

SAĞLIK BİLİMLERİ

ALANINDA AKADEMİK ÇALIŞMALAR

CİLT 2

EDİTÖR:

Prof. Dr. Cem EVEREKLİOĞLU

İmtiyaz Sahibi / Publisher • Yaşar Hız
Genel Yayın Yönetmeni / Editor in Chief • Eda Altunel
Editör / Editor • Prof. Dr. Cem Evereklioglu
Kapak & İç Tasarım / Cover & Interior Design • Karaf Ajans

Birinci Basım / First Edition • © Haziran 2020

ISBN • 978-625-7858-07-6

© copyright

Bu kitabın yayın hakkı Gece Kitaplığı'na aittir.

Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin
almadan hiçbir yolla çoğaltılamaz.

The right to publish this book belongs to Gece Kitaplığı.
Citation can not be shown without the source, reproduced in any way
without permission.

Gece Kitaplığı / Gece Publishing

Türkiye Adres / Turkey Address: Kızılay Mah. Fevzi Çakmak 1. Sokak

Ümit Apt. No: 22/A Çankaya / Ankara / TR

Telefon / Phone: +90 312 384 80 40

web: www.gecekitapligi.com

e-mail: gecekitapligi@gmail.com



Baskı & Cilt / Printing & Volume

Sertifika / Certificate No: 47083

Sağlık Bilimleri Alanında Akademik alışmalar - II

Cilt 2

Editör

Prof. Dr. Cem Evereklioglu¹

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye Elektronik
Posta: evereklioglu@erciyes.edu.tr



Bölüm 48

COVID-19 TANISINDA KULLANILAN MOLEKÜLER ANALİZ YÖNTEMLERİ

Çağdaş AKTAN¹

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ad, cagdasaktan@beykent.edu.tr

GİRİŞ

Aralık 2019’ dan bu yana, Çin’ in Wuhan şehrinde yeni bir tip koronavirüsün neden olduğu büyük pnömoni salgını ortaya çıkmıştır. 2019-nCov olarak adlandırılan bu hastalığın adı daha sonra COVID-19 olarak kabul edilmiştir. Hastalığa neden olan SARS-CoV-2 virüsünün daha önceki yıllarda görülen SARS-CoV ile ~% 79.5 genomik sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır. SARS-CoV-2 virüsünün genomu 5’ transkripsiyona uğramamış bölge (5’-UTR), replikaz kompleks (Orflab), spike (S), E, M, N gen bölgeleri, 3’ transkripsiyona uğramamış bölge (3’-UTR) ve tanımlanamamış yapısal olmayan açık okuma çerçevelerinden oluşmaktadır. Virüsün insan hücrelerine girişinin SARS-CoV ile benzer şekilde Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim II (ACE2) reseptörü ile gerçekleştiği gösterilmiştir (A.E. Gorbalenya, 2020; Guan et al., 2020; Jiang, Du, & Shi, 2020; A. Wu et al., 2020; Zhou et al., 2020). Epidemik veriler virüsün insandan insana güçlü bir bulaşma yeteneğine sahip olduğunu, öksürme, hapşırma yoluyla üretilen damlacıklar ile yayıldığını, doğrudan temaslar ve diğer olası bulaşma yolları (örn. Dışkı-ağız yoluyla) ile bulaştığını da göstermektedir (Guan et al., 2020).

Tüm dünyada SARS-CoV-2 virüsü için uygun tedavi seçenekleri arayışlarına girilmesine rağmen, henüz etkili bir antiviral ilaç ve aşı tedavisi geliştirilememiştir. Bununla birlikte bu virüsün daha fazla yayılmasını önleyebilmek amacıyla hızlı ve güvenilir tanı testlerinin geliştirilmesi de önceliği oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü de bu eksikliğin giderilmesi için tüm ülkelere daha fazla test kiti üretimi için mesajlar vermektedir. Bununla birlikte dünya çapında birçok hükümet, çeşitli kurumlar, biyoteknoloji şirketleri, Covid-19 tanısında çok sayıda test kiti ve reaktif üretilmesi için çeşitli teşviklerde bulunmaktadır.

SARS-CoV-2 Testleri

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC-<https://www.cdc.gov/>) tarafından COVID-19 hastalarını tanımlamak için önerilen mevcut tanı stratejisi, SARS-CoV-2’ ye özgü hedeflenen bir veya birkaç gen bölgesinin varlığını değerlendirmek için solunum yolundan alınan örnekleri test etmek şeklindedir. SARS-CoV-2 testi için nazofaringeal / orofaringeal sürüntü örnekleri kabul edilebilmektedir (Corman et al., 2020; Zou et al., 2020). Hastalığın evresine göre bu bölgelerden alınacak örneklerdeki virüs varlığı da değişkenlik gösterebilmektedir (X. Wang et al., 2020). Numune alınımında kullanılacak kalsiyum aljinat, ahşap veya pamuk içeren çubuklar yapılacak olan PCR testinde inhibe edici etkiler yaratacağından, bunlar yerine alüminyum veya plastik olanları tercih edilmektedir. Bununla birlikte bu çubuklarla alınan numunelerdeki viral nükleik asidin bozunmasını önlemek için numune alındıktan hemen sonra taşıma besiyerine aktarıl-

malıdır. Balgam, endotrakeal aspiratlar ve bronkoalveoler lavajdan alınan numuneler de işlenmek üzere doğrudan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilebilir ve üst solunum yolu numunelerinden daha büyük hassasiyete sahip olabilmektedirler (W. Wang et al., 2020). Numune toplandıktan sonra, BSL-2 veya eşdeğer düzeydeki biyogüvenlik kabini içerisinde RNA'nın izolasyonu, sonrasında da hedef gen bölgesinin tespiti için qRT-PCR işlemi yapılmaktadır.

Virüsün semptomatik ve asemptomatik olarak ilerlemesinden dolayı geliştirilecek tanı testleri sadece klinik seyir için değil, aynı zamanda toplumda hastalığın izlenmesi için de önemli bir araç olarak kullanılabilecektir.

MOLEKÜLER TESTLER

Konvansiyonel PCR

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), DNA üzerindeki istenilen gen bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan enzimatik bir yöntemdir. Geniş uygulama yelpazesi, yüksek hassasiyet ve dizi özgüllüğü sayesinde PCR temelli yöntem koronavirüslerin saptanmasında rutin ve güvenilir bir teknik haline gelmiştir (Balboni, Gallina, Palladini, Prosperi, & Battilani, 2012). Koronavirüs RNA'sı öncelikli olarak ters transkripsiyonla cDNA'ya dönüştürülerek PCR gerçekleştirilmekte, ardından PCR ürünü spesifik yöntemler ve cihazlar ile analiz edilmektedir. PCR'den sonra jel elektroforezi ve dizileme yöntemleri koronavirüslerin saptanması için sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak zaman alıcı ve yüksek maliyetli olmaları nedeniyle, bu yöntemler için dezavantaj oluşturmaktadır (Adachi et al., 2004; Setianingsih et al., 2019).

Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Gerçek zamanlı qRT-PCR, güvenilir laboratuvar tanısı için güçlü bir teknolojidir ve uzun yıllardır laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. Ocak 2020'de SARS-CoV-2'nin genomik sekansının yayınlanmasından bu yana, TaqMan prob tabanlı birçok gerçek zamanlı qRT-PCR testi, salgın sırasında çok sayıda SARS-CoV-2 virüs enfeksiyonunun varlığının saptanması için araştırmacılar tarafından geliştirilmiş ve tüm dünyada kullanılmıştır. Bununla birlikte, şüpheli vakaların artışı sonucunda, gerçek zamanlı qRT-PCR testlerinin sofistike ekipman ve donanımlı personel gerektirmesi, test sonucunun yaklaşık 2-3 saat gibi uzun bir zamanda çıkması bu testler için tespit kapasitesi ve hız açısından sınırlamalar getirmiştir. Bununla birlikte testin yetkilendirilmiş laboratuvarlarda yapılması süreci daha da uzatmaktadır. Bu yüzden SARS-CoV-2 enfeksiyonunun hızlı, hassas ve ekonomik bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak tanı testlerine hala acil ihtiyaç duyulmaktadır (Chu et al., 2020; Lo & Chiu, 2020). Bu

eksikliğinin kapatılması için SARS-CoV-2 genomunun dizilenmesinden bu yana, birçok şirket, virüs genomu üzerinde hedefledikleri farklı gen bölgelerine bağlanmak üzere tasarlanmış birçok oligonükleotidi kullanarak qRT-PCR test kiti üretimi için çalışmalar yapmaktadırlar. Testte oluşacak hata oranını en aza indirmek için mutlaka pozitif, negatif kontroller ve birden fazla tekrarlar çalışma yapmak önerilmektedir. Bu durumlara dikkat edilmesine rağmen istenmeyen olumsuzluklarla da karşılaşılabilir. Özellikle hedef bölgeye özgü oligonükleotidler ve problemlerin tasarlanması, bu bölgelerde oligonükleotid ve problemlerin bağlanmasına engel olacak polimorfizm ve mutasyonların olmadığı kontrolü ve bunların laboratuvar ortamında optimize edilmesi yanlış pozitif / negatif sonuçların oluşmasını da önleyecektir. Bunlar dışında hastadan alınan numunenin çok az olması, alınan numunenin enfeksiyonun çok erken ya da geç evresinde alınması, numunenin uygun olmayan şartlarda laboratuvara taşınması ya da laboratuvar ortamında uygun şartlarda işlenmemesi, PCR'yi inhibe edebilecek maddelerin ortamda bulunması da yanlış pozitif / negatif sonuçlara neden olabilmektedir.

Konvansiyonel PCR sonrası yapılan jel elektroforezi işleminin gerçek zamanlı qRT-PCR sonrası yapılmasına gerek duyulmaması bir avantaj olarak görülmektedir. Bu yöntemde belli sıcaklıklarda DNA çoğalması ile eş zamanlı değişim gösteren floresan işaretli problemlerin ya da boyaların oluşturdukları sinyallerin ölçülmesi ile analiz yapılmaktadır.

İzotermal Amplifikasyon

Nükleik asitlerin tespit edilme yöntemleri moleküler tanıda yıllardır kullanılmaktadır. Birçok moleküler tanı yöntemi olmasına rağmen tanı hızı, özgüllük ve hassasiyetin üst seviyede olduğu metod arayışları hep sürmüştür. Çeşitli PCR temelli nükleik asit yöntemleri kullanılmasına rağmen, farklı izotermal amplifikasyon metodları da bulunmaktadır.

Son yıllarda, rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi birkaç izotermal amplifikasyon yöntemi, basit, hızlı ve ekonomik olmaları nedeniyle geleneksel PCR yöntemine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde sofistike laboratuvar cihazına ihtiyaç duyulmamaktadır. Bununla birlikte, yanlış pozitif / negatif gibi spesifik olmayan sinyaller nedeniyle klinik uygulamalar için güvenilir bir tanı yöntemi geliştirme aşamasında hala uygulamaya yönelik zorlukları bulunmakta olup, hızlı, hassas ve ekonomik olabilecek Covid-19 tanısının konulması için son yıllarda bu metodlardan yararlanılmaktadır.

Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (RPA)

Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), 15-20 dakika içinde sonuç verebilen, patojenlerin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, rekombinaz, tek zincirli DNA bağlayıcı prote-

in (SSB) ve amplifikasyon için zincirin yer değiştirmesi etkinliğine sahip DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. PCR' de olduğu gibi hedef bölgeye özgü en az bir çift primere ihtiyaç duyulmaktadır ve reaksiyonlar düşük sabit sıcaklıklarda (37-42°C) gerçekleştirilebilmektedir. RPA sonrasında oluşacak ürünlerin saptanması için incelenecek bölgeye özgü floresan işaretli problemlerin tasarımı yapılarak gerçek zamanlı PCR cihazları, fluometrelerle ve yanal akım testleriyle de analiz imkanı sağlanabilmektedir. Farklı tasarlanacak primerler / problemler ile multipleks saptama yapılabilmesi de olanaklı hale gelebilmektedir. Ayrıca SARS-CoV-2 gibi RNA virüsleri, reaksiyon karışımına enzim, ters transkriptaz reaktifleri eklenerek amplifiye edilebilmektedirler (Daher, Stewart, Boissinot, & Bergeron, 2016; Jauset-Rubio et al., 2016; Kersting, Rausch, Bier, & von Nickisch-Rosenegk, 2014). RPA' nın Covid-19 tanısı için hızlı, hassas ve ekonomik bir yöntem olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Behrmann et al., 2020).

Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

LAMP yöntemi de RPA gibi bulaşıcı hastalıkların tanısında hızlı ve ekonomik olabilecek nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden birisidir. Reaksiyon 60-65°C arasında gerçekleştiğinden dolayı gelişmiş bir laboratuvar cihazına ihtiyaç duyulmamaktadır. Bununla birlikte reaksiyonda birçok oligonükleotid kullanıldığından sonuçların özgüllüğü daha yüksek olmaktadır. Kalıtsal materyali RNA olan virüslerin varlığının saptanması / amplifikasyonları için öncelikli olarak ters transkriptaz enzimi ile cDNA eldesi yapılmaktadır (de Paz, Brotons, & Munoz-Almagro, 2014; Notomi et al., 2000). LAMP pozitif / negatif bir reaksiyondaki değişim çıplak göz ile ayırt edilebilmekte, kantitasyonu ise kolorimetre ve florimetre ile ölçülebilmektedir (Mori & Notomi, 2009). Lin Yu ve arkadaşları, RT-LAMP testinin, SARS-CoV-2 virüsünün 10 kopyasına eşdeğer sentezlenmiş RNA' yı saptayabildiğini ve klinik duyarlılığın, RT-qPCR ile onaylanmış örneklerdeki oranın % 97.6 (42/43) olduğunu göstermiştir. Bu araştırmacılar virüs genomunda Orflab' deki 8 farklı gen bölgesini hedefleyerek reaksiyonun ortalama olarak 20-40 dk içerisinde gerçekleştiğini belirtmişlerdir. (Lu et al., 2020; Yu et al., 2020).

RPA ile LAMP' ı karşılaştıracak olursak; RPA, nükleik asitleri 37°C ya da daha düşük sıcaklıklarda çok hızlı bir şekilde amplifiye edebilmekte, homolog dizileri tarayan ve çift sarmallı şablonu çözebilen primerlerle kompleks oluşturan rekombinaz proteinlerini kullanmaktadır. İki sistemde de amplifiye edilmiş ürünlerde özel problemler kullanılarak hem gerçek zamanlı olarak hem de yanal akış testi şeklinde analiz edilebilmektedir.

Hızlı bir moleküler testin uygulanmasına rehberlik edecek çeşitli kriterler bulunmaktadır: hızlı klinik karar, hekim ve hemşireler tarafından test güvenliği ve kullanımı, hasta ziyareti sırasında hızlı sonuç verebilen ve

PCR teknolojisine kıyasla maliyeti daha az olan bir metod olması. LAMP ve RPA gibi izotermal amplifikasyon testleri, bu kriterlerin çoğunu karşılama potansiyeline sahiptir, ancak COVID-19 tanısında bu teknolojileri doğrulamak için acilen daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

DİZİ ANALİZİ

Dizi analizi, viral nükleik asitlerin tanımlanması için uygulanan en kapsamlı yaklaşımlardan birisidir. SARS-CoV-2' ye ait tüm genom dizisi ilk olarak Zhang ve ark tarafından 5 Ocak 2020 tarihinde MN908947 erişim numarası ile GenBank veritabanına kaydedilmiştir (F. Wu et al., 2020). Takip eden aylarda da Illumina ve Nanopore gibi yeni nesil dizileme sistemleri kullanılarak birçok ülkenin SARS-CoV-2 ile ilgili klinik çalışmalarına ait dizileme sonuçları bu veritabanına eklenmiştir. Bu sistemlerin oldukça pahalı, tespit edilecek materyalin çalışılması ve analizinin diğer yöntemlere göre daha kompleks olması, sistemlerin kullanımı konusunda deneyimli kişilerin olması gerekliliği, pandemi dönemindeki vaka sayısının fazla olması, vb sebeplerden dolayı acil ve rutin klinikte kullanılması tercih edilmemektedir. Ancak ilaç, aşı ve tür çalışmaları için yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar.

CRISPR-Cas testleri

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri) ile ilişkili Cas (CRISPR Associated: CRISPR İlişkili Genler) proteinleri bakterilerin virüs ve plazmitlere karşı savaşmasına yardımcı olmak için kazanılmış bir bağışıklık mekanizması olarak gelişmiştir. Bilim insanları ilerleyen yıllarda, bu mekanizmanın genom düzenleme aracı olarak da kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Barrangou & Marraffini, 2014; Singh, Braddick, & Dhar, 2017; Terns & Terns, 2011).

Son zamanlarda adını sıkça duyduğumuz bu sistemde büyük roller oynayan Cas enzimleri, nükleik asitlerin spesifik, hızlı, hassas ve taşınabilir cihazlar yardımıyla algılanması için kullanılmaya çalışılmaktadır. Bu enzimlerden en önemlileri Cas13 ve Cas12' dir. Cas13 ve Cas12, hedef bölgeyi tanıma üzerine aktive edilen bir raportör molekül ile birleştirilerek nükleik asit varlığını veya miktarını spesifik ve hassas bir şekilde gösterebilmektedir (Abudayyeh et al., 2016; Shmakov et al., 2015; Zetsche et al., 2015).

RNA hedefleyen Cas13 enzim ailesinin dört üyesi bulunmaktadır: Cas13a, Cas13b, Cas13c ve Cas13d. Bu enzim hedeflediği tek zincirli RNA' ya bağlandıktan sonra 'kollateral aktivite' olarak adlandırılan etkisi ile hedef RNA' yı ayıran ve çevresindeki RNA' nın spesifik olmayan

şekilde parçalanmasına neden olan genel bir RNaz aktivitesi göstermektedir. Son yapılan çalışmalar ile Cas12' nin de kollateral bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu kollateral aktivitenin bulunması ile nükleik asitlerin tespit edilmesinde yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Abudayyeh et al., 2016; Chen et al., 2018; Li et al., 2018; Shmakov et al., 2015).

Kollateral aktiviteye sahip nükleik asit tespiti, çeşitli raportör moleküller ve yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar; (1) floresan işaretli raportörler ile jel bağımlı tespit (Abudayyeh et al., 2016), (2) quenched floresan raportörlerin kullanımı sonrası fluometre ile tespit (East-Seletsky et al., 2016; Gootenberg et al., 2017), (3) sıvı-sıvı faz ayrılması yoluyla çözelti bulanıklığının modülasyonu ile görsel tespit (Spoelstra, 2019), (4) antijen etiketli raportörlerin kullanımı sonrası yanal akış testi ile tespit (Gootenberg et al., 2018).

Bu proteinler kullanılarak Covid-19' un da içinde bulunduğu farklı tanı kitlerini geliştirmeye çalışan birçok biyoteknoloji şirketi bulunmaktadır.

CRISPR alanında bünyesinde birçok bilim insanı barındıran ve bu konuda önemli çalışmaları bulunan tanınmış biyoteknoloji şirketleri Sherlock Biosciences ve Mammoth Biosciences' dir.

SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) Biosciences' ın geliştirdiğı tanı kiti ~1 saat içerisinde 1 ml' de zeptomolar seviyesinde tek bir molekülü tespit edebilmektedir. RNA ekstraksiyonu sonrasında RPA kiti kullanılarak izotermal amplifikasyon yapılmaktadır. Geliştirilmiş bu tanı kiti virüs genomunda S ve Orflab genlerini hedef almaktadır. *In vitro* transkripsiyon sonrasında amplifiye olacak bu gen bölgelerini tespit edebilmek için Cas13 enzimi kullanılmaktadır. Cas13, hedeflenen bölgeye bağlanmak için tamamlayıcı bir crRNA sekansı kullanır ve bağlandıktan sonra da aktive edilir. Cas13' ün kollateral aktivitesi ile de virüs varlığı analiz edilebilmektedir. Cas12a hedef bölünme için bir PAM (Protospacer Bitişik Motif)' a ihtiyaç duyarken, Cas13a için böyle bir gereksinim bulunmamaktadır. Bu testin Mayıs 2020' de Covid-19 tanısında kullanılabilmesi için FDA tarafından onay alınmıştır (fda.gov, 2020; Kellner, Koob, Gootenberg, Abudayyeh, & Zhang, 2019).

Mammoth Biosciences da DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) adlı moleküler tanı kitini geliştirmek için CRISPR-Cas gen düzenleme teknolojisini kullanmıştır. SHERLOCK testinde olduğu gibi, DETECTR de herhangi bir DNA veya RNA hedefini tespit etmek için geliştirilip, sonuçlar ~40 dakika içerisinde cihazsız ve tek kullanımlık bir formatta elde edilebilmektedir. Bu sistem, diğeri cihaz ve platformlara da entegre edilebilmektedir. DETECTR şimdilik N ve E

SARS-CoV-2 genlerinin tanımlanması için geliştirilmiştir. Hedeflenen gen bölgelerine özel tasarlanmış primerler ile RT-LAMP gerçekleştirilebilmektedir. Bu sistemde Cas12a kullanılmaktadır. Cas12a-sgRNA kompleksi hedef sekanslara bağlandığı zaman Cas12a aktivitesi sonrasında yanak akış testleri kullanılarak görsel olarak tespit edilebilmektedir. Araştırmacılar bu yöntemin validasyonu için referans örnekler ve enfekte olmuş klinik örneklerden yararlanarak gerçek zamanlı RT-PCR sonuçları ile performans karşılaştırmasını yapmışlardır (Broughton et al., 2020; Chen et al., 2018).

SONUÇ

Bugüne kadar, SARS-CoV-2 varlığının saptanması ile ilgili önemli araştırmalar yapılmıştır. Tekbaşınakullanılacak bir yöntemin dezavantajlarını önlemek için bazı çalışmalarda birkaç yöntem birleştirilmiştir. Özetle, yeni teknolojilerin ve yöntemlerin hızla gelişmesiyle, gelecekte bilim insanlarına / klinisyenlere daha fazla seçenek sağlayacak tanı testlerinin olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- A.E. Gorbalenya, S. C. B., R.S. Baric, R.J. de Groot, C. Drosten, A.A. Gulyaeva, B.L. Haagmans, C. Lauber, A.M. Leontovich, B.W. Neuman, et al., Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, Viruses. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*, 5(4), 536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B., . . . Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299), aaf5573. doi:10.1126/science.aaf5573
- Adachi, D., Johnson, G., Draker, R., Ayers, M., Mazzulli, T., Talbot, P. J., & Tellier, R. (2004). Comprehensive detection and identification of human coronaviruses, including the SARS-associated coronavirus, with a single RT-PCR assay. *J Virol Methods*, 122(1), 29-36. doi:10.1016/j.jviromet.2004.07.008
- Balboni, A., Gallina, L., Palladini, A., Prosperi, S., & Battilani, M. (2012). A real-time PCR assay for bat SARS-like coronavirus detection and its application to Italian greater horseshoe bat faecal sample surveys. *ScientificWorldJournal*, 2012, 989514. doi:10.1100/2012/989514
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 54(2), 234-244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011
- Behrmann, O., Bachmann, I., Spiegel, M., Schramm, M., El Wahed, A. A.,

- Dobler, G., . . . Hufert, F. T. (2020). Rapid detection of SARS-CoV-2 by low volume real-time single tube reverse transcription recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (exo-IQ). *Clin Chem*. doi:10.1093/clinchem/hvaa116
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., . . . Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. doi:10.1038/s41587-020-0513-4
- 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. doi:10.1126/science.aar6245
- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., . . . Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem*, 66(4), 549-555. doi:10.1093/clinchem/hvaa029
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., . . . Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M., & Bergeron, M. G. (2016). Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin Chem*, 62(7), 947-958. doi:10.1373/clinchem.2015.245829
- de Paz, H. D., Brotons, P., & Munoz-Almagro, C. (2014). Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 14(7), 827-843. doi:10.1586/14737159.2014.940319
- East-Seletsky, A., O'Connell, M. R., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, J. H., Tjian, R., & Doudna, J. A. (2016). Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 538(7624), 270-273. doi:10.1038/nature19802
- fda.gov. (2020). <https://www.fda.gov/media/137747/download>.
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., & Zhang, F. (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 360(6387), 439-444. doi:10.1126/science.aaq0179
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., . . . Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438-442. doi:10.1126/science.aam9321
- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., . . . China Medical Treatment Expert Group for, C. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*, 382(18), 1708-1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032

- Jauset-Rubio, M., Svobodova, M., Mairal, T., McNeil, C., Keegan, N., Saeed, A., . . . CK, O. S. (2016). Ultrasensitive, rapid and inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay. *Sci Rep*, 6, 37732. doi:10.1038/srep37732
- Jiang, S., Du, L., & Shi, Z. (2020). An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg Microbes Infect*, 9(1), 275-277. doi:10.1080/22221751.2020.1723441
- Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 14(10), 2986-3012. doi:10.1038/s41596-019-0210-2
- Kersting, S., Rausch, V., Bier, F. F., & von Nickisch-Roseneck, M. (2014). Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochim Acta*, 181(13-14), 1715-1723. doi:10.1007/s00604-014-1198-5
- Li, S. Y., Cheng, Q. X., Liu, J. K., Nie, X. Q., Zhao, G. P., & Wang, J. (2018). CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res*, 28(4), 491-493. doi:10.1038/s41422-018-0022-x
- Lo, Y. M. D., & Chiu, R. W. K. (2020). Racing Towards the Development of Diagnostics for a Novel Coronavirus (2019-nCoV). *Clin Chem*, 66(4), 503-504. doi:10.1093/clinchem/hvaa038
- Lu, R., Wu, X., Wan, Z., Li, Y., Zuo, L., Qin, J., . . . Zhang, C. (2020). Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virol Sin*. doi:10.1007/s12250-020-00218-1
- Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother*, 15(2), 62-69. doi:10.1007/s10156-009-0669-9
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- Setianingsih, T. Y., Wiyatno, A., Hartono, T. S., Hindawati, E., Rosamarlina, Dewantari, A. K., . . . Safari, D. (2019). Detection of multiple viral sequences in the respiratory tract samples of suspected Middle East respiratory syndrome coronavirus patients in Jakarta, Indonesia 2015-2016. *Int J Infect Dis*, 86, 102-107. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.022
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., . . . Koonin, E. V. (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*,

- 60(3), 385-397. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.008
- Singh, V., Braddick, D., & Dhar, P. K. (2017). Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene*, 599, 1-18. doi:10.1016/j.gene.2016.11.008
- Spoelstra, W. K. e. a. (2019). CRISPR-based DNA and RNA detection with liquid-liquid phase separation. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/471482v2>.
- Terns, M. P., & Terns, R. M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol*, 14(3), 321-327. doi:10.1016/j.mib.2011.03.005
- Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. doi:10.1001/jama.2020.3786
- Wang, X., Tan, L., Wang, X., Liu, W., Lu, Y., Cheng, L., & Sun, Z. (2020). Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for SARS-CoV-2 detection in 353 patients received tests with both specimens simultaneously. *Int J Infect Dis*, 94, 107-109. doi:10.1016/j.ijid.2020.04.023
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., . . . Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, 27(3), 325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., . . . Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
- Yu, L., Wu, S., Hao, X., Dong, X., Mao, L., Pelechano, V., . . . Yin, X. (2020). Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin Chem*. doi:10.1093/clinchem/hvaa102
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., . . . Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759-771. doi:10.1016/j.cell.2015.09.038
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., . . . Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., . . . Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*, 382(12), 1177-1179. doi:10.1056/NEJMc2001737