

COVID-19 Pandemisinde Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri

Microbiological Diagnostic Methods in COVID-19 Pandemic

Aybala Temel*¹, Aşegül Ateş**², Bayrı Eraç**²

*İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Temel A, Ateş A, Eraç B. COVID-19 pandemisinde mikrobiyolojik tanı yöntemleri, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):99-108.

Öz

Dünya genelinde bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan COVID-19 pandemisi; enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve salgınların kontrol altına alınmasında mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin kritik önemini açıkça göstermiştir. SARS-CoV-2 ile mücadelede en etkili yol, virüsün yayılımını olabildiğince azaltmaktır. Virüsün yayılımını azaltmak ise virüsü taşıyan semptomatik veya asemptomatik tüm bireylerin, en kısa sürede ve doğru şekilde saptanmasını sağlayan tanı yöntemleriyle olasıdır. COVID-19 hastalığının tanısında ve takibinde, uluslararası sağlık otoriteleri tarafından önerilen çeşitli mikrobiyolojik yöntemler (serolojik testler, nükleik asit amplifikasyon yöntemleri) yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından COVID-19 laboratuvar tanısında altın standart yöntem olarak belirtilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) metodu dâhil olmak üzere farklı diagnostik yöntemlerin uygulanmasında yaşanan zorluklar pandemi sürecinde bir kez daha anlaşılmıştır. Enfeksiyonlarla mücadelede daha yüksek başarı sağlayabilmek için mevcut mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin uygulama ve değerlendirme standartlarının iyi belirlenmesi, daha kısa sürede doğru şekilde sonuç veren, kolay uygulanabilen, düşük maliyetli yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PZR, serolojik testler, CRISPR

ABSTRACT

COVID-19 pandemic that caused the death of more than one million people worldwide, has clearly demonstrated the critical importance of microbiological diagnostic methods in preventing infectious diseases and controlling outbreaks. The most effective way for combating SARS-CoV-2, is reducing the spread of the virus as much as possible. To decrease the spread of the virus is only possible with diagnostic methods that enable the detection of all symptomatic or asymptomatic patients infected with the virus accurately and as early as possible. Various microbiological methods (serological tests, nucleic acid amplification methods) recommended by international health authorities are widely used in the diagnosis and follow-up of COVID-19 disease. The challenges experienced in application of diagnostic methods, including real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method, which is specified as the gold standard method in the diagnosis of COVID-19 by the World Health Organization, were once again acknowledged during the pandemic. To achieve higher success rates in combating infections, it is necessary to better determine the application and evaluation standards in current microbiological diagnostic methods, to develop new cost-effective methods that are easily applicable and yielding results within a short time.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PCR, serological tests, CRISPR

Alındığı tarih / Received:
26.01.2021 / 26.January.2021

Kabul tarihi / Accepted:
30.03.2021 / 33.March.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

A. Temel 0000-0003-1549-7219

A. Ateş 0000-0001-6891-6662

B. Eraç 0000-0002-6343-2519

✉ aybالاتemel@hotmail.com

GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları, özellikle viral pandemiler yüzyıllardır toplum sağlığını tehdit eden başlıca küresel sorunlardandır. Yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla salgın hastalıklar, çok sayıda insanın yaşamını tehdit etmesinin yanı sıra sağlık bakım giderlerinde

artış, iş gücü kaybı gibi önemli ekonomik sorunları da beraberinde getirir. Küresel salgınların sonucusu; bir yılı aşkın süredir ülkemizi ve tüm dünyayı etkisi altına almış olan Koronavirüs Hastalığı (COVID-19)'dır^(1,2).

2019 yılı aralık ayında, ilk olarak Çin'in Wuhan şehrinde, nedeni belirlenmeyen ve sayıları hızla artan

pnömoni olguları dikkat çekmiş ve kısa süre sonra bu durumun yeni bir koronavirüsten kaynaklandığı saptanmıştır⁽³⁾. SARS-CoV-2 olarak adlandırılan virüsün, geçtiğimiz yıllarda farklı ülkelerde çok sayıda hastanın ölümüne neden olan Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) etkeni betakoronavirüsler ile benzer genetik yapıda olduğu anlaşılmıştır^(4,5). Hastalık dört ay gibi oldukça kısa bir sürede tüm dünyayı etkisi altına almış olup, 11 Mart 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 hastalığı "pandemi (küresel salgın)" olarak ilan edilmiştir. Salgının başlangıcından yaklaşık bir yıl sonrasında, 24 Ocak 2021 itibariyle 95 milyon üzerinde doğrulanmış olgu olduğu ve 2.112.689 kişinin yaşamını kaybettiği DSÖ tarafından rapor edilmiştir. Türkiye'de ilk COVID-19 olgusu ise 11 Mart 2020'de belirlenmiş olup, Sağlık Bakanlığınca 24 Ocak 2021 itibariyle ülkemizde olgu sayısının 2.429.605 kişiye ulaştığı bildirilmiştir. SARS-CoV-2'nin bulaşıcılığın yüksek olması, salgının kontrol altına alınmasını güçleştiren ana etmenddir. COVID-19 hastalığında bulaş hızının düşürülerek yayılımın azaltılabilmesi için enfeksiyonun olabildiğince erken ve doğru şekilde tanısı gerekmektedir. Ülkemizde ve dünyada hastalığın tanısında ve takibinde, uluslararası sağlık otoritelerince önerilen çeşitli moleküler mikrobiyolojik yöntemler (nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, serolojik testler) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları doğrudan virüsün varlığını saptamaya yönelik moleküler yöntemler iken bazıları ise virüse karşı vücutta oluşan bağışıklık yanıtın saptanması prensibine dayanmaktadır.

Virüsün Yapısı ve Hastalık Patogenezi

COVID-19 salgının ortaya çıkışından kısa süre sonra, Ocak 2020'de, Wuhan'daki hastaların akciğerlerinden alınan örneklerden virüs izole edilerek genom analizi yapılmıştır. İlk olarak Çinli araştırmacılar tarafından 12 Ocak 2020 tarihinde SARS-CoV-2'nin genom dizilimi, tüm dünyadan araştırmacıların erişebileceği açık veri tabanlarında paylaşıldı⁽⁶⁾. SARS-CoV-2'un genom dizilerinin hızla belirlenmesi ve paylaşılması; virüsün yapısının ve hastalık oluşturma mekanizmasının anlaşılması, tanı yöntemlerinin belirlenebilme-

si, devam eden salgının takibi ve potansiyel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından büyük yarar sağlamıştır.

SARS-CoV-2 virüsü, *Coronaviridae* ailesinde yer alan, pozitif iplikli tek sarmallı RNA genomuna sahip zarflı bir virüstür. Yapılan genom araştırmalarıyla bu virüsün, geçtiğimiz yirmi yıl içerisinde farklı ülkelerde salgınlara yol açan SARS-CoV ve MERS-CoV'un da aralığında bulunduğu betakoronavirüs (*beta-CoV*) ailesi üyelerinden olduğu belirlenmiştir. SARS-CoV-2'nin genom yapısının SARS-CoV ile %79, MERS-CoV ile de yaklaşık %50 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır⁽⁷⁾. Virüsün zarf proteini (E, envelope), membran proteini (M), nükleokapsid proteini (N) ve spike protein (S) olmak üzere dört yapısal proteini mevcuttur. Bu protein yapılarından özellikle spike (S) proteini, virüsün konak hücreye tutunması ve girişinde kilit rol oynar⁽⁸⁾. Virüs, S proteini aracılığıyla konakçı hücre zarının dış kısmındaki ACE-2 (Anjiyotensin dönüştürücü enzim) reseptörlerine bağlanarak konak hücreye girmekte ve sonrasında hızla çoğalarak hastalığa neden olur. ACE-2 reseptörlerinin insan vücudunda akciğerler, kalp ve böbrekler başta olmak üzere farklı doku ve organlarda bulunduğu bilinir⁽⁹⁾. Bu nedenle COVID-19 hastalığında, virüsün konak hücreye girişinin ardından enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında organizmada şiddetli akut solunum yetmezliği başta olmak üzere pek çok doku ve organı etkileyen ağır klinik tablolar gelişebilir⁽⁹⁾.

Hastalığın Bulguları ve Tanısı

COVID-19 tanısı alan bireylerde sık görülen klinik bulgular ateş, öksürük, şiddetli kas ağrıları, artmış balgam üretimi, nefes darlığı, boğaz ağrısı, koku kaybı ve baş ağrısı olarak sıralanır⁽¹⁰⁾. Hastanın yaşı, bağışıklık durumu, kronik hastalıklarının (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabet, hipertansiyon vb.) varlığı söz konusu semptomların daha şiddetli gözlenmesine, akut solunum yetmezliği, septik şok ya da pıhtılaşma bozukluğu gibi ciddi ve ani gelişen klinik tablolara neden olabilir⁽³⁾. Bununla birlikte, semptomatik olguların yanı sıra COVID-19 salgınında asemptomatik olguların sayıca hayli fazla olduğuna ve klinik belirti göstermeyen bu enfekte bireylerin virüsü

bulaştırma düzeylerinin de yüksek olduğuna dikkat çeken çalışma sonuçları mevcuttur⁽¹¹⁾. COVID-19 salgınıyla mücadelede halen en etkili ve geçerli yol, virüsün yayılımını olabildiğince azaltmaktır. Bu ise ancak virüsü taşıyan semptomatik ve/veya asemptomatik tüm bireylerin, en kısa sürede ve doğru şekilde saptanmasını sağlayan tanı yöntemleriyle olasıdır. Dünya genelinde COVID-19'un laboratuvar tanısında nükleik asit amplifikasyon yöntemleri (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, RT-PCR), serolojik testler ve bilgisayarlı tomografi (BT) bulguları tanı koymada sık kullanılan yöntemlerdir⁽¹²⁻¹⁴⁾. Ayrıca COVID-19 salgınında mevcut tanı yöntemlerindeki bazı zorluklar ve kısıtlılıklar; CRISPR temelli tanı yaklaşımları başta olmak üzere alternatif ve yenilikçi tekniklere ilgiyi arttırmıştır.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

COVID-19 olgularının belirlenmesi ve doğrulanmasında; Dünya Sağlık Örgütü'nün protokol ve önerileri doğrultusunda, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi altın standart olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır⁽¹⁴⁾. RT-PCR yöntemi, hastadan alınan örnekte SARS-CoV-2 virüsüne ait nükleik asit varlığının araştırılması prensibine dayanan bir moleküler tanı yöntemidir. Hastadan alınan solunum yolu örnekleriyle (orofarenks ve nazofarenks sürüntüsü, balgam, bronkoalveolar lavaj) yapılan testte; virüsün genomunda yer alan ve nükleotid dizilimi bilinen farklı bölgelerin saptanarak çoğaltılması hedeflenir. Bu amaçla özel tasarlanmış primer dizileri, Taq polimeraz enzimi, uygun tampon çözeltileri ve kopyalanan genetik materyale bağlanma özelliğine sahip boyalar kullanılmaktadır. Hastadan alınan örnekte viral nükleik asitin bulunması durumunda bu nükleik asidin çok sayıda kopyası elde edilmekte, floresan boya veya probler yardımıyla eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir^(15,16).

Özellikle COVID-19 semptomları gösteren şüpheli olguların doğrulanması, şüpheli veya kesin tanı alan COVID-19 hastasıyla temaslı bireylerin taranması ve COVID-19 hastalarının karantinadan çıkışına karar verilmesinde RT-PCR yönteminden yararlanılmakta-

dır^(14,17,18). Kantitatif sonuç veren, analitik duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bu moleküler test yöntemi rutin tanıda yaygın olarak kullanılsa da bazı kısıtlılıkları olduğu bilinir. Literatürde yer alan farklı araştırma ve istatistiksel değerlendirmelerde, SARS-CoV-2 RT-PCR testlerinin tanısız açıdan doğruluğunun düşük olduğuna, yanlış negatif sonuçların azımsanamayacak sıklıkta olduğuna dikkat çekilmektedir^(19,20).

RT-PCR testinin duyarlılığı ve güvenilirliği; hastadan alınan örnek tipi ve alındığı bölge, örnek alma zamanı, örnek saklama koşulları gibi pek çok preanalitik faktörle doğrudan ilişkili olabilmektedir. Hastadan örneğin erken ya da geç evrede alınmış olması, örnekte viral yükün testle saptanamayacak kadar düşük olması, test örneği alınmadan önce antiviral ilaç kullanımı, örneğin doğru şekilde ve uygun bölgeden alınmaması, analiz öncesi uygun koşullarda saklanmaması, test ortamında PCR inhibitörlerinin varlığı RT-PCR testinde yanlış negatif sonuçlara neden olan durumlardan bazılarıdır^(21,22).

Tanı testi için hastadan alınan örnek tipi ve örnek alma zamanı da test sonucunun duyarlılığını çok büyük ölçüde etkileyen bir parametredir. Örnek tipinin test duyarlılığına etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, RT-PCR test duyarlılığının boğaz sürüntüsü örneklerinde %32 iken, balgamda %72, bronkoalveolar lavaj için %93 olduğu belirtilmiştir⁽²³⁾. Örnek alma zamanı ile test duyarlılığı arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir başka çalışmada ise, hastalığın sekizinci gününden önce alınan solunum yolu örneklerinde %66.7 olarak saptanan viral RNA pozitifliğinin, 8.-14. günler arasında %54'e, 15. gün ve sonrasında ise %45.5'e kadar düştüğü bildirilmiştir⁽²⁴⁾.

COVID-19 tanısında en doğru sonucun alınabilmesi için alt ve üst solunum yolu örneklerinin (balgam, bronkoalveolar lavaj) kullanılması önerilirken kan, idrar ve dışkı örneklerinden yapılan testlerin oranla düşük duyarlılıkta olduğu rapor edilmiştir^(25,26). Hastadan alınacak bronkoalveolar lavaj ve balgam gibi solunum yolu örnekleri tanı açısından daha güvenilir kabul edilmekle birlikte, bu örneklerin alınmasının aerosol oluşumu vb. nedenlerle sağlık çalışanları açısından daha yüksek risk oluşturduğu da

unutulmamalıdır. Bu nedenle örnek alma işlemi eğitilmiş ve yetkili sağlık personeli tarafından, kişisel koruyucu ekipman kullanılarak biyogüvenlik kurallarına uygun şekilde yapılmalıdır. Hastadan sürüntü örnekleri özel eküvyonlarla alınıp virüsün taşınması için uygun ortamı içeren özel kaplarda saklanmalı ve test edilecek örnek +4°C'de tutularak olabildiğince en kısa sürede analiz için laboratuvara gönderilmelidir. Testin doğru ve güvenilir sonuç verebilmesi için örnek alma işleminden test sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her bir aşamada ulusal ve uluslararası sağlık otoritelerince belirlenmiş protokol ve standartlara uygun şekilde çalışılması gerekir.

COVID-19 tanısında moleküler testlere ek olarak radyolojik tanı yöntemi olan bilgisayarlı tomografi (BT) sonuçlarından da yararlanılmakta, hastaların akciğer grafilerinde yer alan bulguların, doğru ve erken tanı açısından yarar sağlayabildiği belirtilmiştir. Yapılan ilk RT-PCR testi negatif olup, bilgisayarlı tomografi sonucu pozitif olarak değerlendirilen çok sayıda hastada, ilerleyen günlerde yinelenen PCR testinde pozitif sonuç alındığını bildiren çalışma sonuçları literatürde yerini almıştır⁽²¹⁾. Çin'de 82 olguyla yürütülen klinik gözleme dayalı bir araştırmada, hastaların bilgisayarlı tomografi sonuçlarının PCR test sonuçları ile beraber değerlendirilmesi durumunda, %79 olan RT-PCR duyarlılığının %94'e yükseldiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, virüsün akciğerde tutulumunun gözlenebildiği bilgisayarlı akciğer tomografisi bulgularının RT-PCR test sonuçlarında yanlış negatiflik oranlarının azaltılmasında ve hastalığın erken tanısında katkı sağlayabileceğine dikkat çekilmiştir⁽²⁷⁾.

Serolojik Testler

Serolojik test yöntemleri daha çok viral nükleik asidin saptanamadığı durumlarda, asemptomatik olguların saptanmasında ve enfeksiyonu geçiren kişilerde bağışıklık yanıtın izlenmesi amacıyla kullanılır⁽²⁸⁾. Antijen/antikor testleri adıyla da bilinen bu testler; viral antijenin ya da virüse karşı vücutta oluşan antikor yanıtının belirlenmesi prensibine dayanır. Yapılan araştırmalar, SARS-CoV-2 virüsü vücuda alındıktan sonra virüse karşı antikor yanıtının gelişmesinin yaklaşık bir hafta sürebildiğine işaret eder. Bu nedenle antikor

yanıtını ölçmeye yönelik serolojik testlerin hastalığın erken tanısı amacıyla kullanımı önerilmemekte, bu testlerden daha çok kitlesel taramalarda yararlanılmaktadır^(14,29). SARS-CoV-2'nin yapısal N ve S proteinlerinin antijenik bölgeleri veya bu antijenik yapılara karşı vücutta gelişen antikorları saptamaya yönelik farklı serolojik testler vardır. SARS-CoV-2'nin nükleokapsid proteini (N); virüsün çoğalmasında görev alır. COVID-19 hastalarında ilk 14 gün içerisinde serum ve idrarda en yüksek seviyede gözlenen N proteini, erken tanıda kullanılan önemli bir antijenik yapıdır^(30,31). Virüsün bir diğer önemli yapısal proteini S glikoproteini ise virüsün konak hücrede ilgili reseptöre tutunmasını sağlar. S proteini ve bu antijenik yapıya karşı oluşan antikorların tespitinden, hastalığın tanısından daha çok nötralizan antikor ve aşı çalışmalarında yararlanılır^(19,22,31). N antijenine karşı oluşan IgG ve IgM antikorlarını saptayan testlerin daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir⁽³¹⁾. Ayrıca rekombinant teknolojiyle üretilmiş N ve S antijenini birlikte içeren ticari serolojik test kitleri de geliştirilerek FDA (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) onayıyla kullanıma sunulmuştur. İnsan vücudunda SARS-CoV-2'ye karşı IgG ve IgM antikor yanıtının genellikle semptomların başlangıcından 3-6 gün sonrasında olduğu ve yaklaşık üç hafta sürebildiği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü SARS-CoV-2'yi saptamaya yönelik serolojik testlerin uygulanacağı durumlarda, hastadan yalnızca tek bir serum örneği alınacaksa; semptomların başlangıcından en az üç hafta sonra alınan örnekle test yapılmasını önerir⁽²⁵⁾.

Yapılan araştırmalarda, COVID-19 hastalığı geçiren ve antikor yanıtı gelişen hastalarda, IgG antikorlarının vücutta daha uzun süre kalıcılık gösterdiğine dikkat çekilirken, her iki antikor için de net bir bağışıklık süresi henüz belirlenememiştir^(2,32,33). Ayrıca hastalığı bir kez geçiren ve COVID-19 antikor pozitif olan bir hastanın, ikinci bir SARS-CoV-2 enfeksiyonundan kesin olarak korunduğuna dair yeterli ve net bilimsel kanıt yoktur⁽³⁴⁾.

COVID-19 hastalığının serolojik tanısında antikor testlerinin yanı sıra viral proteinlerin saptanmasına yönelik antijen testleri de mevcuttur. SARS-CoV-2 antijen testleri genellikle virüsün nükleokapsid anti-

jeninin saptanmasına yönelik testler olup, solunum yolu örnekleri kullanılarak yapılır. Söz konusu hızlı antijen testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünün, nükleik asit temelli yöntemlere kıyasla düşük olduğu belirtilir. Yüksek viral yüke sahip olguların saptanmasında başarılı sonuçlar elde edilebilen, ancak hastada viral yükün düşük olması veya örnek tipine bağlı olarak hatalı negatif sonuç verebilen antijen testleri; çoğunlukla hızlı bir değerlendirmenin gerektiği ve PCR testinin yapılamadığı durumlarda kullanılır. Antijen testinin negatif sonuç vermesi durumunda enfeksiyonun dışlanmaması, hasta örneğinin daha yüksek duyarlılıkta olan PCR yöntemi ile değerlendirilmesi önerilir^(14,17,18).

Serolojik testler, duyarlılığın ve özgüllüğünün değişken olduğu bilinen, çapraz reaksiyona bağlı negatif sonuç verebilen test yöntemleri olduğu için COVID-19 hastalığının erken tanısında tek başına kullanılması önerilir⁽³⁵⁾. Antijen-antikor testlerinden daha çok kitlesel taramalarda, belirli bir toplulukta hastalığa karşı bağışıklık düzeyini saptamada, salgın sürecinde temaslıların takibinde, terapötik veya nötralizan antikor taşıyabilecek bireylerin tespitinde yararlanılır.

CRISPR Temelli Tanı Yaklaşımları

COVID-19 salgınında antikor testlerinin akut enfeksiyon döneminde kanda düşük antikor düzeyini saptamadaki kısıtlılığı, hızlı antijen testlerinin düşük özgüllük göstermesi, RT-PCR yönteminin uygulanmasından değerlendirilmesine kadar özel ekipman ve eğitimli personel gerektirmesi mikrobiyoloji laboratuvarlarında SARS-CoV-2 tanısında karşılaşılan başlıca güçlükler olarak dikkat çekmiştir^(24,36,37). Hızla artan olgu sayıları nedeniyle tanı test kapasitelerinin aşılması, yoğun laboratuvar prosesinin ardından hızla sonuç verme gereksinimi, SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda sekonder viral enfeksiyonların görülmesi durumları da COVID-19 tanısında zorlayıcı diğer etkenlerdir⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Karşılaşılan bu sorunlar enfeksiyon hastalıklarıyla mücadele açısından özgüllüğü yüksek, pratik, uygun maliyette, yenilikçi ve alternatif tanı yöntemlerinin gerekliliğini bir kez daha gözler önüne sermiştir. Son yıllarda geliştirilen yeni nesil tanı yöntemleri arasında viral nükleik asitlerin saptanmasına yönelik hassas

ve hızlı sonuç veren moleküler yaklaşımlar ön plana çıkar. 2020 Nobel Kimya ödülü alan CRISPR/Cas sisteminin de aralarında bulunduğu yeni nesil nükleik asit saptama yöntemleri; enfeksiyon etkenlerinin, zirai patojenlerin, RNA ile ilişki farklı hastalıkların tespitinde kullanıma potansiyelleri ile son yıllarda öne çıkmıştır⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrarlar) temelli tanı yöntemleri; viral enfeksiyonların tanısında umut vadeden yenilikçi yöntemlerin başında gelir. Bakterilerin kendilerini faj ve plazmid gibi yabancı genomik materyallere karşı korumak için oluşturdukları adaptif immün sistem olarak tanımlanan CRISPR/Cas sistemi temelde; yabancı genomik materyalin özgün bir bölgesini hedefleyen bir rehber RNA dizisi (gRNA) ve efektör Cas (CRISPR-associated nuclease) proteinlerinden oluşturur. Spacer (aralayıcı) ve repeat (tekrar) bölgelerinden oluşan genomik ve Cas komponentlerinden meydana gelen protein yapısıyla kompleks bir bütün olan bu sistem farklı sınıf, tip ve alt tiplerle bakteri ve arkelerin oluşturduğu savunma sistemidir⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. En net şekilde aydınlatılan ve çalışılan Tip 2 CRISPR/Cas9 sistemi; moleküler biyolojide büyük etki yaratarak ökaryotik hücrelerde gen düzenleme, gen terapisi, genetik mühendisliği uygulamalarının önünü açmıştır. Günümüzde genetik temelli bazı hastalıkların, kanserin, otoimmün sorunların ve daha pek çok hastalığın tedavisinde yeni, uyarlanabilir bir yaklaşım olan CRISPR teknolojisinden tarım, gıda, biyoenerji gibi pek çok farklı sahada da yararlanılmaktadır⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Enfeksiyon hastalıkları açısından CRISPR/Cas sisteminin en önemli etkisi ise Cas proteinlerinden yararlanılarak patojenlerin tanımlanması ve nükleik asit temelli tanı gerçekleştirilebilmesi olmuştur^(52,53). Pandemi öncesinde de bazı viral patojenlerin tanısında kullanılan CRISPR/Cas temelli tanı testleri COVID-19 pandemisiyle birlikte SARS-CoV-2 tanısına yönelik olarak adapte edilmiştir. Temel prensipleri hastadan alınan üst solunum yoluna ait örneklerden viral RNA'nın izolasyonu, uygun primerler vasıtasıyla tanı için hedeflenmiş gen bölgelerinin amplifikasyon yöntemleri ile çoğaltılması, seçilen uygun efektör Cas proteini ve hedef gen bölgesine komplementer reh-

ber RNA ile amplifikasyon ürününün bir araya getirilmesi sonucunda test sonucunun test stripleri üzerinden okunması üzerine kurulmuştur. RT-PCR testlerinin kısıtlılıkları göz önünde bulundurulduğunda daha yüksek özgüllük, uygun maliyet, kolay taşınabilme ve hızlı sonuç verme kapasiteleriyle CRISPR temelli tanı testleri belirli avantajlar sağlayabilir. Günümüzde FDA tarafından acil kullanım izni verilerek onaylanmış iki adet CRISPR temelli COVID-19 tanı testi vardır⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Özellikle CRISPR/Cas sistemindeki efektör proteinlerden Cas9, Cas12, Cas13, Cas3 kullanılarak tasarlanan tanı yöntemleri hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, uygun maliyette, kolay adapte edilebilir, kompakt ve taşınabilir yeni yaklaşımların ortaya çıkarılmasını sağlamıştır⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

Cas12: Tip V CRISPR/Cas sisteminin efektör proteini olan Cas12; özellikle gRNA (guide RNA) aracılığıyla ssDNA (single-stranded DNA) yapısında kesikler oluşturabilir ve gen düzenleme çalışmalarında tercih edilmektedir⁽⁵⁷⁾. 2018'de geliştirilen CRISPR Temelli DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) tanı kitinin ana prensibi, Cas12 proteini üzerinden DNA'nın tanımlanmasıdır⁽⁵⁸⁾. COVID-19 pandemisiyle birlikte SARS-CoV-2'nin korunmuş genomik bölgeleri olan N ve E bölgeleri üzerinden tanımlanmasını sağlayacak şekilde DETECTR tanı sistemi adapte edilmiştir⁽⁵⁹⁾. 2020 yılı temmuz ayında FDA tarafından COVID-19 tanısında "SARS-CoV-2 RNA DETECTR Assay" tanı kitinin kullanımı onaylanmıştır. Bu tanı kitinin temel uygulanma protokolü, COVID-19 şüphesiyle gelen hastanın üst solunum yoluna ait örneklerden (orofarenks, nazofarenks, burun sürüntüsü, nazofaringeal veya nazal aspirat) viral RNA'nın izolasyonu, izole edilen RNA'dan N ve E bölgelerinin uygun primerlerle RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) ile amplifikasyonu, hedef bölgelere spesifik crRNA (CRISPR-RNA)'ların Cas12a ile kompleks oluşturması ve oda sıcaklığında 2 dakikalık inkübasyon sonunda test sonucunun görsel olarak okunması şeklindedir. Bu yöntemle SARS-CoV-2 tanısında hasta örneklerinin alınmasından yaklaşık 40 dakika gibi oldukça kısa bir süre sonrasında test sonucunun gözlemlenebilmesi CRISPR temelli tanının önemli üstünlüklerinden birisi olarak değerlendirilir. Ayrıca testin duyarlılık

aralığının 10-50 kopya/μL olduğu bildirilmekte olup, düşük düzeyde viral nükleik asit varlığının dahi oldukça hassas saptanabildiğine işaret edilir. DETECTR testinin CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından önerilen RT-PCR testi ile karşılaştırıldığı 82 klinik örnekle yürütülen çalışmada, %100 özgüllük, %95 spesifiteyle çalıştığı bildirilmiştir^(38,55,59). Testin performansını düşüren en önemli faktör ise diğer moleküler yöntemlerde olduğu gibi, özellikle amplifikasyon öncesi ve sonrasında personel, kimyasallar veya ortama bağlı oluşabilecek kontaminasyonlardır⁽⁵⁹⁾.

Cas 13: Tip VI CRISPR/Cas sisteminin efektör proteini olan Cas13; ssRNA (single-stranded RNA) üzerinde uygun baz eşleşmesi sağlandığında RNase aktivitesi gösterir⁽⁶⁰⁾. Cas13; hedef bölge ve reporter moleküllerde kesimin gerçekleşmesi yoluyla nükleik asit temelinde tanının yapılmasına olanak sağlar. Cas13 kullanılarak 2017 yılında geliştirilen nükleik asit temelli tanımlama sistemi olan SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) testi, direkt hasta serum ve idrarından Zika ve Dengue virüs tayini için kullanılır. Bunlara ek olarak, COVID-19 pandemisiyle birlikte SHERLOCK protokolü; Orf1ab (yapısal olmayan proteinleri kodlayan gen) ve S geni üzerinden SARS-CoV-2 için adapte edilerek Mayıs 2020'de FDA tarafından kullanım onayı almıştır^(56,61-63). SHERLOCK testinin temel protokolü ise, COVID-19 şüphesiyle gelen hastadan alınan üst solunum yolu veya bronkoalveolar lavaj örneğinden viral RNA izolasyonu ile başlar. İlk aşamada, RT-LAMP ile SARS-CoV-2 RNA'sı DNA'ya reverse transkripte edilir. Sonrasında istenilen gen bölgesi amplifiye edilir ve ardından amplifiye edilmiş gen bölgeleri RNA'ya transkripte edilir. Hedef RNA sekansına göre programlanmış CRISPR kompleksinin (Cas13a:crRNA) aktivitesi sonucunda test stribinde renk değişikliği görsel olarak değerlendirilebilmektedir. SHERLOCK tanı testinin duyarlılık aralığı 10-100 kopya/μL'dir^(56,63). Ayrıca SHERLOCK tanı test protokolündeki iki adımı tek bir basamağa indirgeyen, hızlı viral RNA izolasyonu olanağı sunan ve floresans ışımaya şeklindeki test sonucunun akıllı telefon uygulamasıyla değerlendirilmesini sağlayan SHINE (Sherlock and Hudson Integration to Navigate Epidemics) Arizti-Sanz ve

arkadaşları tarafından geliştirilmiştir⁽⁶⁴⁾.

Mikroçip temelli CRISPR tanı sistemi olarak bilinen CARMEN (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids) paneli, insanlarda enfeksiyonlarla ilişkili 169 virüsün tanısına yönelik kapasiteye sahip olmakla birlikte, İnfluenza A'nın tiplendirilmesinde ve HIV ilaç direnç genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde kullanılır. COVID-19 pandemisiyle birlikte CARMEN test kiti adapte edilmiş olup, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ve MERS-CoV ile ayırımını yapabilmektedir. Dört yüzden fazla örneğin eşzamanlı olarak çalışabilmesine olanak tanıyan çoklu panel yapısıyla bu yöntemde çok sayıda örnekte pek çok farklı patojenin taranması olası olmaktadır⁽³⁸⁾. Özellikle salgın durumlarında olgu sayılarındaki artışa bağlı olarak daha hızlı, kolay, uygun maliyette, yoğun laboratuvar çalışması gerektirmeyen tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu kapsamda, CRISPR temelli tanı testleri, RT-PCR yönteminde mevcut bazı kısıtlılıkların aşılması açısından umut vadeden yeni moleküler yaklaşımlardan olup, son yıllarda bu alanda çalışmalar büyük ivme kazanmıştır.

Dünya genelinde yüz milyonun üzerinde kişinin virüsle enfekte olduğu ve bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan COVID-19 salgınıyla, enfeksiyon hastalıklarının kontrol altına alınabilmesi için erken dönemde, doğru ve hızlı sonuç veren tanı yöntemlerin önemi bir kez daha açıkça anlaşılmıştır. COVID-19 başta olmak üzere, tüm enfeksiyon hastalıklarıyla daha etkin mücadele açısından mevcut mikrobiyolojik tanı yöntemlerin optimizasyonuna ve yeni moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmaların büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gorbalenya A, Baker S, Baric R, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5:536-44. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
3. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
4. de Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):523-34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
5. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395:565-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
6. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-36. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
7. Boheemen SV, Graaf MD, Lauber C. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio.* 2013;3(6): e00473-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00473-12>
8. Jin Y, Yang H, Wangquan J, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses.* 2020;12(4):372. <https://doi.org/10.21608/nrmj.2020.118446>
9. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):E1-9. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.e1>
10. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of Coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708-20. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
11. Rothe C, Schunk M, Sothmann P, et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N Engl J Med.* 2020;382(10):970-1. <https://doi.org/10.1056/nejmc2001468>
12. Li D, Wang D, Dong J, et al. False-negative results of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: Role of deep-learning-based ct diagnosis and insights from two cases. *Korean J Radiol.* 2020;21(4):505-8. <https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0146>
13. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(5):453-4. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>

14. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 1-7, World Health Organization. [https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501] (Erişim tarihi: 19/01/2021).
15. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
16. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, et al. Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection. *ACS Nano.* 2020;14(4):3822-35. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>
17. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A narrative review. *Ann Intern Med.* 2020;172(11):726-34. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
18. Tang Y, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):e00512-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>
19. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020;323(22):2249-51. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>
20. Watson J, Whiting PF, Brush JE. Interpreting a COVID-19 test result. *BMJ.* 2020;369: 1-7. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1808>
21. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1070-6. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285>
22. Lu H, Stratton CW, Tang YW. An evolving approach to the laboratory assessment of COVID-19. *J Med Virol.* 2020;92:1812-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.25954>
23. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020;323(11):1061-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
24. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;71(16):2027-34. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>
25. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol.* 2020;30(3):e2106. <https://doi.org/10.1002/rmv.2106>
26. Yongchen Z, Shen H, Wang X, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):833-6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756699>
27. He J, Luo L, Luo Z et al. Diagnostic performance between CT and initial real-time RT-PCR for clinically suspected 2019 coronavirus disease (COVID-19) patients outside Wuhan, China. *Respir Med.* 2020;168:105980. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105980>
28. Patel R, Babady E, Theel E, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio.* 2020;11(2):e00722-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00722-20>
29. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: A prospective study. *Lancet.* 2003;361(9371):1767-72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13412-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13412-5)
30. Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics.* 2020;10(4):1-7. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040202>
31. Zhong L, Chuan J, Gong B, et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci China Life Sci.* 2020;63(5):777-80. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1688-9>
32. Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis.* 2020;94:49-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.065>
33. Zhao R, Li M, Song H, et al. Early detection of SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients as a serologic marker of infection. *Clin Infect Dis.* 2020;71(16):2066-72. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa523>
34. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun.* 2020;11(1):4704. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18450-4>
35. Ismail AA. Serological tests for COVID-19 antibodies: Limitations must be recognized. *Ann Clin Biochem.* 2020;57(4):274-6. <https://doi.org/10.1177/0004563220927053>
36. Kilic T, Weissleder R, Lee H. Molecular and immunological diagnostic tests of COVID-19: Current status and challenges. *iScience.* 2020;23(8):101406. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101406>
37. Woloshin S, Patel N, Kesselheim A. False negative tests for SARS-CoV-2 infection - challenges and implications.

- N Engl J Med. 2020;383(6): e38.
<https://doi.org/10.1056/NEJMp2015897>
38. Metsky HC, Freije CA, Kosoko-Thoroddsen TF, Sabeti PC, Myhrvold C. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. *bioRxiv*. 2020.02.26.967026.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.26.967026>
39. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*. 2018;360(6387):444-8.
<https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
40. Wang M, Wu Q, Xu W, et al. Clinical diagnosis of 8274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan. *medRxiv*. 2020.02.12.20022327.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.12.20022327>
41. Batista A, Pacheco L G C. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR- based programmable nucleic acid binding proteins. *J Microbiol Methods*. 2018;152, 98-104.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.024>
42. Bhattacharyya RP, Thakku SG, Hung DT. Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics. *ACS Infect Dis*. 2018;4(9):1278-82.
<https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.8b00170>
43. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends Biotechnol*. 2019;37(7):730-43.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
44. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006;4(7):1115-21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
45. Barrangou R. Nobel dreams come true for Doudna and Charpentier. *CRISPR J*. 2020;3(5):317-8.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2020.29109.rba>
46. Burmistrz M, Pyrc K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. *Pol J Microbiol*. 2015;64(3):193-202.
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0009.211>
47. Riordan SM, Heruth DP, Zhang LQ, Ye SQ. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell Biosci*. 2015; 5:33.
<https://doi.org/10.1186/s13578-015-0027-9>
48. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol*. 2015;100-11.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>
49. Fichtner F, Castellanos RU, Ulker B. Precision genetic modifications: A new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*. 2014;239(4):921-39.
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2029-y>
50. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
51. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-7.
<https://doi.org/10.1038/nature13011>
52. Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synth Biol*. 2020;9(6):1226-33.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00507>
53. Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/Cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. *Biosens Bioelectron*. 2020; 165:112430.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112430>
54. Berber B, Aydin C, Kocabas F, et al. Gene editing and RNAi approaches for COVID-19 diagnostics and therapeutics. *Gene Ther*. 2020;(Baskıda).
<https://doi.org/10.1038/s41434-020-00209-7>
55. U.S. Food & Drug Administration (FDA). Letter of authorization for SARS-CoV-2 RNA DETECTR assay. 2020.
[<https://www.fda.gov/media/139934/download>]. (Erişim tarihi: 21/01/2020)
56. U.S. Food & Drug Administration (FDA). Letter of authorization for Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 kit. 2020.
[<https://www.fda.gov/media/137747/download>]. (Erişim tarihi: 21/01/2020)
57. Yan W X, Hunnewell P, Alfonse L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*. 2019;363(6422):88-91.
<https://doi.org/10.1126/science.aav7271>
58. Chen J, Ma E, Harrington L, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018;360(6387):436-9.
<https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
59. Broughton JP, Deng W, Fasching CL, Singh J, Chiu C, Chen JS. A protocol for rapid detection of the 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR diagnostics: SARS-CoV-2 DETECTR.
[<https://mammoth.bio/wp-content/uploads/2020/03/Mammoth-Biosciences-A-protocol-for-rapid-detection-of-SARS-CoV-2-using-CRISPR-diagnostics-DETECTR.pdf>]. (Erişim Tarihi: 21/01/2021)
60. O'Connell MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas systems. *J Mol Biol*. 2019;431(1):66-87.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.029>
61. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017;356(6336):438-42.
<https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
62. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*. 2019;14(10):2986-3012.

<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>

63. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. [[https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20\(updated\).pdf](https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf)].
- (Erişim tarihi: 21/01/2020)
64. Arizti-sanz J, Freije CA, Stanton AC, et al. Integrated sample inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. bioRxiv. 2020.05.28.119131. <https://doi.org/10.1101/2020.05.28.119131>