

## La tecnología de amplificación mediada por recombinasas y polimerasas para detectar al SARS-Cov2

Rogelio González-González<sup>1</sup>, Paola García Medel<sup>1</sup>, Francisco Cordoba<sup>1,2</sup>, Antolín Peralta-Castro,<sup>1</sup> Atzimba Y. Castro-Lara<sup>1</sup>, Corina Díaz-Quezada<sup>1</sup>, Agustino Martínez-Antonio<sup>2</sup>, Luis G. Briebe\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Unidad de Genómica Avanzada. Cinvestav. Carretera Irapuato-León Km 9.6, Irapuato, Guanajuato, México, 033600*

<sup>2</sup> *Laboratorio de Ingeniería Biológica. Departamento de Ingeniería Genética, Cinvestav Unidad Irapuato. Carretera Irapuato-León Km 9.6, Irapuato, Guanajuato, México, 36824*

*\*luis.briebe@cinvestav.mx*

### RESUMEN

SARS-CoV-2 es el agente viral causante del COVID-19. Enfermedad altamente transmisible y que se ha convertido en una pandemia. La detección del SARS-CoV-2 consiste en aislar e inactivar partículas virales de individuos portadores por medio de un frotis nasofaríngeo. Para esto, el material genético de las partículas virales se amplifica de manera selectiva para su identificación. Dado que el SARS-CoV-2 es un virus de ARN, primero se lleva a cabo una reacción de transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) para copiar el genoma del virus como ADN. Posteriormente, regiones de este ADN complementario (cDNA) son amplificadas exponencialmente por una reacción de polimerasa en cadena (PCR). La amplificación del genoma del SARS-CoV-2 es indicativo de la presencia del virus. La variante conocida como PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es el método más eficaz para detectar la presencia del SARS-CoV-2. Sin embargo, esta técnica solamente se puede llevar a cabo en laboratorios especializados y en nuestro país es que no contamos con suficientes equipos y el costo por análisis de muestra resulta elevado. Dado estas limitaciones es necesario desarrollar técnicas que no ocupen equipos especializados y a su vez sigan siendo confiables. Existen dos pruebas que cumplen estos requisitos, la prueba de amplificación isotermal mediada por lazo (LAMP, por sus siglas en inglés) y la de polimerización-amplificación mediada por recombinasa (RPA, por sus siglas en inglés). En el presente escrito discutiremos los principios de la prueba de RPA y su uso para detectar al SARS-CoV-2.

**Palabras clave:** COVID-19; detección isotermal; polimerización-amplificación mediada por recombinasa

## ABSTRACT

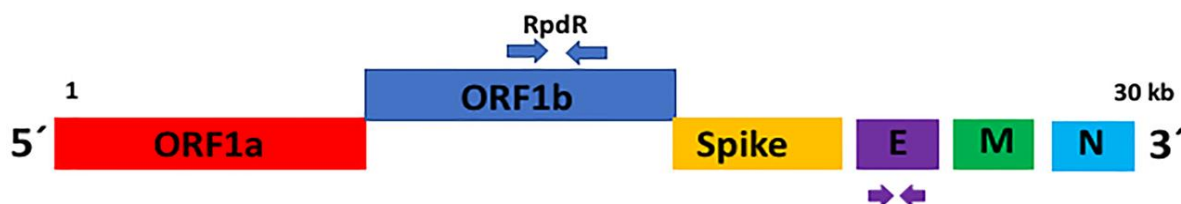
SARS-CoV-2 is the viral agent that causes COVID-19. Highly transmittable disease that has become a pandemic. The detection of SARS-CoV-2 consists of isolating and inactivating viral particles from carriers by means of a nasopharyngeal swap. For this, the genetic material of the viral particles is selectively amplified for identification. Since SARS-CoV-2 is an RNA virus, a reverse transcription (RT) reaction is first carried out to copy the virus genome as DNA. Subsequently, regions of this complementary DNA (cDNA) are exponentially amplified by a polymerase chain reaction (PCR). The amplification of the SARS-CoV-2 genome is indicative of the presence of the virus. The variant known as real-time PCR or quantitative PCR (qPCR) is the most efficient method to detect the presence of SARS-CoV-2. However, this technique can only be carried out in specialized laboratories and in our country, we do not have enough equipment and the cost per sample analysis is high. Given these limitations, it is necessary to develop techniques that do not occupy specialized equipment and in turn remain reliable. There are two tests that meet these requirements, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test and the recombinase-mediated polymerization-amplification (RPA) test. In this writing we will discuss the principles of the RPA test and its use to detect SARS-CoV-2.

**Keywords:** COVID-19; isothermal detection, recombinase-mediated polymerization-amplification

## INTRODUCCIÓN

El SARS-Cov2 es un beta-coronavirus que se clasifica dentro de la familia *Coronaviridae*. El genoma del SARS-Cov2 tiene un tamaño aproximado de 30,000 bases nucleotídicas (30 kb) de ARN de cadena sencilla positiva (+ssARN) que codifica para 4 proteínas denominadas: spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) y dos

marcos de lectura abiertos denominados ORF1 y ORF1b, que codifican para otras 16 proteínas indispensables para la replicación del virus y son denominadas proteínas no estructurales, entre estas proteínas destacan la ARN polimerasa dependiente de ARN y la ARN helicasa codificada en el ORF1b y una proteasa de cisteínas codificada por el ORF1a (Fig.1).



**Fig. 1 Organización genómica del SARS-CoV-2** El genoma viral consta de dos genes grandes: ORF1a y ORF1b, que codifican para proteínas no estructurales (NSP), incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), mientras que la región genómica estructural más pequeña alberga los genes S, E, M y N, que codifican para las proteínas estructurales. El protocolo de Berlín para detectar el SARS-Cov-2 se basa en el uso de oligonucleótidos que selectivamente amplifican las regiones correspondientes a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RpdR) y el gen de envoltura (E).

Dada la naturaleza del genoma del SARS-CoV-2 en forma de ARN, se necesita que el ARN genómico del virus sea primero traducido a ADN por una reversa transcriptasa (RT) antes de llevar a cabo su amplificación por la técnica de PCR (Chan, Yip et al., 2020, Spiteri, Fielding et al., 2020). La amplificación del genoma del SARS-CoV-2 por la reacción de reversa transcriptasa acoplada a la reacción de polimerasa en cadena (RT-PCR), es tan sensible que necesita menos de 10 copias iniciales de genoma del virus para dar una señal positiva. La RT más utilizada es la del virus de leucemia murino (MMLV-RT) y existen variantes termo resistentes que permiten llevar a cabo esta reacción a 55 o 70 °C (Baba, Kakue et al., 2017). Los protocolos de qPCR utilizados para detectar SARS-CoV-2 utilizan un paso de transcripción reversa a 55°C de 10 a 20 min. La temperatura es importante para evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN y por lo tanto se necesita realizar la reacción de transcripción reversa a las temperaturas mas altas a las que la enzima transcriptasa reversa mantenga su actividad. A nivel mundial se han adoptado principalmente dos protocolos para detectar al SARS-CoV-2 por RT-PCR. Estos protocolos consisten en juegos de oligonucleótidos específicos para amplificar de manera específica el genoma del SARS-CoV-2: el protocolo del Berlín y el protocolo del Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos. En el caso del protocolo de Berlín la reacción de PCR consiste en un ciclo de desnaturalización de 95°C por 3 min después 45 ciclos de 95°C

por 15 segundos y 58 °C por 30 segundos usando la enzima Taq DNA polimerasa que amplifican de forma selectiva regiones de que corresponden al gen E y a la RpRd (**Fig.1**). En el caso del protocolo de la CDC se sigue un proceso similar, pero se fundamenta en amplificar el gen N (Chen, Hsieh et al., 2020, Corman, Landt et al., 2020). Numerosos laboratorios han ampliado el protocolo de PCR en tiempo real y desarrollado protocolos basados en PCR multiplex que permite la prueba simultánea de conjuntos de oligonucleótidos para las regiones de los genes RdRP, N, E y S, todo en una sola reacción (Park, Won et al., 2020). A pesar de la eficacia de la reacción de qRT-PCR para detectar al SARS-CoV-2, este protocolo tiene varios inconvenientes, primero el termociclador puede tener un costo de \$30,000 a \$70,000 USD (dependiendo el modelo y la capacidad de lectura de las reacciones en tiempo real), los reactivos son caros y requieren refrigeración con manejos cuidadosos, los tiempos de respuesta involucran horas y requieren de un especialista para operar la maquinaria e interpretación de los resultados.

Es por demás evidente que ante la pandemia del SARS-CoV-2, y posibles pandemias futuras causadas por virus, se necesitan de métodos que permitan la rápida identificación de los portadores, sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad, que sean de bajo costo y fáciles de usar. Lo anterior es especialmente importante debido a que uno de los principales retos del SARS-CoV-2 y de la enfermedad COVID-19 es el aparente alto

porcentaje de casos asintomáticos o pacientes con síntomas moderados, que deben de ser aislados para evitar contagios.

Prueba de lo conveniente de las pruebas rápidas, es que la prueba de amplificación isothermal mediada por lazo (LAMP) empezó a ser utilizada en el aeropuerto de Heathrow en Londres, en voluntarios del vuelo desde finales de octubre del 2020. El resultado de positivo o negativo puede darse en media hora, lo cual es menos del tiempo de espera típica en los aeropuertos. La ventaja de la prueba de LAMP consiste en su facilidad y respuesta rápida. Evidentemente el conocer si un individuo es portador del SARS-CoV-2 permite la aplicación de medidas de salud públicas oportunas. Una desventaja de la prueba LAMP es que es inherentemente propensa a la generación de falsos positivos. Lo anterior debido a que la prueba de LAMP mide cambios en el pH generados por la amplificación del DNA y en principio no es capaz de distinguir entre una amplificación selectiva, en este caso del genoma del SARS-CoV-2, o una amplificación espuria por concatenados de los iniciadores o generados por una contaminación.

## 1.- La técnica del RPA

Como se menciona anteriormente, la técnica de PCR se fundamenta en el uso de un termociclador que permite a la reacción alternar entre diversos ciclos de temperatura. Para evitar el uso de un termociclador que brinde temperaturas de 4 a 95°C es necesario contar con técnicas para amplificar ácidos nucleicos que demanden menos cambios

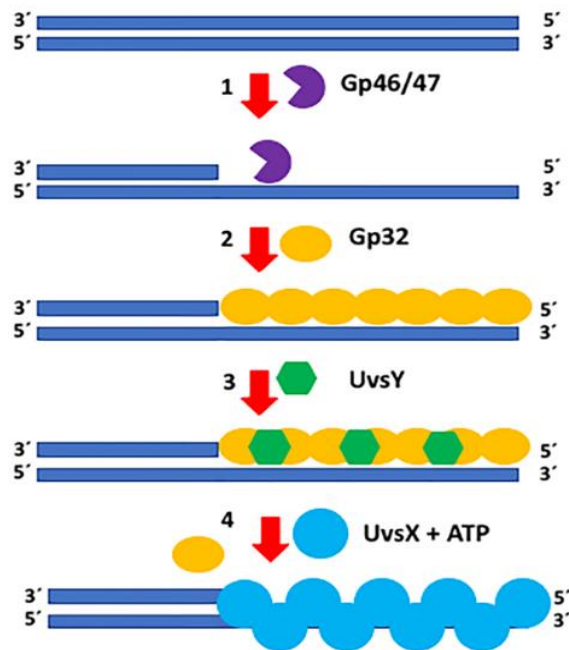
drásticos de temperaturas. Entre las técnicas existentes para lograr la amplificación de ácidos nucleicos, la técnica mediada por una recombinasa (RPA, por sus siglas en inglés "*recombinase polymerase amplification*") es una de las más utilizadas y prometedoras (Piepenburg, Williams et al., 2006, Daher, Stewart et al., 2016, Lobato and O'Sullivan 2018). El RPA es una técnica de amplificación isotérmica altamente sensible y selectiva, que opera típicamente a 37° C. Esta técnica requiere de una preparación mínima de la muestra y es capaz de amplificar de 1 a 10 copias de ADN en menos de 20 min. El RPA es una técnica que es parecida al proceso genético de recombinación homóloga presente en virus, bacterias y eucariontes (Li and Heyer 2008, Daley, Gaines et al., 2014). La implementación de esta técnica por Piepenburg y colaboradores en el año 2006 se fundamentó en el uso de las enzimas que replican y reparan el genoma del bacteriófago T4 (Bleuit, Xu et al., 2001, Piepenburg, Williams et al., 2006). Estos investigadores utilizaron la ruta de la formación del complejo pre sináptico en la recombinación homóloga del bacteriófago T4 para modificarlo y lograr amplificar ADN. La formación del complejo pre sináptico involucra que una exonucleasa degrada el ADN sufrido una ruptura en su doble cadena y genera una región de ADN de cadena sencilla (ssDNA) parcial, esta zona es cubierta por una proteína de unión a ADN de cadena sencilla conocida como Gp32. Esta proteína, a su vez, es desplazada de su unión al ADN por una proteína mediadora denominada UvsY, lo que al mismo tiempo

permite la unión de una recombinasa (UvsX) al ssADN liberado (Liu and Morrical 2010) (**Tabla 1**). Esta recombinasa es capaz de lograr que una región de ADN de doble cadena forme una triple hélice con la región homóloga de cadena sencilla a la que se encuentra unida para dar lugar a un arreglo conocido como lazo de desplazamiento o lazo-D (**Fig. 2**). El ssADN sirve como iniciador para que una polimerasa de ácidos nucleicos con capacidad de desplazamiento de hebra amplifique el DNA sin necesidad de una helicasa que desdoble la doble hélice del DNA.

Tabla 1 Enzimas de recombinación homóloga en bacterias y bacteriófago T4.

Proteína	Bacteriófago T4	Bacteria
Recombinasa	UvsX	RecA
Mediador	UvsY	RecF, RecO, RecR
Proteína de Unión a cadena sencilla	Gp32	SSB

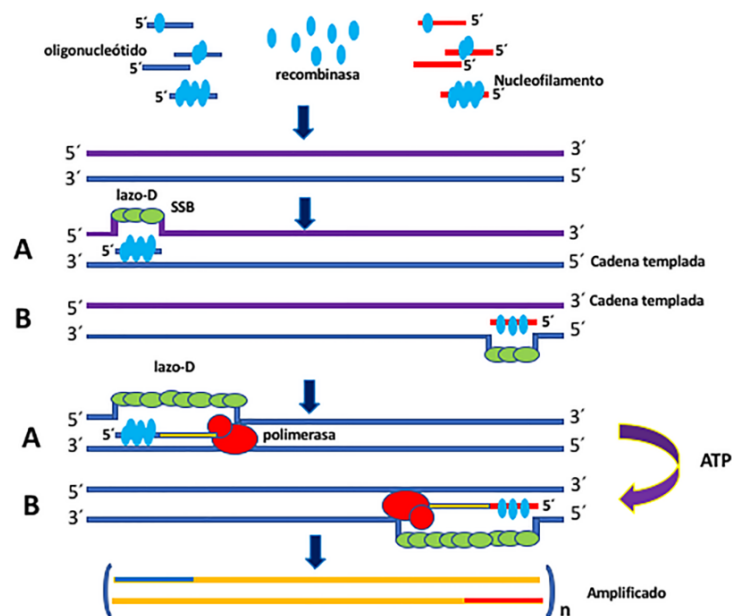
**Fig. 2 Proceso natural de formación de complejo presináptico en la recombinación homóloga del bacteriófago T4.** Una exonucleasa de cadena sencilla (Gp46 o 47) degrada el dsDNA creando un extremo de



cadena sencilla (1) que es recubierto con la proteína de unión a cadena sencilla Gp32 (2). La proteína mediadora UvsY reconoce a Gp32 (3) y forma un complejo con esta proteína y con la recombinasa UvsX. La recombinasa UvsX interactúa con la cadena sencilla de DNA en la presencia de ATP formando un filamento proteico denominado complejo presináptico. Este proceso sirvió de inspiración para el diseño de la técnica de RPA por Piepenburg y colaboradores (Piepenburg, Williams et al., 2006).

Es decir, la inventiva de Piepenburg y colaboradores consistió en utilizar el proceso natural de formación de complejo pre sináptico de la recombinación homóloga para la formación de iniciadores y en su lugar proveer los iniciadores de la región de ADN que se desea amplificar (Piepenburg, Williams et al., 2006). Así, la amplificación vía RPA inicia cuando una recombinasa (UvsX o RecA bacteriana, por ejemplo) se une a los oligonucleótidos sintéticos en presencia de ATP formando el complejo recombinasa-oligonucleótido. Dicho complejo busca regiones homólogas al oligonucleótido guía en regiones de ADN de doble cadena promoviendo la invasión de la cadena en el sitio homólogo (Del Val, Nasser et al., 2019).

Para evitar la expulsión del oligonucleótido, Piepenburg y colaboradores adicionaron una proteína de unión a cadena sencilla del ADN, la cuál estabiliza el oligonucleótido y permite formar el lazo de desplazamiento. Luego, la recombinasa se despega del complejo permitiendo la entrada de una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de hebra (generalmente la DNA polimerasa I de *Bacillus subtilis*), la cuál se une al extremo 3' del oligonucleótido y permite la elongación la cadena de ADN en presencia de dNTPs. El ciclo de amplificación se repite de manera exponencial dando lugar a la amplificación selectiva de una secuencia de ADN cuando se cuentan con dos oligonucleótidos en posiciones encontradas (**Fig. 3**).



**Fig. 3. Ciclo de amplificación de ADN por RPA** La reacción de RPA ocupa tres proteínas: recombinasa, proteínas de unión de cadena sencilla (SSB) y una polimerasa con capacidad de desplazamiento de hebra. La recombinasa se polimeriza sobre el oligonucleótido y forma un filamento que busca una secuencia homóloga en el ADN de doble cadena. Una vez localizada la región homóloga, el complejo invade el ADN formando una estructura de lazo D y la cadena sencilla es estabilizada por las SSB. La ADN polimerasa realiza la síntesis de ADN a partir de los iniciadores. A medida que continúa la polimerización, las dos cadenas parentales comienzan a separarse y forman las nuevas hebras.

Es decir, la reacción de RPA asemeja a la reacción de PCR convencional, siendo la diferencia que el paso de desnaturalización mediado por temperatura en el caso de la PCR tradicional es sustituida por la capacidad de desplazamiento de hebra de la ADN polimerasa en esta nueva técnica. El paso de hibridación de los oligonucleótidos en el RPA es mediado por la recombinasa y las proteínas de unión a ssADN. Para un perfecto desempeño de la recombinasa durante la reacción de RPA, se utilizan oligonucleótidos de entre 30 a 35 pb y la longitud de los amplicones varía de entre 200 pb a 300 pb. Para detectar la presencia de secuencias del ADN amplificado se pueden seguir distintas estrategias, desde una tira reactiva hasta un dispositivo electrónico y se puede dar seguimiento tanto en tiempo real como en punto final.

## 2.- RPA para detección en punto de atención

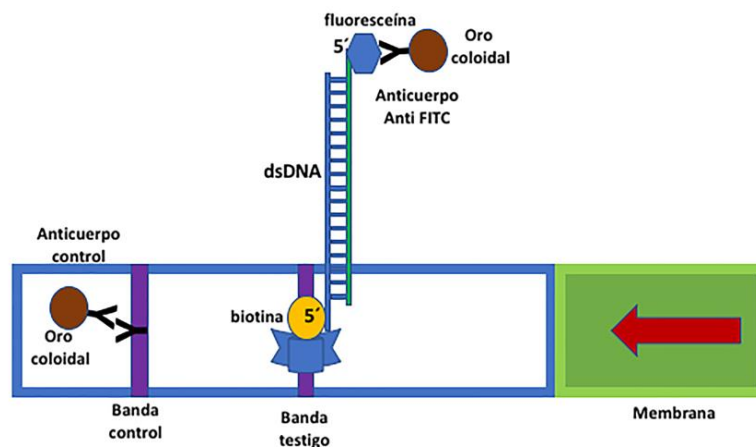
Para evitar la propagación de virus como el SARS-CoV-2, las pruebas de detección deben de ser efectuadas en el punto de atención y la amplificación de regiones específicas de su genoma permite su fácil identificación. Para ello la amplificación de ácido nucleicos puede implementarse para que rutinariamente sea visualizada en tiras de flujo lateral. Este tipo de tiras se introdujeron al público desde 1984 en la forma de pruebas de embarazo por la compañía Unipath (B 2015, Cheung-Mak, Beni et al., 2016) y su uso se encuentra ampliamente distribuido para detectar sin número de biomarcadores y patógenos por medio de anticuerpos

específicos. Una prueba de flujo lateral físicamente consiste en una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugación, una membrana de nitrocelulosa y una almohadilla de adsorción. La muestra se introduce a la almohadilla de muestra y migra a la almohadilla de conjugación por capilaridad, la cual se encuentra precargada con biomarcadores secundarios, principalmente anticuerpos conjugados con oro coloidal, para una detección visual. Es decir, las pruebas de flujo lateral son inmunoensayos que se detectan a simple vista en la tira reactiva (**Fig. 4**).

La tira de flujo lateral adaptada para visualizar productos amplificados de ADN se fundamenta en la capacidad de los oligonucleótidos para ser conjugados en su extremo 5' por un marcador como fluoresceína (FITC) y la biotina. Para ello, durante la reacción de RPA se utiliza un oligonucleótido etiquetado con biotina en el extremo 5' para amplificar regiones del genoma del SARS-CoV-2 en combinación con un oligonucleótido sin modificar. Estos dos oligonucleótidos amplifican de forma selectiva una región específica del genoma del SARS-CoV-2 por RPA como se aprecia en la **Fig.4**. Para lograr la detección de esta región amplificada se utiliza una sonda etiquetada también en el extremo 5' la cual se encuentra conjugada con fluoresceína. Esta sonda es complementaria al genoma del SARS-CoV-2 amplificado y contiene un sitio abásico en el centro de esta y en su extremo 3'-OH se encuentra ocupada por un nucleótido en forma de dideoxido que imposibilita que esta sonda pueda servir para amplificar. Sin embargo, la

hibridación de la sonda al DNA amplificado sirve como sustrato para una enzima que corta el sitio abásico y por lo tanto elimina el extremo 3'-OH que impide el crecimiento de la cadena. Una vez que la sonda ha sido procesada, esta es amplificada y se crea un nuevo amplicón con el oligonucleótido conjugado el extremo 5' con fluoresceína. De esta manera, el genoma del SARS-CoV-2 es selectivamente amplificado con estos oligonucleótidos modificados. Al colocar la reacción de RPA en la tira de flujo lateral, la muestra conteniendo el ADN amplificado del SARS-CoV-2 migra por capilaridad y pasa por una región que contiene un anticuerpo anti-biotina que atrapa a la hebra de DNA amplificada por el oligonucleótido etiquetado con biotina en el extremo 5' y la sonda etiquetada en su extremo 5' con FITC (Fig. 4). Los anticuerpos anti-FITC se encuentran

situados en línea de prueba de la membrana de nitrocelulosa y también migran por la tira de flujo lateral y se enlazan al extremo 5' de la sonda etiquetada con FITC. Para visualizar estos anticuerpos, típicamente se utiliza oro coloidal conjugado con el anticuerpo anti-FITC. Al migrar por la zona de prueba, el anticuerpo conjugado con oro coloidal se acumula, lo que permite la detección visual. Es por demás evidente que las tiras de flujo lateral tienen la bondad de no requerir de un dispositivo electrónico, generando resultados de inspección visual y que la intensidad de la línea variará dependiendo de la cantidad del producto amplificado. Diversas compañías como Milenia-Biotec (<https://www.milenia-biotec.com/>) han desarrollado estas tiras, las cuales tienen un costo aproximado de \$3 USD. (Ranjan, Parihar et al., 2020).



**Fig. 4.** Tira graduada de flujo lateral para la detección de amplicados de SARS-CoV-2. La muestra es depositada en la almohadilla de muestra que contiene una membrana de nitrocelulosa. La muestra migra por capilaridad y en nuestro caso el ADN de doble cadena lleva acoplado una molécula de biotina en su extremo 5' y la sonda una molécula de fluoresceína también en el extremo 5'. La tira graduada de flujo lateral contiene anticuerpos anti-fluoresceína conjugados con oro coloidal y anticuerpo control. La presencia o ausencia de ADN amplificado se realiza visualmente en la banda o línea testigo.



### 3.- Optimización de la técnica de RPA para detectar el SARS-CoV-2

Un problema inherente de la técnica del RPA es que las enzimas más utilizadas comercialmente y en la investigación provienen del bacteriófago T4 y estas se desnaturalizan a temperaturas mayores a 60 °C. El genoma del SARS-CoV-2 es un genoma de ARN de cadena sencilla propenso a formar estructuras secundarias lo que dificulta la amplificación y por tal motivo diversos protocolos para su detección utilizan previamente una reversa transcriptasa termoestable para convertir su genoma a ADN a temperaturas cercanas a 55 o 60 °C. Para circunvenir este problema, decidimos utilizar enzimas del proceso de recombinación homóloga de la bacteria termorresistentes (RecA, RecF, RecO, RecR y SSB) y nos dimos a la tarea de clonarlas y purificarlas a homogeneidad (**Tabla 1**), junto con variantes termoresistentes de la reversa transcriptasa murina y la DNA polimerasa I de *Bacillus subtilis*. Como control también nos avocamos a clonar y purificar las enzimas involucradas en al proceso de recombinación homóloga del bacteriófago T4 (UvsX, UvsYy Gp32) (**Tabla 1**). Dado que las recombinasas ocupan un sistema de regeneración de ATP también clonamos y purificamos la creatina cinasa. Como prueba de concepto del desarrollo realizamos una amplificación del gen N del genoma de SARS-CoV-2 utilizando oligonucleótidos marcados con fluoresceína y con biotina que permiten determinar la presencia de SARS-CoV-2 en individuos portadores por medio de un frotis nasofaríngeo.

### CONCLUSIONES

La reacción de RPA empleada para amplificar y detectar la presencia del SARS-CoV-2 permite la identificación de su material genómico en tiras graduadas de flujo lateral, con las modificaciones y adaptaciones que hemos realizado este puede ser un acercamiento hacia un protocolo de detección *in situ*, confiable y de bajo costo.

### AGRADECIMIENTOS

La implementación de los componentes moleculares para la detección y visualización del SARS-Cov2 es financiada por el proyecto 311960 de CONACYT (LGB) y la ingeniería de la ARNP termo resistente e implementación de las tiras reactivas por el proyecto FINNOVATEG MA-CFINN0926 (AM-A) del Estado de Guanajuato.

### REFERENCIAS

- B, O. F. (2015). Lateral Flow Technology for Field-Based Applications-Basics and Advanced Developments. *Top Companion Anim Med* **30**(4): 139-147.
- Baba, M., et al. (2017). Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination. *Protein Eng Des Sel* **30**(8): 551-557.
- Bleuit, J. S., et al. (2001). Mediator proteins orchestrate enzyme-ssDNA assembly during T4 recombination-dependent DNA replication and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8298-8305.
- Chan, J. F., et al. (2020). Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-

- 19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J Clin Microbiol*.
- Chen, C. J., et al. (2020). Optimization of the CDC Protocol of Molecular Diagnosis of COVID-19 for Timely Diagnosis. *Diagnostics (Basel)* **10**(5).
- Cheung-Mak, W., et al. (2016). Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**: 297-305.
- Corman, V. M., et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* **25**(3).
- Daher, R. K., et al. (2016). Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin Chem* **62**(7): 947-958.
- Daley, J. M., et al. (2014). Regulation of DNA pairing in homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**(11): a017954.
- Del Val, E., et al. (2019). RecA and DNA recombination: a review of molecular mechanisms. *Biochem Soc Trans* **47**(5): 1511-1531.
- Li, X. and W. D. Heyer (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**(1): 99-113.
- Liu, J. and S. W. Morrical (2010). Assembly and dynamics of the bacteriophage T4 homologous recombination machinery. *Virology* **7**: 357.
- Lobato, I. M. and C. K. O'Sullivan (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt Chem* **98**: 19-35.
- Park, M., et al. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Exp Mol Med* **52**(6): 963-977.
- Piepenburg, O., et al. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol* **4**(7): e204.
- Ranjan, P., et al. (2020). Biosensor-based diagnostic approaches for various cellular biomarkers of breast cancer: A comprehensive review. *Anal Biochem* **610**: 113996.
- Spiteri, G., et al. (2020). First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the WHO European Region, 24 January to 21 February 2020. *Euro Surveill* **25**(9).