

BÖLÜM 43

ZOONOTİK ENFEKSİYONLARIN TANISI VE KONTROLÜNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI

Emel AZAK¹
Aynur KARADENİZLİ²

“Knowing is not enough; we must apply. Willing is not enough; we must do.” -Goethe

Giriş

Zoonozlar, omurgalı hayvanlar ve insanlar arasında doğal yollarla bulaşabilen enfeksiyonlardır ¹. Tüm dünyada, insanlarda ortaya çıkan bulaşıcı hastalıkların yaklaşık %60-70'i zoonozdur ve büyük bir kısmı yaban hayatından kaynaklanmaktadır ². Zoonotik hastalık spektrumu, deri döküntülerinden veya hafif, kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlardan, ciddi, yaşamı tehdit eden hastalık tablolarına kadar değişkenlik gösterebilir. Zoonotik etkenlerin bulaşı; enfekte bir hayvanın tükürük, kan, idrar, mukus, dışkı veya diğer vücut sıvıları ile direkt temasla ya da kontamine yüzey, ortamlar ve gıdalar aracılığıyla indirekt olarak gerçekleşir. Bazı zoonoz etkenleri; kene, sivrisinek veya pire, vb. vektörlerle ya da su ve yiyeceklerle bulaşabilir ³.

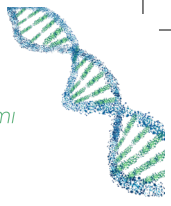
Zoonotik Patojenler

Bakteriyel (*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Borelia burgdorferi*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7, stafilokoklar, *Campylobacter* spp., vb.), viral [Rabies virüsü, şiddetli akut solunum yolu sendromu (severe acute respiratory syndrome, SARS), Orta Doğu solunum sendromu (Middle East respiratory syndrome, MERS), Avian Influenza, Ebola ve Zika virüsü, paramyxovirus, Influenza A, West Nile virüsü, Hantavirüs, Arboviridae ensefalit virüsleri, vb.], parazitik (*Trichinella* spp., *Baylisascaris procyonis*, *Ancylostoma braziliense*, vb.), mikotik (*Microsporium* spp., *Trichophyton* spp., *Blastomyces dermatitidis*, vb.), protozoal (*Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Giardia lamblia* vb), klamidyal ve riketsiyal mikroorganizmalar (*Ehrlichia*, vb.) olabilir ⁴⁻⁷.

Zoonoz etkenlerinin tanısında kültür ve mikroskopik incelemelerin yanı sıra “immunofluorescence assay”, kompleman fiksasyon, direkt aglütinasyon testi, indirekt hemaglütinasyon testi, immünodifüzyon, “enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)” gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır⁶. Bunların dışında günümüzde zoonozla-

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., emelazak@yahoo.com

² Prof. Dr., Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., aynuryk2010@yahoo.com



ta virüs saptanabilir. Üç haftaya kadar devam edebilir. Viral yük hastalık şiddetinin bir belirteci olabilir. Örn; alınan örnekte 10^{10} kopya/mL virüs varlığı kötü prognozun habercisi olarak kabul edilir ⁶⁷.

Zoonozların Kontrolü ve Tek Sağlık Yaklaşımı

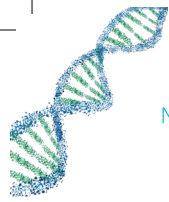
Zoonozların insan nüfusu üzerindeki yıkıcı etkisi, yaşamakta olan COVID-19 pandemisinden açıkça görülmektedir. SARS, MERS, *Avian Influenza*, *Ebola* ve *Zika* virüsü gibi salgınlarının en önemli kaynağının yaban hayatı olduğu, etkenlerin ise hayvanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaygın endemik hastalıklarla karşılaştırıldığında, salgınlarda hastalığın seyri nispeten sınırlı olabilir, ancak beklenmedik doğası, yüksek vaka ölüm oranı, kaynakların ve bulaşma biçimlerinin belirsizliği ve tıbbi/tıbbi olmayan karşı önlemlerin yetersizliği nedeniyle bu hastalık etkenlerini küresel bir tehdit haline getirmektedir. Bu durum hastalığın yayılma korkusuna, seyahat kısıtlamalarına, yerel ve küresel düzeyde ciddi sosyo-ekonomik bozulmalara neden olabilir ⁵.

Zoonotik hastalıklar gibi bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrolü için uluslararası kuruluşlar ve araştırmacılar; insan, hayvan ve çevre arasındaki ilişkiyi tanımlamış ve "Tek Sağlık Yaklaşımı" olarak bilinen kavramı benimsemiştir. "Tek sağlık yaklaşımı" zoonozların önlenmesi ve kontrolü ile doğrudan bağlantılıdır. Zoonozları önlemek ve kontrol etmek için alınması gereken bazı önlemler tanımlanmıştır. Bunlar; *i*) insan ve hayvan sağlığı kurumlarının iyileştirilmesi için "Zoonotik Hastalık Birimi" kurmak; *ii*) "Zoonotik Hastalık Birimi" ile ilgili ulusal strateji geliştirmek; *iii*) zoonotik hastalık araştırmalarına öncelik vermek için çok sektörlü araştırmacılar ve ilgili personel arasında bağlantıyı kurmak ve liderlik yapmak; *iv*) diğer ülkelerden işbirlikçilerle veteriner halk sağlığı politikalarının benimsenmesi ve yaygınlaştırılması; ve *v*) düzenli sürveyans, epidemiyolojik uygulamalar ve laboratuvar teşhisi yoluyla ortaya çıkan ve yeniden ortaya çıkan zoonotik hastalıkları düzenli olarak (2-5 yıl) takip etmektir ^{4,45}. Etkili kontrol önlemlerinin

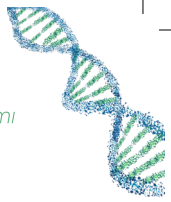
alınabilmesi için zoonozları erken ve doğru bir şekilde tespit etmek ve tek sağlık yaklaşımının tüm bileşenlerini hedefleyen güçlü aktif sürveyans sistemi uygulanmalıdır. Hayvanlar, insanlar ve çevre arasındaki güçlü ilişkiden dolayı; patojenlerin bulaşmasında kritik müdahale adımlarını belirlemek için tek sağlık yaklaşımına öncelik verilmelidir.

Kaynaklar

1. World Health Organization. Zoonoses. Technical report series no. 169. Geneva, 1959. WHO. Zoonoses. July 28, 2020. <http://www.who.int/zoonoses/diseases/en/> (accessed Feb 21, 2020).
2. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;21;451(7181): 990.
3. Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, Levy S, Hossain MJ, El Zowalaty ME, et al. Zoonotic diseases: etiology, impact, and control. *Microorganisms* 2020;8(9):1405.
4. Leal Filho W, Ternova L, Parasnis SA, Kovaleva M, Nagy GJ. Climate Change and Zoonoses: A review of concepts, definitions, and bibliometrics. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(2):893.
5. Sikkema RS, Koopmans MPG. Preparing for emerging zoonotic viruses, pp: 256-266. In: Bamford D, Zuckerman M. *Encyclopedia of Virology*. 2021, 4th ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
6. Cuervo-Soto, LI, López-Pazos, SA, Batista-García, R. Metagenomics and diagnosis of zoonotic diseases. In: Quiroz-Castañeda, R. E, editor. *Farm animals diseases, recent omic trends and new strategies of treatment*. London: IntechOpen; 2018 [cited 2022 Jul 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/58730> doi: 10.5772/intechopen.72634
7. Institute of Medicine (US) Forum on Emerging Infections; Burroughs T, Knobler S, Lederberg J, editors. *The Emergence of Zoonotic Diseases: Understanding the impact on animal and human health: Workshop summary*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98100/> doi: 10.17226/10338
8. Mohanad Sami Saleh AL-Kubaisi. *Molecular techniques for the diagnosis of zoonotic parasitic diseases (dissertation)*. Ministry of higher education and scientific research University of Baghdad: College of Veterinary Medicine; 2017.
9. Nolte, FS and Caliendo AM. *Molecular Microbiology*, pp:234-256. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 6th ed. ASM Press, Washington, DC.
10. Speers DJ. *Clinical applications of molecular biology for infectious diseases*. *Clin Biochem Rev* 2006;27(1):39.
11. Malhotra S, Sharma S, Bhatia NJK, Kumar P, Hans C. *Molecular methods in microbiology and their clinical application*. *J Mol Genet Med* 2014;4: 142.
12. Schwarz NG, Loderstaedt U, Hahn A, Hinz R, Zautner AE, Eibach D, et al. *Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs)*. *Acta Trop* 2017;165:



- 40-65.
13. Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet* 2012;380(9857): 1936-45.
 14. Moe CL. What are the criteria for determining whether a disease is zoonotic and water related? pp: 27-46. In: Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr, R, et al. *Waterborne Zoonoses: Identification, causes and control*. 2004, World Health Organization, IWA Publishing, London, UK.
 15. Delibato E, Rodriguez-Lazaro D, Gianfranceschi M, De Cesare A, Comin D, Gattuso A, et al. European validation of real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in pork meat. *Int J Food Microbiol* 2014;184: 134-138.
 16. Gianfranceschi MV, Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M, González-García P, Comin D, Gattuso A, et al. European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Int J Food Microbiol* 2014;184: 128-133.
 17. Cronquist AB, Mody RK, Atkinson R, Besser J, Tobin D'Angelo M, Hurd S, et al. Impacts of culture-independent diagnostic practices on public health surveillance for bacterial enteric pathogens. *Clin Infect Dis* 2012;54 (Suppl 5): 432-439.
 18. Weese JS. Molecular diagnostic assays for the detection and control of zoonotic diseases, pp: 275-284. In: Persing DH, Tenover FC, Hayden RT, Ieven M, Miller MB et al. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2016, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
 19. Forbes BA, Sham DF, Weissfeld AS. Nucleic acid based analytic methods for microbial identification and characterisation, pp: 1069-1082. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 2002, 12th ed. Mosby Inc, Philadelphia, USA.
 20. Cassidy A, Parle-McDermott A and O'Kennedy R (2021). Virus detection: A review of the current and emerging molecular and immunological methods. *Front Mol Biosci* 2021;20;8: 637559.
 21. Li C, Jaentschke B, Song Y, Wang J, Cyr TD, Van Domselaar G, et al. A simple slot blot for the detection of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins using universal antibodies targeting the fusion peptide. *Nat Protoc* 2010;5(1): 14-9.
 22. Bastos CR, Mathias LA, Jusi MMG, Santos RFD, Silva GCPD, André MR, et al. Evaluation of dot-blot test for serological diagnosis of bovine Brucellosis. *Braz J Microbiol* 2018;49(3): 564-568.
 23. Raja V, Prasad M, Bothammal P, Saranya P, Sumaiya K, Akino Mercy CS, et al. Silver enhanced nano-gold dot blot immunoassay for leptospirosis. *J Microbiol Methods* 2019;156: 20-22.
 24. Vizzini P, Manzano M, Farre C, Meylheuc T, Chaix C, Ramarao N, et al. Highly sensitive detection of *Campylobacter* spp. In chicken meat using a silica nanoparticle enhanced dot blot DNA biosensor. *Biosens Bioelectron* 2021;1;171: 112689.
 25. Abbasi I, Branzburg A, Campos-Ponce M, Abdel Hafez SK, Raoul F, Craig PS, et al. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(3): 324-30.
 26. Shah J, Poruri A, Mark O, Khadilka U, Mohring F, Moon RW, et al. A dual colour fluorescence in situ hybridization (FISH) assay for identifying the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi* with a potential application for the specific diagnosis of *knowlesi* malaria in peripheral-level laboratories of Southeast Asia. *Parasit Vectors* 2017;10(1): 342.
 27. Alagappan A, Tujula NA, Power M, Ferguson CM, Bergquist PL, Ferrari BC. Development of fluorescent in situ hybridization for *Cryptosporidium* detection reveals zoonotic and anthroponotic transmission of sporadic cryptosporidiosis in Sydney. *J Microbiol Methods* 2008;75(3): 535-39.
 28. Rohde A, Hammerl JA, Al Dahouk S. Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence in situ hybridization. *Food Control* 2016;69: 297-305.
 29. Reta DH, Tessema TS, Ashenef AS, Desta AF, Labisso WL, Gizaw ST, et al. Molecular and immunological diagnostic techniques of medical viruses. *Int J Microbiol* 2020;2020: 8832728.
 30. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(4): 716-47.
 31. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999;37(7): 2215-22.
 32. Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(19): 6166-71.
 33. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38(11): 4121-4125.
 34. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(9): 1026-30.
 35. Gasser, RB. Molecular tools—advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 2006;136(2): 69-89.
 36. Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(2): 87-91.
 37. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12): E63.
 38. Padzil F, Mariatulqabtiyah AR, Tan WS, Ho KL, Isa NM, Lau HY, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) as a promising point-of-care diagnostic strategy in Avian Virus research. *Animals (Basel)* 2021;12(1):76.
 39. Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, Luo J, Barany F, Batt CA. Ligase chain reaction (LCR)—overview and applications. *PCR Methods Appl* 1994;3(4): 51-64.
 40. Gibriel AA, Adel O. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assays: Detection and applications. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2017;773: 66-90.
 41. Ganbaatar U, Liu C. CRISPR-based COVID-19 testing: toward next-generation point-of-care diagnostics. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11: 663949.
 42. Puig-Serra P, Casado-Rosas MC, Martinez-Lage M, Olalla-Sastre B, Alonso-Yanez A, Torres-Ruiz R, et al. CRISPR



- approaches for the diagnosis of human diseases. *Int J Mol Sci* 2022;23(3): 1757.
43. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. Rapid, low-cost detection of Zika Virus using programmable biomolecular components. *Cell* 2016;165(5): 1255-1266.
 44. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, Vasilyeva I, Glebe D, Kostyushev D, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods* 2022;203: 431.
 45. İnci A, Doğanay M, Özdarendeli A, Düzlü Ö, Yıldırım A. Türkiye'de zoonotik hastalıklara genel bakış: Tek sağlık konsepti ve gelecek tehditler. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2018;42(1): 39-80.
 46. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/zoonotik-vektorel-hastaliklar-db/daire-baskanligi/eylem_plani/Zoonotik-Hastaliklar_Eyem_Pani.
 47. Garcell HG, Garcia EG, Pueyo PV, Martín IR, Arias AV, Alfonso Serrano RN. Outbreaks of Brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk. *J Infect Public Health* 2016;9(4): 523-527.
 48. CastanˆoMJ, NavarroE, SoleraJ. Brucellosis. Reference module in biomedical sciences. *Int Encyclo Publ Health* 2017;2: 281.
 49. Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin Microbiol Rev* 2019;33(1): e00073.
 50. Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, et al. Bovine brucellosis - a comprehensive review. *Vet Q* 2021;41(1): 61.
 51. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4(1): 115-123.
 52. Dal T, Kara SS, Cikman A, Balkan CE, Acikgoz ZC, Zeybek H, et al. Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis. *J Infect Public Health* 2019;12(3): 337-342.
 53. Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(8): 4753-4759.
 54. Qin L, Nan W, Wang Y, Zhang Y, Tan P, Chen Y, et al. A novel approach for detection of brucella using a real-time recombinase polymerase amplification assay. *Mol Cell Probes* 2019;48: 101451.
 55. Turnbull PC. Definitive identification of *Bacillus anthracis*--a review. *J Appl Microbiol* 1999;87(2): 237-240.
 56. Zasada AA. Detection and Identification of *Bacillus anthracis*: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. *Microorganisms* 2020;16;8(1): 125.
 57. Karadenizli A, Gurcan S, Kolayli F, Vahaboglu H. Outbreak of tularaemia in Golcuk, Turkey in 2005: report of 5 cases and an overview of the literature from Turkey. *Scand J Infect Dis* 2005;37(10): 712-716.
 58. World Health Organization. (2007). WHO Guidelines on tularaemia. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43793>
 59. T.C. Sağlık Bakanlığı Tularaemi Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara, 2011.
 60. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. **Detection of** *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularaemia by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35(5): 1045-48.
 61. Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41(12): 5491-5492.
 62. Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, Elkins KL, Sjöstedt A, Shipley M, et al. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62(2): 310-318.
 63. Simşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularaemia cases were not previously reported. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(9): 2353-2357.
 64. Koehler JW, Delp KL, Hall AT, Olschner SP, Kearney BJ, Garrison AR, et al. Sequence optimized real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. *Am J Trop Med Hyg* 2018;98(1): 211-215.
 65. Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, Cook N, Bruce C, Dowall SD, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012;12(9): 786-93.
 66. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004;64(3): 145-60.
 67. Mazzola LT, Kelly-Cirino C. Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a widespread tickborne disease. *BMJ Glob Health* 2019;4(Suppl 2): e001114.