



CRISPR Teknolojisi ile Zoonotik Bruselloz Tanısına Genel Bakış

Esra BİLİCİ^{1,a} 

¹Uşak University, Eşme Vocational School, Laborant and Veterinary Health Program, Uşak, Türkiye.

*ORCID: 0000-0001-6636-5975

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:

esra.bilici@usak.edu.tr

Başvuru/Submitted: 18/07/2024

1. Revizyon/1th Revised: 14/10/2024

Kabul/Accepted: 31/10/2024

Yayın/Online Published: 27/12/2024

Atıf/Citation: Bilici, E. (2024). CRISPR Teknolojisi ile Zoonotik Bruselloz Tanısına Genel Bakış. Kafkasya Journal of Health Sciences, 1(2), 42-47.

Doi: [10.5281/zenodo.14454911](https://doi.org/10.5281/zenodo.14454911)

Financial Disclosure: This research received no grant from any funding agency/industry.

Öz

Patojenler, çiftlik hayvanlarında çok çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olur. Hayvan bakımında en iyi uygulamaları ve hayvancılığı etkileyen bulaşıcı hastalıkları durdurmanın ve önlemenin etkili bir yolunu oluşturmak esastır. Hayvancılığın endüstrileşmesi, şüphesiz gıda hayvanı üretiminin verimliliğini artırarak insan refahının iyileştirilmesine katkıda bulunmuştur. Aynı zamanda, doğal çevreyi ve insan toplumunu da büyük ölçüde etkilemiştir. Bu makalede hayvancılığın bakteri kökenli zoonotik enfeksiyonu olan brusellayı ve konak-mikrop etkileşimlerine Crispr teknolojisi ile odaklanıyoruz. Bu derinlemesine birbirine bağlı sorunların altında yatan temel soru, hayvancılıkta enfeksiyonların nasıl daha iyi önleneceği, izleneceği ve yönetileceğidir.

Anahtar Kelimeler: Brucella, CRISPR, zoonoz

Overview of Diagnosis of Zoonotic Brucellosis with CRISPR Technology

Abstract

In livestock, pathogens are responsible for a broad range of infectious illnesses. Establishing best practices for animal care as well as a practical means of halting and preventing infectious diseases that impact cattle are crucial. Because livestock farming has become more industrialized, there is no doubt that this has improved human well-being by boosting the productivity of food animal production. It has also had a significant impact on human society and the environment. This article focuses on host-microbe interactions using Crispr technology and brucellosis, a bacterial zoonotic infection of livestock. The main issue at the heart of all these intricately linked issues is how to better manage, prevent, and track animal illnesses.

Keywords: Brucella, CRISPR, zoonosis

Giriş

İnsanlarda hastalıklara neden olan patojenlerin yaklaşık üçte ikisinin hayvansal kökenli olduğu bilinmektedir (Abebe ve ark., 2020). Dünya nüfusunun hızla artmasıyla birlikte bu hastalıklar, ciddi boyutlara ve hatta ölüme neden olabildikleri için önemli bir halk sağlığı endişesine sahiptir (Ortiz ve ark., 2021). Ayrıca tıbbi tedavi maliyetleri, kaybedilen üretkenlik ve hastalık kontrol önlemleri nedeniyle toplum üzerinde önemli bir ekonomik yük de oluşturmaktadırlar (Elsohaby & Villa., 2023). Son yıllarda, CRISPR/Cas

araçları büyük hayvan yetiştiriciliği alanında devrim yaratmıştır. Sadece seçim süresini ve üretim maliyetlerini azaltmak için değil, aynı zamanda geleneksel yetiştirme yöntemleriyle elde edilmesi zor veya uygun olmayan özellikleri iyileştirmek için de büyük bir umut vadetmektedir (Qiu ve ark., 2019). Hastalık direnci, et üretimi, et kalitesi ve hayvan refahını iyileştirebilecek özellikler gibi değerli özellikler artık CRISPR/Cas araçlarıyla verimli bir şekilde elde edilebilmektedir (Ramankutty ve ark., 2018). Üreme için CRISPR/Cas9 gen düzenlemesinden verimi artırmak için mikrobiyomun kullanılmasına



kadar tarımsal teknolojilerde kaydedilen önemli ilerlemeler, modern tarımı da devrim niteliğinde değiştirmiştir (King, 2017; Zhu ve ark., 2020; Rischer ve ark., 2020). CRISPR/Cas sistemi genetik manipülasyon alanında bir devrime yol açmış ve yelpazesini muazzam bir şekilde genişleterek hayvan biyoteknolojisi araştırmaları ve hayvan yetiştiriciliği için harika araçlar sağlamıştır. Sadece gen düzenleme, baz düzenleme ve birincil düzenleme alanında değil, aynı zamanda CRISPR/Cas sistemine dayalı araçlar kullanılarak transkripsiyonel düzenleme ve transkripsiyon sonrası mühendislik alanında da hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir (Kantor ve ark., 2020; Zeballos & Gaj, 2022).

Hayvancılığın hayvan ve insan sağlığında hayati bir rol oynadığı bir eksen, insanlar ve hayvanlar arasında bulaşan bulaşıcı hastalıklar olan zoonozlardır (Zhang ve ark., 2024). Zoonotik hastalıklar, zoonozlar olarak da bilinmektedir, hayvanlardan insanlara bulaşabilen bulaşıcı hastalıklardır (Tilman ve ark., 2011). Zoonotik bulaşma, hayvanlarla ve çevreleriyle doğrudan veya dolaylı temas yoluyla; hayvansal ürünlerin veya hayvanlar tarafından kirletilmiş suyun tüketilmesiyle; ayrıca böcek vektörü gibi ara türler yoluyla meydana gelebilmektedir (Launay ve ark., 2021). Bu hastalıklara bakteriler, virüsler, parazitler ve mantarlar neden olabilmektedir ve her yaştan ve her geçmişten insanı etkileyebilmektedir (Van ve ark., 2015).

Zoonotik hastalıklar, enfekte hayvanlarla doğrudan temas yoluyla, kirlenmiş yiyecek veya su tüketimi yoluyla veya keneler ve sivrisinekler gibi enfekte eklem bacaklı vektörlerin ısırıkları yoluyla insanlara bulaşabilmektedir (Kilpatrick & Randolph, 2012; Loh ve ark., 2015; Rahman ve ark., 2020). Bazı durumlarda, insanlar zoonotik hastalıkları hayvanlara da bulaştırabilmektedir (Messenger ve ark., 2014). Bruselloz, Brucella'nın neden olduğu esas olarak hayvanlarla ilgilenen profesyonelleri etkileyen bir mesleki hastalık olarak bilinmektedir (EFSA, 2021). Örneğin veterinerler, hayvan yetiştiricileri, hastalığa enfekte hayvanlarla doğrudan temas yoluyla yakalanmaktadır (Yaşar, 2023). Ancak çiğ, pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketilmesi de Brucella enfeksiyonu riski oluşturmaktadır (Schaeffer ve ark., 2021). Avrupa'da, özellikle kuzey ülkelerinde bruselloz, esas olarak endemik bölgelerden gelen gezginler veya göçmenler ve örneğin Orta Doğu'dan mal ve hayvan ithalatı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Katsiolis ve ark., 2022). Bu da küreselleşmenin ve seyahatlerdeki artışın bruselloz bulaşma yollarını değiştirdiğini ve hastalığın görülmediği düşünülen bölgelere girme riskini oluşturduğunu göstermektedir (Georgi ve ark., 2017). Salgın bölgelerinde muazzam ekonomik kayıplara ve kamu yüküne neden olmaktadır. Brucella'nın enfeksiyonunu ve yayılmasını önlemek için erken ve kesin tanı ve enfekte hayvanların zamanında itlaf edilmesi çok önemlidir.

Crispr Teknolojisinin Brusellozda Kullanımı

Son yıllarda, zoonotik hastalık araştırmaları alanında erken teşhis, uygun tedavi, profilaksi ve kontrol açısından ilerlemeler kaydedilmiştir (Sacchini ve ark., 2019). Örneğin, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisinin kullanımı, Ebola ve Zika gibi zoonotik virüslerin tespitinde devrim yaratarak sağlık çalışanlarının bu hastalıkları hızla teşhis etmesini sağlamıştır (Bardenstein ve ark., 2021). Ek olarak, zoonotik hastalıklar için aşı ve tedavilerin geliştirilmesinde önemli adımlar atılmıştır. Son yıllarda, RNA kılavuzlu CRISPR nükleazları nükleik asit tespitinde büyük umut vadetmektedir (Dang ve ark., 2023). Dahası, CRISPR ve makine öğrenimi algoritmaları teknolojisindeki ilerlemeler, zoonotik hastalıklara ilişkin anlayışımızı ilerletmeye ve ayrıca yeni zoonotik hastalıkların ortaya çıkışını tahmin etmeye önemli ölçüde katkıda bulunarak potansiyel olarak daha erken tespit ve önlemeye olanak tanımıştır (Fouskis ve ark., 2018). Zoonotik hastalıkların önlenmesi, halk sağlığı yetkilileri, veterinerler ve diğer profesyoneller arasında koordineli bir çaba gerektirmektedir. Buna gözetim ve erken tespit, hayvanlar için aşılama programları, uygun gıda işleme ve hazırlama ve genel halk için eğitim ve farkındalık kampanyaları gibi önlemler dâhildir. Tek Sağlık yaklaşımı, insan tıbbı, veterinerlik tıbbı, çevre bilimi ve halk sağlığı dâhil olmak üzere farklı alanlardan profesyoneller arasında iş birliğini teşvik etmektedir. Bilgi ve kaynakların paylaşılmasını ve hem insanlarda hem de hayvanlarda zoonotik hastalıkları tespit etmek ve izlemek için entegre gözetim sistemlerinin geliştirilmesini içermektedir (Ghai ve ark., 2022). Taahhüt, zoonotik hastalıkların bulaşmasını önlemek ve kontrol etmek için Tek Sağlık yaklaşımının önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, zoonotik hastalık gözetimini iyileştirmek ve zoonotik hastalıkların ortaya çıkmasının ve yayılmasının itici güçlerini daha iyi anlamak için araştırmayı desteklemek amacıyla üç kuruluş arasında ortak eylemi teşvik etmektedir.

Brusellanın Hayvancılıktaki Risk Faktörleri

Hayvanlarda bruselloz salgınları, insanlarda asemptomatik özellikleri nedeniyle günümüzde giderek daha önemli hale gelmektedir. Tedavi edilmeyen asemptomatik brusellozun takip sonuçları 1990'dan 2021'e kadar 3.610 çalışmada araştırılmıştır (Li ve ark., 2023). Bunlardan 13 çalışmada, 0,5 ila 18 aylık bir takip süresi boyunca vakaların %40,3'ünün asemptomatik kaldığı yer almıştır (Dawood ve ark., 2023). Brucella enfeksiyonunun hayvancılıktaki küresel yükü önemlidir ve dünya çapında 1,4 milyar sığır nüfusunun 300 milyonunun organizma ile enfekte olduğu rapor edilmiştir (de Figueiredo ve ark., 2015). Brucella, üreme endüstrisini ve insan sağlığını tehdit ederek çok büyük ekonomik kayıplara ve sosyal yüklere neden olmaktadır (Godfroid, 2018). Şu anda serolojik tespit, brusellozu teşhis etmenin birincil yöntemidir ve bu yöntem enfekte hayvancılığa özgü

antikorların tespitine dayanır ve dolaylı olarak bu patojenin varlığını ortaya çıkarmaktadır (Lazcka ve ark., 2007). Brucella'ya maruz kalma geçmişi, hayvan bağışıklık sistemi, bağışıklık tepkisi ve ortaya çıkan antikor üretim ve dinamikleri bireyler arasında değişkenlik gösterdiğinden, patojenin varlığını kanıtlayan doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır (Díaz ve ark., 2011). PCR, örnek enfekte mikroorganizmaları tespit etmek için nükleik asitleri çoğaltabilen pratik bir yöntemdir ve PCR yüksek hassasiyet göstermektedir (Wang & Cui, 2020). Ancak, PCR tabanlı yöntemlerin pahalı cihazlar, eşleşen standart reaktifler, yüksek standartlı laboratuvarlara ve profesyonel teknisyenlere bağımlılık ve henüz birleştirilmemiş tanı standartları gibi birçok sınırlaması vardır (Kaden ve ark., 2017). Yüksek bruselloz morbiditesine sahip gelişmekte olan ülkeler ve kırsal alanlar, ülkelerde laboratuvar ekipmanı ve profesyonel teknisyen eksikliği olduğundan PCR'yi kolayca uygulayamamaktadırlar. Dahası, PCR zaman alıcıdır ve yerinde hızlı tarama için uygun değildir (Yang & Rothman, 2004). Toplu olarak, sahada nükleik asitleri analiz etmek için daha hızlı ve daha etkili yöntemlere acilen ihtiyaç duyulmaktadır. RNA tabanlı kılavuz CRISPR/Cas nükleazları, nükleik asitleri yüksek hassasiyet ve hızla tespit etmede büyük bir umut vadetmektedir. Bu sistem, ökaryotlarda gen düzenleme için yaygın olarak uygulanan etkili bir gen düzenleme aracına dönüştürülmüştür (Jinek ve ark., 2012). Son zamanlarda, bilim insanları Cas12a (Cpf1) gibi bazı sınıf II Cas proteinlerinin tek zincirli DNA'yı (ssDNA) kesmede yardımcı aktivite sergilediğini bulmuşlardır ve CRISPR-Cas sistemi nükleik asit deneme alanına uygulanmıştır (Chen ve ark., 2018). Zhang ve diğerleri. 2015 yılında CRISPR-Cas9 sistemine benzer kesme aktivitesine sahip tek bir Cas proteini tarafından aracılık edilen CRISPR-Cpf1 sistemini keşfetmişlerdir (Zetsche ve ark., 2015). Yerinde tespit açısından, CRISPR tespit metodolojileri yeni nesil bir teknoloji olarak görülmektedir. İzotermal amplifikasyonla entegrasyonları, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere bakterilerin ve SARS-CoV-2'nin yüksek hassasiyet ve özgüllükle hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi için etkili bir yol sağlamaktadır (Bhattacharjee ve ark., 2022; Lu ve ark., 2022). CRISPR tespit metodolojisinin yüksek özgüllük, kolaylık ve programlanabilirlik gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (RPA), 37 °C'nin altında CRISPR ile birleştirildiğinde şablon denatürasyonu gerektirmemektedir. CRISPR/Cas sisteminin RPA ile entegrasyonu, hassas aletler gerektirmeyen Brucella yerinde tespiti alanında büyük uygulama beklentilerine sahiptir (Zhang ve ark., 2024).

Sığır Brusellozunun Kontrolüne Yönelik Gelecek Perspektifleri

Brucella'nın neden olduğu enfeksiyonlar, özellikle büyük miktarda hayvancılıkta dünya çapında önemli bir tehdit olarak ortaya çıkmıştır. Hayvancılıkta Brucella enfeksiyonlarını kaynaktan yok etmek ve

kontrol altına almak esas kabul edilmektedir. Ek olarak, daha erken tespit ve zamanında ayıklama da eşit derecede önem arz etmektedir. Sonuç olarak, hayvancılıkta kullanılan tarama doğru, hassas, spesifik, basit ve hızlı olmalıdır. Şu anda, brusellozun teşhis yöntemleri esas olarak aglütinasyon testleri, gerçek zamanlı PCR, ELISA, yarı kantitatif PCR, koloidal altın test şeritleri ve polarize ışık teknolojisini içermektedir. Hiçbir tek tanı yöntemi gerekli duyarlılık ve özgüllük kriterlerini karşılayamamaktadır. Bazı yöntemler, aglütinasyon ve koloidal altın test şeritleri gibi düşük özgüllük ve duyarlılık göstermektedir. Bazıları özel ekipman, karmaşık prosedürler ve profesyonel personel gerektirmektedir. Bu nedenle, gerçek zamanlı PCR gibi bu yöntemler yalnızca profesyonel laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir ve çobanlar tarafından yerinde test edilmeye uygun değildir (Godfroid ve ark., 2010).

Çiftlik hayvanları üzerinde genom düzenlemenin en önemli uygulamalarından biri patojenlere karşı direnci veya toleransı artırmaktır (Richt ve ark., 2007). Çiftlik hayvanı bulaşıcı hastalıkları hayvancılık sektörüne sadece büyük ekonomik kayıplara neden olmakla kalmaz, aynı zamanda insan sağlığını da tehdit eder (Hu ve ark., 2015). Hayvan yetiştiricilerini ve veteriner uzmanlarını rahatsız eden aşılmaz bir endüstriyel sorun olmuştur (Shanthalingam ve ark., 2009). Ancak hastalık direnci karmaşık ve poligenik bir özelliktir; hastalık direnci yetiştirme için geleneksel genetik seçilimi kullanmak çok daha maliyetli, zaman alıcı ve verimsizdir. CRISPR/Cas aracılı gen nakavt/nakavt ve hassas modifikasyon olmak üzere genom düzenleme teknolojisi, hastalığa dirençli hayvan yetiştiriciliğinin verimliliğini büyük ölçüde artırmıştır.

Gen hedefleme, yani CRISPR/Cas9 sistemi gibi spesifik nükleazlar tarafından genlerin yerinde değiştirilmesi, DNA'da çift sarmallı kırıkların nükleazla ilişkili oluşturulması nedeniyle belirli bir lokustaki bir dizinin değiştirilmesi, eklenmesi veya silinmesinin gerçekleştirilebileceği yeni bir stratejiyi temsil etmektedir (Genovese ve ark., 2014). Bu prosedür, homolog rekombinasyon veya homolog olmayan uç birleştirme ile uygulanabilir hale getirilir ve yakın zamana kadar uygulanan basit gen ekleme protokollerine artımlı bir yaklaşımı temsil etmektedir (Karponi ve ark., 2019). CRISPR/Cas9 teknolojisi, hepatit B virüsüne (HBV) karşı klinik düzeyde başarıyla test edilmiş olup, temizlenmesine yardımcı olmuştur (Lin ve ark., 2014). Genlerinin ifadesini ve replikasyonunu inaktive ederek HIV-1'e karşı Mycobacterium tuberculosis, hepatit C virüsü ve herpes simpleks virüsü için çok daha başarılı klinik öncesi uygulamalar bildirilmiştir (Hu ve ark., 2014; Bakhreba ve ark., 2018). Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sistemi, sistemik olarak uygulanan lentiviral vektör aracılığıyla, mikroorganizmanın belirli genetik özelliklerinde lezyonlara neden olacak bir nükleaz genetik bilgisinin tanıtılması yoluyla, brusellaları

parazitledikleri hücrelerde temizleyebilecek bir moleküler tedavinin geliştirilmesi yoluyla, brusellozun ortadan kaldırılması için ortaya çıkan engelleri aşma potansiyeline sahiptir, ancak konak DNA'sına zarar vermeyebilir (Karponi ve ark., 2018).

Sonuç

İnsanlar et, süt ve yumurta formundaki günlük temel gıda ihtiyaçları için çiftlik hayvanlarına bağımlıdır. Bu nedenle, genetik mühendisliği ve transgenез kısa bir zaman diliminde daha önemli kazanımlar ve üretim fırsatı sağlamaktadır. En iyi stratejilerden biri, gıda üretiminin, hayvan sağlığının ve refahının verimliliğini artırmak için çiftlik hayvanlarının genetik olarak değiştirilmesidir. Bulaşıcı hastalıkların hızlı tespiti, sadece insanlarda değil, aynı zamanda çiftlik hayvanlarında da tanı ve enfeksiyon önlemede büyük önem taşımaktadır. Bruselloz, küresel çapta en önemli ciddi zoonotik hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. Ciddiyeti hayvan popülasyonu ile sınırlı değildir, ayrıca hayvan yetiştiricileri için kritik bir mali yükü neden olmaktadır. Sığırlarda genom mühendisliği esas olarak hastalık direnci, alerjenlerin ortadan kaldırılması, ürün üretimi, değerli özelliklerin tanıtılması ve refahları gibi konulara odaklanmaktadır. Genomik ve proteomik yaklaşımlar ve sığır brusellozunun önlenmesi ve kontrolü için gelecekteki perspektifler hakkında güncel bir bakış açısı sağlamaktadır. İzotermal amplifikasyon ve CRISPR/Cas sistemlerini birleştiren nükleik asit tespit yöntemleri, son yıllarda sağlamlık, kolaylık, duyarlılık, özgüllük, uygun fiyat ve yerinde tespit için potansiyel adaptasyon ile ortaya çıkmıştır. CRISPR sistemi tarım alanında hayvanlarda hastalık direnci oluşturmak için güvenilir bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Sonuç olarak, hızlı ilerlemesi mevcut hayvancılık zorluklarını çözmek için birçok yeni konseptin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Esas olarak hayvan sağlığını, özelliklerini, refahını ve bunların çevresel koruma ve insan sağlığı üzerindeki etkileriyle ilişkisini iyileştirmek içindir. CRISPR/Cas9 sisteminin genişletilebilirliği farklı farmakolojik stratejilerin hızlı bir şekilde geliştirilmesini ve test edilmesini sağlayarak diğer genetik mühendisliği yöntemlerine göre daha kısa üretim süreleriyle sonuçlanmaktadır. Veteriner hekimleri, çiftçileri hastalığın tehlikeleri, hayvanlar ve insanlar arasında nasıl bulaşabileceği ve kendilerini nasıl koruyabilecekleri konusunda eğitmelidir. Bu incelemenin önemli bir bölümünde nanoteknoloji ve genetik mühendisliğine dayanan yeni teknik CRISPR tartışılmıştır. Bu yenilik, dünya çapında refahı iyileştirmek için insan amaçlarına ulaşmak amacıyla hayvanlar alemini ve çevreyi daha önce hiç olmadığı kadar şekillendirmeye izin vermektedir.

Kaynaklar

- Abebe, E., Gugsu, G., & Ahmed, M. (2020). Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of tropical medicine*, 2020(1), 4674235.
- Bakhrebah, M. A., Nassar, M. S., Alsuabeyl, M. S., Zaher, W. A., & Meo, S. A. (2018). CRISPR technology: new paradigm to target the infectious disease pathogens. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 22(11):3448-3452.
- Bardenstein, S., Gibbs, R. E., Yagel, Y., Motro, Y., & Moran-Gilad, J. (2021). Brucellosis outbreak traced to commercially sold camel milk through whole-genome sequencing, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 27(6), 1728-1731.
- Bhattacharjee, R., Nandi, A., Mitra, P., Saha, K., Patel, P., Jha, E., ... & Suar, M. (2022). Theragnostic application of nanoparticle and CRISPR against food-borne multi-drug resistant pathogens. *Materials Today Bio*, 15, 100291.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436-439.
- Dang, S., Sui, H., Zhang, S., Wu, D., Chen, Z., Zhai, J., & Bai, M. (2023). CRISPR-Cas12a test strip (CRISPR/CAST) package: In-situ detection of *Brucella* from infected livestock. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 202.
- Dawood, A. S., Elrashedy, A., Nayel, M., Salama, A., Guo, A., Zhao, G., ... & Luo, W. (2023). *Brucellae* as resilient intracellular pathogens: Epidemiology, host-pathogen interaction, recent genomics and proteomics approaches, and future perspectives. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1255239.
- de Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-Host Interactions. *The American journal of pathology*, 185(6), 1505-1517.
- Díaz, R., Casanova, A., Ariza, J., & Moriyon, I. (2011). The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLOS Neglected tropical diseases*, 5(4), e950.
- EFSA ECDC. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19(2):e06406.
- Elsohaby, I., & Villa, L. (2023). Zoonotic diseases: understanding the risks and mitigating the threats. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 186.
- Fouskis, I., Sandalakis, V., Christidou, A., Tsatsaris, A., Tzanakis, N., Tselentis, Y., & Psaroulaki, A. (2018). The epidemiology of Brucellosis in Greece, 2007-2012: a 'One Health' approach. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(3), 124-135.
- Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Di Tomaso, T., Firrito, C., Calabria, A., ... & Naldini, L. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 510(7504), 235-240.
- Georgi, E., Walter, M. C., Pfalzgraf, M. T., Northoff, B. H., Holdt, L. M., Scholz, H. C., ... & Antwerpen, M. H. (2017). Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PLoS one*, 12(4), e0175425.
- Ghai, R. R., Wallace, R. M., Kile, J. C., Shoemaker, T. R., Vieira, A. R., Negron, M. E., ... & Barton Behravesh, C. (2022). A generalizable one health framework for the control of zoonotic diseases. *Scientific reports*, 12(1), 8588.
- Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal*, 51(4), 296-305.

- Godfroid, J., (2018). *Brucella* spp. at the Wildlife-Livestock Interface: An Evolutionary Trajectory through a Livestock-to-Wildlife "Host Jump"?. *Veterinary Science Journal*, 5(3):81.
- Hu, S., Qiao, J., Fu, Q., Chen, C., Ni, W., Wujiayu, S., Ma, S., Zhang, H., Sheng, J., Wang, P., et al. (2015). Transgenic shRNA pigs reduce susceptibility to foot and mouth disease virus infection. *Elife*. 4:e06951.
- Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., et al. (2014). RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(31):11461-11466.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096):816-821.
- Kaden, R., Ferrari, S., Alm, E., Wahab, T., (2017). A novel real-time PCR assay for specific detection of *Brucella melitensis*. *BMC Infectious Diseases*. 17(1):230.
- Kantor, A., McClements, M.E., MacLaren, R.E., (2020). CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *International Journal of Molecular Sciences*. 21:6240.
- Karponi, G., Kritas, S., Petridou, E., Papanikolaou, E., (2018). Efficient transduction and expansion of ovine macrophages for gene therapy implementations. *Veterinary Science Journal*. 5(2):57.
- Karponi, G., Kritas, S.K., Papadopoulou, G., Akrioti, E.K., Papanikolaou, E., Petridou, E., (2019). Development of a CRISPR/Cas9 system against ruminant animal brucellosis. *BMC Veterinary Research*. 27;15(1):422.
- Katsiolis, A., Papanikolaou, E., Stournara, A., Giakkoupi, P., Papadogiannakis, E., Zdragas, A., et al. (2022). Molecular detection of *Brucella* spp. in ruminant herds in Greece. *Tropical Animal Health and Production*. 54(3):173.
- Kilpatrick, A.M., Randolph, S.E., (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*. 380(9857):1946-55.
- King, A., (2017). Technology: the future of agriculture. *Nature*. 544:S21-S23.
- Launay, A., Wu, C.J., Chiang, A., Youn, J.H., Khil, P.P., Dekker, J.P., (2021). In vivo evolution of a zoonotic bacterial pathogen emerging in an immunocompromised human host. *Nature Communications*. 12:4495.
- Lazcka, O., Del Campo, F.J., Muñoz, F.X., (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*. 22(7):1205-1217.
- Li, F., Du, L., Zhen, H., et al. (2023). Follow-up outcomes of asymptomatic brucellosis: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes Infections*. 12.
- Lin, S.R., Yang, H.C., Kuo, Y.T., Liu, C.J., Yang, T.Y., Sung, K.C., et al. (2014). The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 3:e186.
- Loh, E.H., Zambrana-Torrel, C., Olival, K.J., Bogich, T.L., Johnson, C.K., Mazet, J.A., Karesh, W., Daszak, P., (2015). Targeting transmission pathways for emerging zoonotic disease surveillance and control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 15(7):432-7.
- Lu, S., Tong, X., Han, Y., Zhang, K., Zhang, Y., Chen, Q., Duan, J., Lei, X., Huang, M., Qiu, Y., et al. (2022). Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a. *Nature Biomedical Engineering*. 6:286-297.
- Messenger, A.M., Barnes, A.N., Gray, G.C., (2014). Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PLoS ONE*. 9(2):e89055.
- Ortiz, A.M.D., Outhwaite, C.L., Dalin, C., Newbold, T., (2021). A review of the interactions between biodiversity, agriculture, climate change, and international trade: research and policy priorities. *One Earth*. 4:88-101.
- Qiu, Z., Egidi, E., Liu, H., Kaur, S., Singh, B.K., (2019). New frontiers in agriculture productivity: optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnology Advances*. 37.
- Rahman, M., Sobur, M., Islam, M., Levy, S., Hossain, M., El Zowalaty, M.E., Rahman, A., Ashour, H.M., (2020). Zoonotic diseases: etiology, impact, and control. *Microorganisms*. 8(9):1405.
- Ramankutty, N., Mehrabi, Z., Waha, K., Jarvis, L., Kremen, C., Herrero, M., Rieseberg, L.H., (2018). Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. *Annual Review of Plant Biology*. 69:789-815.
- Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., et al. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology*. 25:132-138.
- Rischer, H., Szilvay, G.R., Oksman-Caldentey, K.M., (2020). Cellular agriculture – industrial biotechnology for food and materials. *Current Opinion in Biotechnology*. 61:128-134.
- Sacchini, L., Wahab, T., Di Giannatale, E., Zilli, K., Abass, A., Garofolo, G., et al. (2019). Whole genome sequencing for tracing Geographical Origin of Imported cases of human brucellosis in Sweden. *Microorganisms*. 7(10).
- Schaeffer, J., Revilla-Fernandez, S., Hofer, E., Posch, R., Stoeger, A., Leth, C., et al. (2021). Tracking the origin of austrian human brucellosis cases using whole genome sequencing. *Frontiers in Medicine (Lausanne)* 8:635547.
- Shanthalingam, S., Srikumaran, S., (2009). Intact signal peptide of CD18, the beta-subunit of beta2-integrins, renders ruminants susceptible to Mannheimia haemolytica leukotoxin. *National Academy of Sciences - PNAS*. 106:15448-15453.
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., Befort, B.L., (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108:20260-20264.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112:5649-5654.
- Wang, Z., Cui, W.G., (2020). CRISPR Cas system for biomedical diagnostic platforms. *View*. 1(3):1-22.
- Yang, S., Rothman, R.E., (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infectious Diseases*. 4(6):337-348.
- Yaşar, Ü., (2023). Clinical and Laboratory Observation of Brucellosis: Ardahan. *MAS Journal of Applied Sciences*, 8(4), 807-812. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8406548>
- Zeballos, C.M., Gaj, T., (2021). Next-Generation CRISPR Technologies and Their Applications in Gene and Cell Therapy. *Trends Biotechnology*. 39:692-705.
- Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., et al. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. ;163(3):759-771.
- Zhang, T., Nickerson, R., Zhang, W., Peng, X., Shang, Y., Zhou, Y., Luo, Q., Wen, G., Cheng, Z., (2024). The impacts of animal agriculture on One Health-Bacterial zoonosis, antimicrobial resistance, and beyond. *One Health*. 8;18:100748.
- Zhang, Y., Lyu, Y., Wang, D., Feng, M., Shen, S., Zhu, L., Pan, C., Zai, X., Wang, S., Guo, Y., Yu, S., Gong, X., Chen, Q., Wang, H., Wang, Y., Liu, X., (2024). Rapid Identification of *Brucella* Genus and Species In Silico and On-Site Using Novel Probes with CRISPR/Cas12a. *Microorganisms*. 17;12(5):1018.
- Zhu, H., Li, C., Gao, C., (2020). Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 21:661-677.