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO Expert Consultation Report. 2001.
2. Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (a review). *Microbes and Infection*, 13(10), 806–813.
3. Houser, M. C., & Tansey, M. G. (2017). The gut–brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson’s disease pathogenesis? *NPJ Parkinson’s Disease*, 3(1), 3.
4. Pistollato, F. et al. (2022). Role of microbiota and probiotics in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 869569.
5. Erny, D. et al. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, 18(7), 965–977.
6. Sampson, T. R. et al. (2016). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson’s disease. *Cell*, 167(6), 1469–1480.
7. Kesika, P. et al. (2021). Probiotics as a complementary therapeutic approach in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 667137.
8. Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S. Y., Singh, S. P., & Prakash, S. (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 74(20), 3769–3787. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2550-9>
9. Zhang, T., Gao, G., Kwok, L. Y., & Sun, Z. (2023). Gut microbiome-targeted therapies for Alzheimer's disease. *Gut microbes*, 15(2), 2271613. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2271613>.

10. Kobayashi, Y., Sugahara, H., Shimada, K., Mitsuyama, E., Kuhara, T., Yasuoka, A., Kondo, T., Abe, K., & Xiao, J. Z. (2017). Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 7(1), 13510. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13368-2>.
11. Wang, L., Cui, Y., Han, B., Du, Y., Salewala, K. S., Wang, S., Zhao, W., Zhang, H., Wang, S., Xu, X., Ma, J., Zhu, Y., & Tuo, H. (2025). Gut microbiota and Parkinson's disease. *Chinese medical journal*, 138(3), 289–297. <https://doi.org/10.1097/CM9.00000000000003318>.
12. Tankou, S. K., Regev, K., Healy, B. C., Tjon, E., Laghi, L., Cox, L. M., Kivisäkk, P., Pierre, I. V., Hrishikesh, L., Gandhi, R., Cook, S., Glanz, B., Stankiewicz, J., & Weiner, H. L. (2018). A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 83(6), 1147–1161. <https://doi.org/10.1002/ana.25244>.
13. Salehipour, Z., Haghmorad, D., Sankian, M., Rastin, M., Nosratabadi, R., Soltan Dallal, M. M., Tabasi, N., Khazaei, M., Nasirai, L. R., & Mahmoudi, M. (2017). *Bifidobacterium animalis* in combination with human origin of *Lactobacillus plantarum* ameliorate neuroinflammation in experimental model of multiple sclerosis by altering CD4+ T cell subset balance. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 95, 1535–1548. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.117>.
14. Di Chiano, M., Rocchetti, M. T., Spano, G., Russo, P., Allegretta, C., Milior, G., Gadaleta, R. M., Sallustio, F., Pontrelli, P., Gesualdo, L., Avolio, C., Fiocco, D., & Gallone, A. (2024). Lactobacilli Cell-Free Supernatants Modulate Inflammation and Oxidative Stress in Human Microglia via NRF2-SOD1 Signaling. *Cellular and*

- molecular neurobiology*, 44(1), 60.
<https://doi.org/10.1007/s10571-024-01494-1>.
15. Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L. G., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, 6(263), 263ra158.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>.
 16. Bonfili, L., Cecarini, V., Berardi, S., Scarpona, S., Suchodolski, J. S., Nasuti, C., Fiorini, D., Boarelli, M. C., Rossi, G., & Eleuteri, A. M. (2017). Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Scientific reports*, 7(1), 2426.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02587-2>.
 17. Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., Bisson, J. F., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M., & Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. *The British journal of nutrition*, 105(5), 755–764.
<https://doi.org/10.1017/S0007114510004319>.
 18. Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O. R., Hamidi, G. A., & Salami, M. (2016). Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 256.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00256>.

19. Ouwehand, A., & Vesterlund, S. (2003). Health aspects of probiotics. *IDrugs : the investigational drugs journal*, 6(6), 573–580.
20. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506–514.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
21. Derrien, M., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23(6), 354–366.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>.
22. O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature microbiology*, 2, 17057.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
23. Shapiro, H., Suez, J., & Elinav, E. (2017). Personalized microbiome-based approaches to metabolic syndrome management and prevention. *Journal of diabetes*, 9(3), 226–236. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.1250>.
24. Maldonado-Gómez, M. X., Martínez, I., Bottacini, F., O'Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R. W., & Walter, J. (2016). Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the Human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome. *Cell host & microbe*, 20(4), 515–526.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.001>.

25. Kuntz, T. M., & Gilbert, J. A. (2017). Introducing the Microbiome into Precision Medicine. *Trends in pharmacological sciences*, 38(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.001>.
26. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
27. Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 21(6), 357–365. <https://doi.org/10.1177/0148607197021006357>.
28. Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1262–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>.
29. Faith, J. J., Rey, F. E., O'Donnell, D., Karlsson, M., McNulty, N. P., Kallstrom, G., Goodman, A. L., & Gordon, J. I. (2010). Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice. *The ISME journal*, 4(9), 1094–1098. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.110>.
30. Kim, H. J., & Ingber, D. E. (2013). Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 5(9), 1130–1140. <https://doi.org/10.1039/c3ib40126j>.
31. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human

- microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810.
<https://doi.org/10.1038/nature06244>.
32. Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., Jansson, J. K., Dorrestein, P. C., & Knight, R. (2016). Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*, 535(7610), 94–103.
<https://doi.org/10.1038/nature18850>.
33. Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 605–616.
<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>.
34. Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 1785.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>.

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ALANINDA
AKADEMİK TARTIŞMALAR

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com