

総説

産業動物における CRISPR-Cas システムを活用した PoC 診断検査について

土赤 忍

所属：大阪公立大学 獣医学研究科 大動物臨床医学研究グループ

所在地：大阪府泉佐野市りんくう往来北 1-58

TEL：(072) 463-5916

E-mail：stsuchiaka@omu.ac.jp

【要約】

COVID-19 のパンデミックをきっかけに、医学分野での臨床現場における感染症の Point of Care (PoC) 診断検査の需要は拡大した。WHO は臨床現場即時検査とも定義されるこの PoC 診断検査について“手頃な価格で、高感度、特異的で検査の工程が単純で分かりやすく、迅速かつ安定した反応性を有し、特別な機器を必要とせず、エンドユーザーに提供可能であること”を推奨している。しかし、これらの基準をすべて満たす病原体特異的な PoC 診断検査を一から構築することは困難である。そのため、既存の分子生物学的技術を活用した複合技術の開発が進んでおり、その中核を CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) /Cas (CRISPR associated) システムが担っている。このシステムがもつ標的に特異的に結合する特性と強力な切断活性をバイオセンサーとして利用し、COVID-19 を中心に様々な病原体の PoC 診断検査が生まれている。資材の乏しい医療現場や一次診療施設での活用が期待され、社会実装が進んでいる。一方、産業動物の臨床分野においては動物が飼育されている農場への往診が基本であり、検査を実施するまでのハードルは常に大きい。迅速診断技術の需要は高いものの、CRISPR/Cas システムを活用した PoC 診断検査は医学分野におけるほど現状では認知されていない。そこで本総説では、CRISPR/Cas を活用した分子生物学的検査の原理および現在までの医学分野での活用を中心に紹介する。また産業動物獣医療における活用と想定されるこれからの運用方法について考察する。

キーワード：分子生物学的検査、CRISPR/Cas システム、Point of Care 診断検査

はじめに

世界中での COVID-19 のパンデミックをきっかけに、医学分野において診療施設での Point of care (PoC) 診断検査の需要は拡大した。PoC 診断とは、医学分野における医療従事者が患者の傍らで行われる“臨床現場即時検査”と定義される。世界保健機関 (WHO) は、PoC 診断検査について、手頃な価格で検出感

度が高く、特異的で検査の工程が単純で分かりやすく、迅速かつ安定した反応性を有し、特別な機器を必要としないエンドユーザーに提供可能 - ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, and Deliverable to end users) であることを推奨している [15]。獣医領域、特に産業動物臨床の分野では往診による診療が基本であり、機器やコストの面で制限され、解析に至るまでのハードルが極めて大きい。医学分野以上に ASSURED を満たした検査法が求められている。

受付：2024年7月12日

受理：2024年7月16日

しかし、この基準をすべて満たす病原体特異的な PoC 診断技術を一から構築することは困難を極める。そこで、この大きな課題を達成するために既存技術を活用した複合技術の開発が進められている [2]。

産業動物臨床における PoC 診断技術として最も身近なものにイムノクロマト法による抗原検査が挙げられる。例えば、多因子性に発症する子牛の下痢症の診断のためにイムノクロマト法として、感染性因子として主要な原因となる 4 種の病原体を同時に検出可能なキットが国内で流通している。このような方法は、PCR 等に必要増幅ステップを経ずに抗原成分を直接検出することができる。しかし、その検出感度は一般的に PCR をはじめとした分子生物学的な手法には劣り、また検査の開発には病原体抗原に対する特異的な抗体が必要である [36]。病原体の変異株や新たな病原体に対応する検査を構築することが困難であることが一番の欠点だろう。

一方、Conventional PCR あるいは定量 PCR (qPCR) といった PCR 法による検査はその正確性、特異性、アッセイデザインが容易である点から病原体検出のゴールドスタンダードとして広く用いられている。特に qPCR は正確な定性、定量が可能な検査であり、医療、獣医療においても最も使用頻度の高い分子生物学的な検査法のひとつである [27, 28]。しかし、解析を行うためにはサーマルサイクラーをはじめとした機器や試薬の調整が必要である。このような機材を有するクリーンな実験室にサンプルを運ばなければ解析を行うことができないため、特に家畜保健所を中心として家畜感染症の検査に幅広く活用はされているものの、個々の診療所で運用できるような PoC 検査には程遠い。

PCR 法がもつ課題を解決する手法として Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) あるいは Recombinase protein amplification (RPA) といった等温核酸増幅法がある [17, 22, 23]。これらの等温増幅法は、単一温度で核酸増幅を行なうことから一定温度に保つための恒温槽以外は特別な機器は必要ない。例えば LAMP は PCR 法と比較して増幅効率が非常に高いことから、反応時間は短く、核酸増幅の副生成物であるピロリン酸マグネシウムが多量に生成され

る [21]。この副生成物の発生により生じた反応溶液の濁度をもとに目視で結果の判定を行うことが可能であるため、結果の判定が容易である。このような簡便さから、分子生物学的な手法の中では LAMP をはじめとした等温核酸増幅法が畜産現場において最も親和性が高い検査法であると考えられる。しかし、LAMP は多数のプライマーを設計するためプライマーダイマーが生じやすい点やコンタミネーションと非特異的増幅による偽陽性のリスクが否定できない [8]。以上の点から、現状ではこの検査を行えばすべてのニーズを満たせる、というような完全な検査はないといえる。

そこで、より ASSURED な検査を実現するために、それぞれの検査法がもつ短所を補い、これらの検査の長所を組み合わせた検査法が開発が進んでおり、実用化されている。その中心にある技術が CRISPR/Cas システムである。ゲノム編集技術として CRISPR/Cas9 が最もよく知られているが、このシステムがもつ標的に対して特異的に結合する特性と強力な切断活性はバイオセンサーとしても利用されている。具体的には、まず、CRISPR/Cas システムにより標的の病原体ゲノムは切断される。Cas が標的配列を認識することで、後述するコラテラル切断活性が生じ、サンプル中にあらかじめ添加してある標識一本鎖 DNA あるいは RNA を非特異的に切断し、これをシグナルとして検出する (図 1)。シグナルの検出方法は様々なものが試行されているが、イムノクロマトグラフィーに用いるラテラルフロー試験紙が最も臨床現場に即したものであると考える。特に 2020-2022 年の COVID-19 パンデミックの際に、CRISPR/Cas をベースとした診断システムが数多く出現している。現在のところ、検出感度の問題から CRISPR-Cas システムによる処理の前に対象ゲノムを PCR、PRA あるいは LAMP といった方法で前増幅する手法が主流となっているが [25]、増幅処理なしにサンプルに CRISPR/Cas システムの処理を行うのみで対象を検出する検査法も国内の研究者によって報告されている [26]。このような検査法を国内の産業動物獣医療の微生物検査へと運用が実現できれば、その後の防疫措置や診療に有用なものになるだろう。

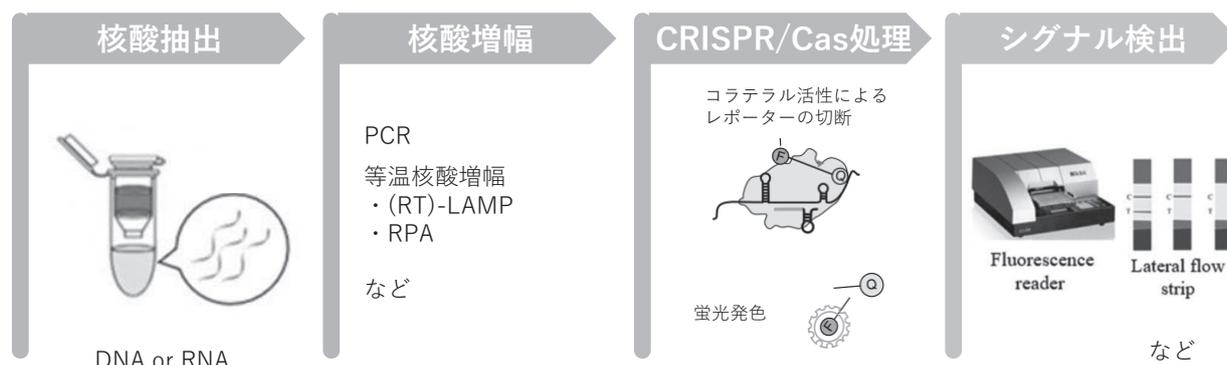


図1 CRISPR/Casシステムを用いたPoint of care診断検査法の概要 (文献4, 25をもとに作成)

CRISPR/Cas システムとは

CRISPR/Cas システムは、本来細菌や古細菌の内部に侵入してきたウイルスやファージなどの外来核酸を排除するための獲得免疫機構のことを指している [13]。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) は、その名前の通り“規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート配列 (回文構造) が密集して”1箇所あるいは複数箇所にゲノムに存在している DNA 領域のことである。CRISPR のゲノム配列は、スペーサー配列 (CRISPR RNA/crRNA に転写) とリピート配列 (trans-activating crRNA/tracrRNA に転写) で構成されている。また CRISPR の近傍にはヌクレアーゼである Cas (CRISPR-associated) タンパク群がコードされており、これらの構成と機能の違いから異なる2クラス、6タイプ、33サブタイプに分類されている [19]。CRISPR/Cas システムは標的とする核酸配列を特定し、切断するシステムであるが、Cas タンパクはハサミの役割を果たし、crRNA は別の領域にコードされている tracrRNA (trans-activating crRNA) の一部と相補的に結合し、標的核酸まで Cas をリクルートするガイド役 (ガイド RNA) となる。クラス1の CRISPR-Cas システムはタンパク質複合体 (CRISPR associated complex for antiviral defense, Cascade) をエフェクターとするが、クラス2のシステムでは単体のタンパク質がエフェクターとなる。これらのエフェクターが標的核酸を認識、分解するメカニズムの中心となる。CRISPR/Cas システムは微生物における獲得免

疫システムとして大きく以下の3つのフェーズとして説明することができる (図2) [3]。

1. Adaptation フェーズ (スペーサー配列の獲得)

ファージなどが微生物に感染し、初回に侵入してきた外来性の DNA に対しては、Cas1 と Cas2 タンパク質が機能し、外来性 DNA の Protospacer Adjacent Motif (PAM) と呼ばれる 2~3 bp を目印として認識され、その上流数十 bp (プロトスペーサー配列) を切り取る。多くの場合は自身の CRISPR 領域の 5' 末端側にスペーサー配列として挿入する。外来 DNA を自身に取り込むことで抗原情報として記憶し、次回以降の感染に備えることができる。

2. Biogenesis フェーズ (crRNA プロセッシング)

スペーサー配列として挿入済の外来 DNA が再度侵入してきた場合に、このスペーサー配列が獲得免疫の“記憶”の機能を果たす。このスペーサー配列を含めた CRISPR 配列は pre-crRNA として転写後、Cas タンパク質によってリピート部分が切断されて成熟 crRNA となる。

3. Interference フェーズ (外来 DNA の分解)

crRNA は tracrRNA と結合し、5' 側が標的配列に対して相補的なガイド RNA となる。更にこのガイド RNA は tracrRNA が足場となり Cas タンパク質と複合体を形成する。ガイド RNA と外来 DNA が相補的な配列を持つ場合は、PAM 配列の認識とともに結合し、標的的特異的な切断が生じる。

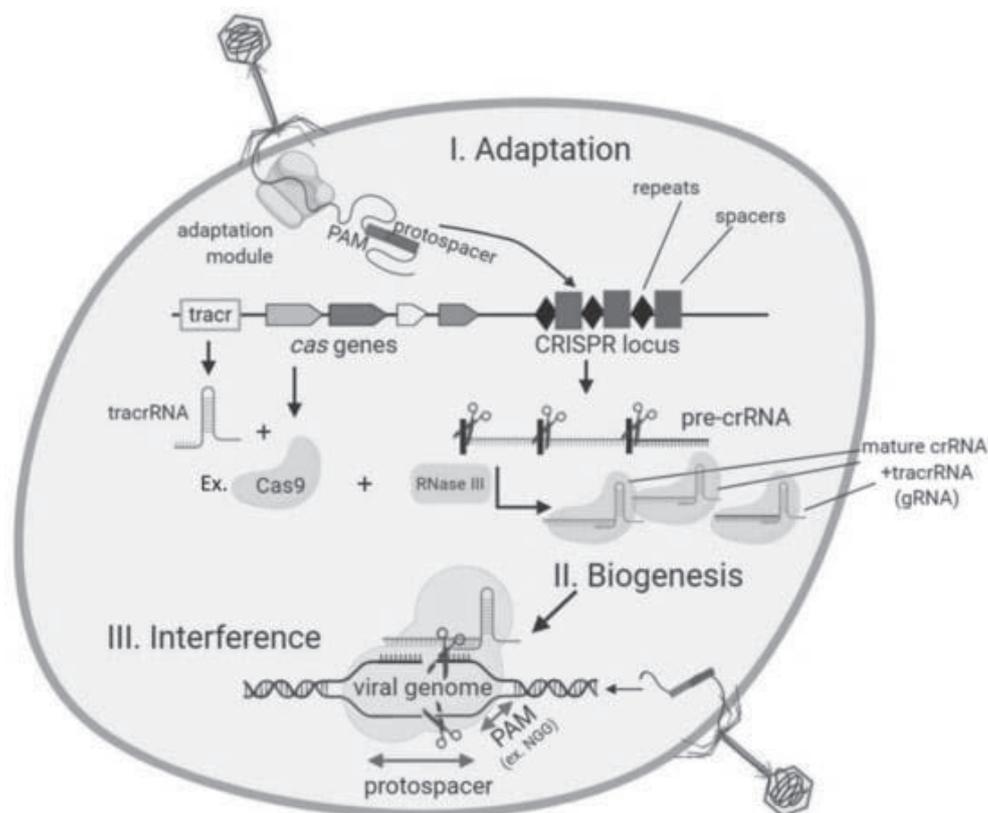


図2 CRISPR/Casの獲得免疫メカニズム (文献3より引用)

CRISPR/Cas 診断技術

ゲノム編集技術として最もよく知られている CRISPR/Cas9 以外にも、様々なタイプの CRISPR/Cas システムについてその認識・切断メカニズムが調べられた。その過程で、CRISPR/cas12a および CRISPR/cas13a が標的配列を認識した際に、標的配列以外の核酸も同時に切断することが報告された [5, 11]。CRISPR/Cas9 システムにはこの非特異的な切断活性はなく、標的配列の切断に付帯して生じる活性であることからコラテラル切断活性と呼ばれる。CRISPR-Cas12a は一本鎖 DNA に対して、CRISPR-Cas13a は一本鎖 RNA に対するコラテラル切断活性を有する。この分解活性を利用し、蛍光色素で標識した核酸を分解させることでシグナルとして可視化させる方法が CRISPR 診断技術である。代表的な方法である DETECTR 法と SHERLOCK 法を紹介する。また日本で発見されクラス I に属する CRISPR/Cas3 を用いて開発された CONAN 法についても紹介する。

1. DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans-reporter) 法

CRISPR-Cas12a は 2015 年に同定され、Cas9 と同様に二本鎖 DNA を認識することが発見された [39]。その切断機構の解析が進む中で、標的 DNA 配列を認識した際に非特異的な一本鎖 DNA 切断活性が発見され、このコラテラル切断活性を利用した核酸検出法である DETECTR 法が開発された [4, 5]。同研究グループが創設した Mammoth Biosciences 社が、この技術を用いた COVID-19 検査法を開発している。原法ではサンプル DNA を RPA により増幅した後、CRISPR/Cas12a システムを用いたコラテラル切断によりシグナル検出を行なう (図 3)。

2. SHERLOCK (Specific High sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) 法

CRISPR/Cas13a は一本鎖 RNA を標的として認識、切断するものとして同定された [1]。CRISPR-Cas13a は同様に標的 RNA 配列を認識することで、コラテラル活性が生じ非特異的に

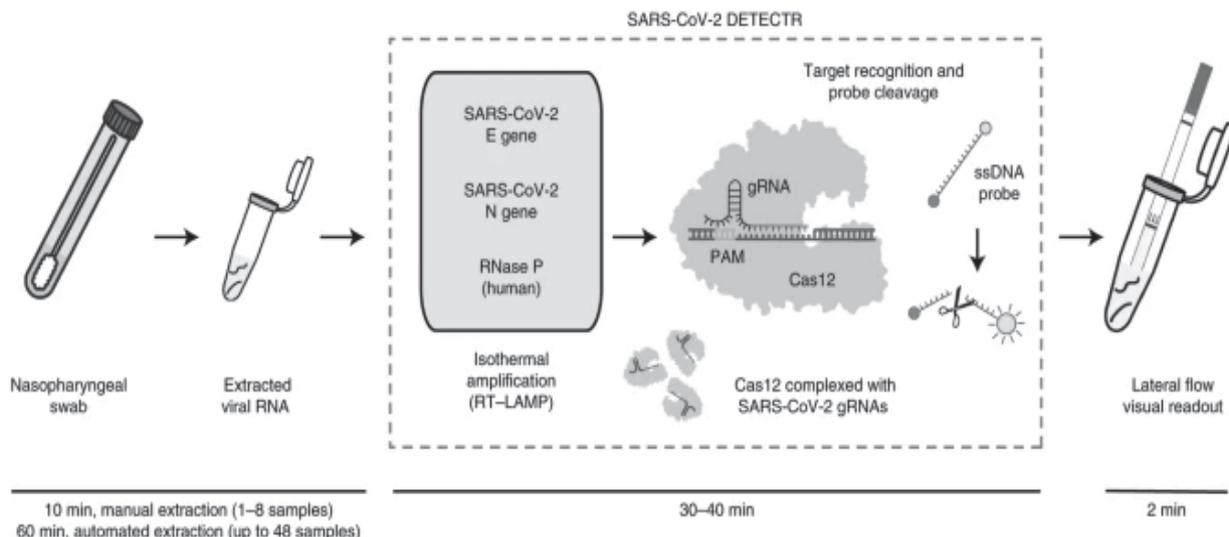


図3 DETECTR法の概要 (文献4より引用)

RNAを切断する。この切断機構を活用した核酸検出法はSHERLOCK法と呼ばれる [14]。CRISPR/Cas12aと異なり、RNAが対象となる。具体的には、T7プロモーター配列を付与したプライマーで標的核酸を増幅後、*in vitro* transcriptionにより一本鎖RNAを合成し、CRISPR/Cas13aにて処理を行う。コラテラル切断活性が生じた場合、プローブが切断され、シグナルが生じる。このシグナルを検知する方法である (図4)。更にマルチプレックス化されたSHERLOCKv2は複数のRNAウイルスを高感度で検出することに成功している [10]。

3. CONAN (Cas3-Operated Nucleic Acid detection) 法

上述した Cas9, Cas12a および Cas13a はいず

れもクラス2に分類されるものである。Cascadeと呼ばれる複数のCasタンパク質の複合体がエフェクターとして機能するクラス1はその機構が複雑であるため [7, 24]、クラス2に比べてCRISPR診断技術への応用は少ないが、Yoshimiらが発見したCRISPR/Cas3はCas12aと同様に標的DNA配列を認識した際に周辺の本鎖DNAも分解するコラテラル切断活性を持つことを発見し、CONAN法としてCOVID-19のPoC診断技術として確立している [37]。彼らの方法では、サンプルとなるDNAをLAMPで増幅した後、CRISPR/Cas3系を用いてプローブをコラテラル切断し、イムノクロマトグラフィー法による検出を行っている (図5)。

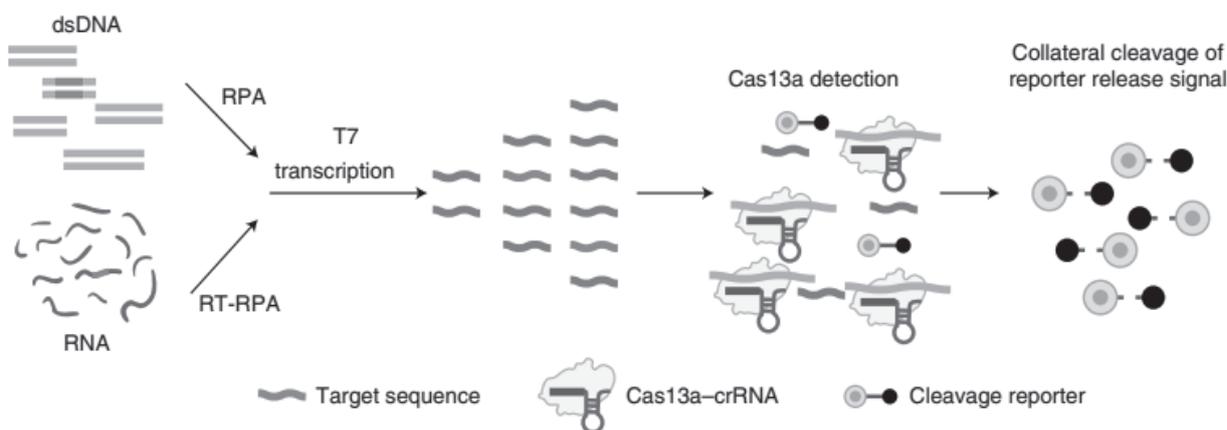


図4 SHERLOCK法の概要 (文献14より引用)

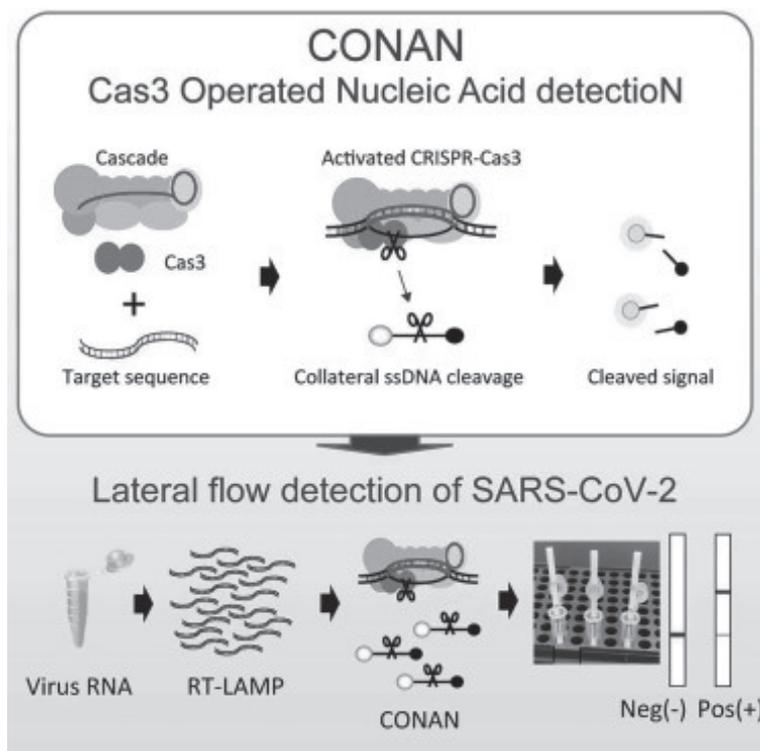


図5 CONAN法の概要 (文献37より引用)

産業動物分野における CRISPR-Cas 診断技術の活用

CRISPR/Cas12 および CRISPR/Cas13 の「付随的な」切断特性は、家畜のウイルス、細菌、寄生虫を含むさまざまな病原体の *in vitro* 検出にも活用されている。例えばアフリカ豚熱ウイルス (ASFV) は感染性と病原性が高いウイルスである。有効なワクチンや抗ウイルス薬は存在しないため ASFV 感染を制御のための検査法が必要とされており [9]、Cas13a (CRISPR/Cas13a-LFD) または Cas12a (RAVI-CRISPR) のコラテラル切断活性と等温増幅を組み合わせた診断法が報告されている [29, 32]。主に恒温装置がこれらのアッセイを実施するために必要な機器であり、ASFV 検出のための現場での適用可能性を示している。これらの方法は、高感度 (Limit of detection (LoD): 7 ~ 10 コピー / μ L) かつ高特異性であり、シングルチューブ反応であるため、コンタミネーションの可能性が低い。加えて CRISPR/Cas13a-LFD 法に比べ、RAVI-CRISPR 法は、ラテラル・フロー・ストリップや蛍光検出器を必要とせず安価である。RAVI-CRISPR 法は、ROX 標識レポーターを用いて肉眼での検出を可能としている [33]。

また Liu らは、豚の臨床鑑別診断が重要である PEDV (豚流行性下痢ウイルス)、TGEV (豚伝染性胃腸炎ウイルス)、PDCoV (豚デルタコロナウイルス)、ブタ急性下痢症候群コロナウイルス (SADS-CoV) を同時に検出するシングルチューブマルチプレックス T-LAMP-Cas12a 診断法を開発している [18]。裸眼比色検出では、LOD は 1 コピーであり、所要時間はわずか 25 分である。これらの CRISPR/Cas12a ベースのアッセイは、異なる検出目的を持ち、様々な応用が期待できるだろう。そのほか等温増幅と CRISPR/Cas12a または CRISPR/Cas13a のコラテラル切断活性を組み合わせる戦略は、3 型豚サーコウイルス [40]、脳心筋炎ウイルス [31]、牛のランピースキン病ウイルス [12]、牛伝染性下痢ウイルス [35]、カプリポックスウイルスで報告がある [6]。これらの診断法は、再現性の高い安定した反応を示し、検出感度、特異性も高い結果が得られている。十分な評価は必要であるが、水際防疫のための検査への応用なども可能であるかもしれない。

Cas12a は DNA エンドヌクレアーゼであり、逆転写反応が不要であることから DNA を対象とした細菌検査あるいは寄生虫の検査にも使用

できる。例えばブルセラ属菌は、イヌ、ウシ、ヒツジ、ブタにも広範なブルセラ症を引き起こす可能性がある。ブルセラ属の4つの菌種 (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis*, *Brucella suis*) は、ヒトと動物の間で感染する可能性があり、畜産労働者の職業リスクにつながる [20]。血液と牛乳サンプル中のこれらの4つのブルセラ属菌を迅速かつ正確に検出することがRPA-CRISPR/Cas12a 診断法によって可能となっている [34]。他にもRPA-CRISPR/Cas12a 戦略は、生産動物における他の食品由来病原性細菌の検出にも使用されている [30, 42]。

Cryptosporidium parvum (*C. parvum*) は人獣共通感染症の重要な腸内原虫で、世界中のヒトおよび家畜/野生動物にクリプトスポリジウム症を引き起こす可能性がある。RPA-Cas12a/crRNA に基づく診断法は、ヒトおよびウシの臨床糞便検体から *C. parvum* 亜型 IId を検出するために検証されている [38]。*Toxoplasma gondii* は世界的に分布する原虫で、免疫不全患者の生命を脅かすだけでなく、家畜の流産や死産を引き起こす。RPA または Recombinase Aided Amplification (RAA) と組み合わせて、CRISPR-Cas12a/Cas13a に基づく方法が *T. gondii* の迅速な現場での検出技術として報告されている [16, 41]。

おわりに

これらの技術を活用しても、変異株や新規病原体への対応は難しく、さらに寄生虫あるいは芽胞形成菌など、核酸抽出効率が検査結果に大きく影響する微生物も存在し、解決すべき問題は残されている。しかし、たゆまぬ試行錯誤により理想的な PoC 検査へと近づいていると考えられる。近い将来、それぞれの診療施設でも気軽に実施可能な分子生物学的な検査は登場するだろう。本稿で紹介したもの以外にも、CRISPR-Cas システムを使用したアプリケーションは無数に開発されている。

検出技術の革新が進む一方で、臨床現場で検査を行う意義あるいは防疫の観点からどう検出技術を現場の対応につなげていくか議論を深めていく必要がある。直接的に治療やその後の対応につながるような検査でなければ、特に臨床

の現場で用いる検査としては根付いていかないだろう。それぞれの現場の獣医師と各研究機関による連携が何よりも重要であると考えられる。

【参考文献】

- [1] Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V. and Zhang, F. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 353 (6299) : aaf5573.
- [2] Aman, R., Mahas, A. and Mahfouz, M. 2020. Nucleic Acid Detection Using CRISPR/Cas Biosensing Technologies. *ACS Synth. Biol.* 9 (6) : 1226-1233.
- [3] Arroyo-Olarte, R. D., Rodríguez, R. B. and Morales-Ríos, E. 2021. Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond. *Microorganisms*. 9 (4) : 844.
- [4] Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C.-Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S. and Chiu, C. Y. 2020. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* 38 (7) : 870-874.
- [5] Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Costa, M. D., Tian, X., Palefsky, J. M. and Doudna, J. A. 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 360 (6387) : 436-439.
- [6] Chen, X., Nie, F., Xiong, Y., Lin, L., Shi, M., Yang, J., Wang, Y., Wang, G., Li, Y., Huo, D. and Hou, C. 2022. Ultra-sensitive and point-of-care detection of Capripoxvirus (CaPV) based on loop-mediated amplification (LAMP) and trans-cleavage activity of CRISPR/Cpf1. *Anal. Chim. Acta.* 1191 339330.
- [7] Chowdhury, S., Carter, J., Rollins, M. F., Golden, S. M., Jackson, R. N., Hoffmann, C., Nosaka, L., Bondy-Denomy, J., Maxwell, K. L., Davidson, A. R., Fischer, E. R., Lander, G. C. and Wiedenheft, B. 2017. Structure Reveals Mechanisms of Viral Suppressors that Intercept a CRISPR RNA-Guided Surveillance Complex. *Cell*. 169 (1) : 47-57.e11.
- [8] Dong, M., Kshirsagar, A., Politza, A. J. and Guan, W. 2024. High Fidelity Machine-Learning-Assisted False Positive Discrimination in Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Nanopore-Based Sizing and Counting. *ACS Nano*. 18 (9) : 7170-

- 7179.
- [9] Garigliany, M., Desmecht, D., Tignon, M., Cassart, D., Lesenfant, C., Paternostre, J., Volpe, R., Cay, A. B., Berg, T. van den and Linden, A. 2019. Phylogeographic Analysis of African Swine Fever Virus, Western Europe, 2018 - Volume 25, Number 1—January 2019 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 25 (1) : 184-186.
- [10] Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J. and Zhang, F. 2018. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 360 (6387) : 439-444.
- [11] Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J. and Zhang, F. 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 356 (6336) : 438-442.
- [12] Jiang, C., Tao, D., Geng, Y., Yang, H., Xu, B., Chen, Y., Hu, C., Chen, H., Xie, S. and Guo, A. 2022. Sensitive and Specific Detection of Lumpy Skin Disease Virus in Cattle by CRISPR-Cas12a Fluorescent Assay Coupled with Recombinase Polymerase Amplification. *Genes*. 13 (5) : 734.
- [13] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337 (6096) : 816-821.
- [14] Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O. and Zhang, F. 2019. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat. Protoc.* 14 (10) : 2986-3012.
- [15] Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X.-S., Ramsay, A. R. and Peeling, R. W. 2019. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat. Microbiol.* 4 (1) : 46-54.
- [16] Lei, R., Li, L., Wu, P., Fei, X., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, D., Zhang, Q., Yang, N. and Wang, X. 2022. RPA/CRISPR/Cas12a-Based On-Site and Rapid Nucleic Acid Detection of *Toxoplasma gondii* in the Environment. *ACS Synth. Biol.* 11 (5) : 1772-1781.
- [17] Li, Y., Fan, P., Zhou, S. and Zhang, L. 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb. Pathog.* 107 54-61.
- [18] Liu, J., Tao, D., Chen, X., Shen, L., Zhu, L., Xu, B., Liu, H., Zhao, S., Li, X., Liu, X., Xie, S. and Niu, L. 2022. Detection of Four Porcine Enteric Coronaviruses Using CRISPR-Cas12a Combined with Multiplex Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Viruses*. 14 (4) : 833.
- [19] Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R. A., Backofen, R., Oost, J. van der, Barrangou, R. and Koonin, E. V. 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 18 (2) : 67-83.
- [20] Moreno, E. 2020. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiol. Rev.* 45 (1) : fuaa045.
- [21] Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. 2001. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (1) : 150-154.
- [22] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28 (12) : e63-e63.
- [23] Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. and Armes, N. A. 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol.* 4 (7) : e204.
- [24] Sashital, D. G., Wiedenheft, B. and Doudna, J. A. 2012. Mechanism of Foreign DNA Selection in a Bacterial Adaptive Immune System. *Mol. Cell.* 46 (5) : 606-615.
- [25] Selvam, K., Najib, M. A., Khalid, M. F., Mohamad, S., Palaz, F., Ozsoz, M. and Aziah, I. 2021. RT-LAMP CRISPR-Cas12/13-Based SARS-CoV-2 Detection Methods. *Diagnostics*. 11 (9) : 1646.
- [26] Shinoda, H., Iida, T., Makino, A., Yoshimura, M., Ishikawa, J., Ando, J., Murai, K., Sugiyama, K., Muramoto, Y., Nakano, M., Kiga, K., Cui, L., Nureki, O., Takeuchi, H., Noda, T., Nishimasu, H. and Watanabe, R. 2022. Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis. *Commun. Biol.* 5 (1) : 473.
- [27] Singanayagam, A., Patel, M., Charlett, A., Bernal, J. L., Saliba, V., Ellis, J., Ladhani, S., Zambon, M. and Gopal, R. 2020. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveillance*. 25 (32) : 2001483.

- [28] Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M., Omatsu, T. and Mizutani, T. 2020. Development of a one-run real-time pcr detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*. 82 (2) : 217-223.
- [29] Tao, D., Liu, J., Nie, X., Xu, B., Tran-Thi, T.-N., Niu, L., Liu, X., Ruan, J., Lan, X., Peng, G., Sun, L., Ma, Y., Li, X., Li, C., Zhao, S. and Xie, S. 2020. Application of CRISPR-Cas12a Enhanced Fluorescence Assay Coupled with Nucleic Acid Amplification for the Sensitive Detection of African Swine Fever Virus. *ACS Synth. Biol.* 9 (9) : 2339-2350.
- [30] Wang, Y., Ke, Y., Liu, W., Sun, Y. and Ding, X. 2020. A One-Pot Toolbox Based on Cas12a/crRNA Enables Rapid Foodborne Pathogen Detection at Attomolar Level. *ACS Sens.* 5 (5) : 1427-1435.
- [31] Wei, N., Xiong, J., Ma, J., Ye, J., Si, Y. and Cao, S. 2022. Development of efficient, sensitive, and specific detection method for Encephalomyocarditis virus based on CRISPR/Cas13a. *J. Virol. Methods*. 309 114592.
- [32] Wei, N., Zheng, B., Niu, J., Chen, T., Ye, J., Si, Y. and Cao, S. 2022. Rapid Detection of Genotype II African Swine Fever Virus Using CRISPR Cas13a-Based Lateral Flow Strip. *Viruses*. 14 (2) : 179.
- [33] Xie, S., Tao, D., Fu, Y., Xu, B., Tang, Y., Steinaa, L., Hemmink, J. D., Pan, W., Huang, X., Nie, X., Zhao, C., Ruan, J., Zhang, Y., Han, J., Fu, L., Ma, Y., Li, X., Liu, X. and Zhao, S. 2022. Rapid Visual CRISPR Assay: A Naked-Eye Colorimetric Detection Method for Nucleic Acids Based on CRISPR/Cas12a and a Convolutional Neural Network. *ACS Synth. Biol.* 11 (1) : 383-396.
- [34] Xu, J., Ma, J., Li, Y., Kang, L., Yuan, B., Li, S., Chao, J., Wang, L., Wang, J., Su, S. and Yuan, Y. 2022. A general RPA-CRISPR/Cas12a sensing platform for *Brucella* spp. detection in blood and milk samples. *Sens. Actuators B: Chem.* 364 131864.
- [35] Yao, R., Xu, Y., Wang, L., Wang, D., Ren, L., Ren, C., Li, C., Li, X., Ni, W., He, Y., Hu, R., Guo, T., Li, Y., Li, L., Wang, X. and Hu, S. 2021. CRISPR-Cas13a-Based Detection for Bovine Viral Diarrhea Virus. *Front. Vet. Sci.* 8 603919.
- [36] Yoon, S. H., Kim, H. R. and Ahn, J. G. 2021. Diagnostic Accuracy of Immunochromatographic Tests for the Detection of Norovirus in Stool Specimens: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Microbiol. Spectr.* 9 (1) : e00467-21.
- [37] Yoshimi, K., Takeshita, K., Yamayoshi, S., Shibumura, S., Yamauchi, Y., Yamamoto, M., Yotsuyanagi, H., Kawaoka, Y. and Mashimo, T. 2022. CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus. *iScience*. 25 (2) : 103830.
- [38] Yu, F., Zhang, K., Wang, Y., Li, D., Cui, Z., Huang, J., Zhang, S., Li, X. and Zhang, L. 2021. CRISPR/Cas12a-based on-site diagnostics of *Cryptosporidium parvum* IId-subtype-family from human and cattle fecal samples. *Parasites Vectors*. 14 (1) : 208.
- [39] Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V. and Zhang, F. 2015. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 163 (3) : 759-771.
- [40] Zhang, W., Xu, L., Liu, Q., Cao, Y., Yang, K., Song, X., Shao, Y., Tu, J. and Qi, K. 2021. Enzymatic recombinase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for ultrasensitive, rapid, and specific Porcine circovirus 3 detection. *Mol. Cell. Probes*. 60 101772.
- [41] Zhao, J., Li, Y., Xue, Q., Zhu, Z., Zou, M. and Fang, F. 2022. A novel rapid visual detection assay for *Toxoplasma gondii* combining recombinase-aided amplification and lateral flow dipstick coupled with CRISPR-Cas13a fluorescence (RAA-Cas13a-LFD). *Parasite*. 29 21.
- [42] Zhi, S., Shen, J., Li, X., Jiang, Y., Xue, J., Fang, T., Xu, J., Wang, X., Cao, Y., Yang, D., Yao, Z. and Yu, D. 2022. Development of Recombinase-Aided Amplification (RAA)-Exo-Probe and RAA-CRISPR/Cas12a Assays for Rapid Detection of *Campylobacter jejuni* in Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* 70 (30) : 9557-9566.

Point of care diagnostic test using the CRISPR-Cas system for farm animals

Shinobu Tsuchiaka

Department of Veterinary Science, Graduate School of Veterinary Science, Osaka Metropolitan University
1-58 Rinku-oraikita, Isumisano, Osaka 598-8531
TEL: +81-72-463-5916
E-mail: stsuchiaka@omu.ac.jp

[Abstract]

The COVID-19 pandemic led to increased demand for Point of Care (PoC) diagnostic tests for infectious diseases in clinical practice in the medical field. WHO recommends that PoC diagnostic tests be affordable, sensitive, specific, rapid, robust, instrument-free, and available to end users. However, it is difficult to construct pathogen-specific PoC diagnostic tests that meet all these criteria from scratch. For this reason, development of combined technologies utilizing existing molecular biological techniques is underway, with the CRISPR/Cas system playing a central role. The system's target-specific binding properties and strong cleavage activity have been used as biosensors to create PoC diagnostic tests for various pathogens, mainly COVID-19. The system is expected to be utilized in the medical field and primary care facilities in situations where materials are scarce, and social implementation is progressing. On the other hand, in the clinical field of farm animals, onsite visits to farms where animals are kept are fundamental, and the hurdles to implementing tests are always great. Although there is a high demand for rapid diagnostic technology, PoC diagnostic tests utilizing the CRISPR/Cas system are currently not as well recognized as those in the medical field. The author believes that these PoC tests have a greater affinity for clinical use in industrial animals than in the medical field. In this review, the author introduces the principle of molecular biological testing using CRISPR/Cas and its application in the medical field to date. The author will also discuss its use in veterinary medicine for farm animals and its possible future applications.

Keywords: CRISPR/Cas system, molecular biological testing, point of care diagnostic testing