

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Viren - Die Gefahr aus dem nichts	2
1.2	Die Influenza Viren - Pandemieversucher Nr. 1	2
1.2.1	Influenza A	2
1.2.2	Influenza B	4
1.3	Nachweismethoden von Influenz	4
1.4	Amplifikation	4
1.4.1	RT Polymerase chain reaktion	4
1.4.2	Isotherme Amplifikation	4
1.4.3	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation	4
1.4.4	Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation	5
1.4.5	RCA rolling circle Amplifikation	7
1.4.6	HDA helicase dependent amplifikation	7
1.4.7	NEAR nicking enzyme amplifikation reaction	7
1.4.8	RPA rekombinase polymerase Amplifikation	7
1.5	Projektziel	7
1.6	Ziel der Arbeit	7

1 Einleitung

1.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Bakterien sind eine ernstzunehmende Bedrohung für Menschen und Staaten. Dabei sorgen virale Epidemien und Pandemien wie die Spanische Grippe (1918) mit über 50 Millionen Toten ([Dharmapalan 2020](#)), das Chikungunya virus (2006) mit mehr als 1,3 Millionen Infizierten ([Charrel, Lamballerie, and Raoult 2007](#)), und die aktuelle SARS-CoV-2 Pandemie mit weit über 140 Millionen Infizierten ([Bai, Zhong, and Gao 2021](#)) für weltweite Krisen und Milliarden Schäden ([Louie et al. 2009](#)).

Viren lassen sich als ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, bestehend aus einer Proteinhülle mit einem **DNA oder RNA** Kern beschreiben. Sie haben keinen eigenen Reproduktionsmechanismus und sind auf die Infizierung von anderen Zellen angewiesen, welche mithilfe ihrer Reproduktions-Maschinerie die Viralen Komponenten vervielfältigen ([Modrow et al. 2010](#)). Viren zeigen eine hohe Mutationsrate wodurch neue Varianten entstehen und Immunlücken gefunden werden ([Sanjuan2016?](#)). Dadurch entstehen neue Infektionsherde und neue Pandemien ([quelle?](#)) Gerade die vorherrschende SARS-Cov-2 Pandemie hat gezeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um die Gesundheitssysteme zu entlasten und die Infektionsketten zu unterbrechen ([Valera et al. 2021](#)). Goldstandard PCR —> point of care —> Isothermale Amplifikation.

1.2 Die Influenza Viren - Pandemieversucher Nr. 1

erwähnen, dass influenza Grippe ist

1.2.1 Influenza A

Das zur Virusfamilie der Orthomyxoviren gehörige Influenza A Virus ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA Virus. Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5'-3' Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 1). Das ca. 13.500 bp große, segmentierte Genom codiert dabei für mindestens 17 Proteine, wobei die 3' und 5' Regionen keine codogenen Bereiche enthalten, sondern komplementär zueinander sind. Dadurch bilden sie über eine kurze Distanz einen Doppelstrang aus, welcher als Signalsequenz bei Transkription dient ([Modrow et al. 2010](#); [Chen et al. 2018](#)). Von den 17 codierten Proteinen zählen 10 als Essentiell Wichtig, während der Rest als Accessoire-Proteine zählt ([Vasin et al. 2014](#)). Zu den essentiellen Proteinen zählen die Neuraminidase (NA), welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das Hämagglutinin (HA), welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixproteinen (M1), das Membranprotein (M2), die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, das Nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, PB1 und PB2 der RNA-Polymerase ([Luo 2011](#); [Krammer et al. 2018](#)). Die Accessoire-Proteinen sind auf alternativen offenen Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) codiert. Diese erlauben es Viren eine größere Protein-Vielfalt auf engem genomischen Raum, durch die "mehrfachverwendung" einer Nukleotid-Sequenz, zu exprimieren. Diese alternativen ORF entstehen dabei durch verschiedene molekularbiologische Mechanismen, wie *frame shifting* bei welchem das Ribosom bei der Translation eine Base überspringt und somit den Leseramen ändert, *readthrough* bei dem das Ribosom ein Stopp-codon überspringt, oder *internal Ribosom Entry* wobei das Ribosom an ein internes Start-Codon durch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird, sowie einige weitere ([Firth and Brierley 2012](#)). Zu den Accessoire-

Proteinen zählen unter anderem das 2012 entdeckte nichtstruktur Protein 3 (Selman et al. 2012), das von M2 abstammende M42 (Wise et al. 2012) und die dem PA zugehörigen Proteine PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger et al. 2012; Muramoto et al. 2013).

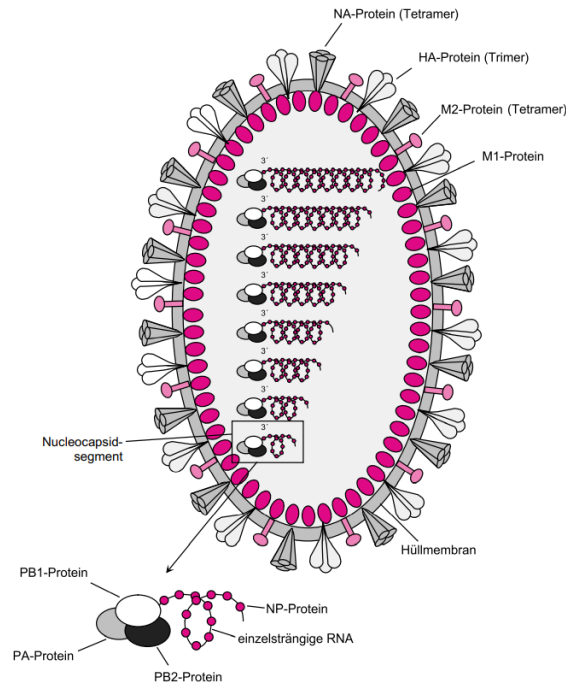


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den Längen der einzelnen Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Modifizierte nach Modrow et al. (2010).

Die RNA-abhängige RNA Polymerase des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 1 gezeigt aus den 3 Unterheiten PA, PB1 und PB2, wobei die Gensequenz für PA auf dem Segment 3, für PB1 auf dem Segment 2 und PB2 auf dem Segment 1 codiert sind (Krammer et al. 2018). Das heterotrimer assoziiert innerhalb des Virus mit den komplementären Sequenzen an den jeweiligen Enden der einzelnen Genom-Segmente. Der restliche Teil der einzelsträngigen RNA wird von oligomeren NP gebunden, welches auf dem Segment 5 codiert ist. Dieser RNA-Protein-Komplex ist in der Literatur als vRNP-Komplex (engl.: *viral ribonucleoprotein*) beschrieben (Krammer et al. 2018; Velthuis and Fodor 2016). Kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen des vRNP-Komplex zeigten eine doppel-helikale Struktur mit einer Schleife am nicht RNA-Polymerase assoziierten Ende. Die Helix-Struktur wird dabei durch eine Assoziation von unterschiedlich polaren oligomeren NP-Proteinen stabilisiert (Arranz et al. 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung aus einer äußeren cholesterolehaltigen Lipiddoppelschicht, in welche die Glycoproteine NA, HA und M2 integriert sind (To and Torres 2019; Modrow et al. 2010). Hier schon erwähnen, dass die Membran vom Wirt und nicht vom Virus stammt? Oder das doch lieber beim Infektionsmechanismus. Die darunter liegende Proteinmatrix besteht aus oligomeren M1-Proteinen, welche auf dem Genom-Segment 7 codiert sind. Dieses Matrixprotein dient als Angelpunkt und bindet alle anderen Struktur-bildenden Komponenten wie den vRNP-Komplex, die Membranbindenden Glycoproteine, sowie die Lipidmembran durch seine positive Polarität (Kordyukova et al. 2018; Chlanda and Zimmerberg 2016). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essentielle Rolle bei dem Zusammenbau des Virus und der nachfolgenden Umhüllung mit Wirts-Lipiden, dem sogena-

annten *Budding* (Nayak et al. 2009). Durch seine komplexe Funktion und die verschiedenen Bindungsdomänen für die anderen Strukturkomponenten, ist die Aminosäuresequenz des M1-Protein am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley and Mahy 1983; Kordyukova et al. 2018).

1.2.2 Influenza B

1.3 Nachweismethoden von Influenz

1.4 Amplifikation

1.4.1 RT Polymerase chain reaktion

1.4.2 Isotherme Amplifikation

1.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation

Die erstmal im Jahr 2000 von Notomi (2000) entwickelte Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (engl.: *loop mediated isothermal amplifikation*, LAMP) ist eine effektive isotherme Amplifikationsmethode von DNA bei einer Konstanten Temperatur von 60 - 65 °C. Im Gegensatz zur der PCR werden bei der LAMP 4 bis 6 Primer verwendet, um die Nukleinsäure zu amplifizieren. Dadurch erreicht die LAMP einerseits sehr hohe Spezifitäten, da die 4 essenziellen Primer binden müssen, andererseits aber hohe Anforderung an die Optimierung und das Primer-Design (Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska 2021). Die Primer werden dabei in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer unterteilt. (Nagamine, Hase, and Notomi 2002). Die äußeren Primer, bestehend aus forward und reverse Primer sind zweigeteilt, wobei der 3'-Teil jedes Primers komplementär zum jeweiligen Strang (forward- / reverse-Strang) ist. Der zweite Teil der Primer hingegen ist komplementär zu einer Stelle auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang. Diese Zweiteilung der Primer sorgt im späteren Verlauf der Reaktion für die Bildung einer Hantel ähnlichen Struktur. Die äußeren Primer, ebenfalls bestehend aus forward und reverse Primer binden weiter außen auf dem DNA-Doppelstrang und liegen in niedrigerer Konzentration vor als die inneren Primer. Zusätzlich können optional die Loop Primer verwendet werden, welche in den Köpfen der gebildeten Hantelstruktur binden (Huang et al. 2020). Ebenfalls nötig für die Amplifikation ist eine DNA-Polymerase, welche eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt (Park 2022).

Der Reaktionsmechanismus der LAMP kann in zwei Phasen unterteilt werden; der nicht zyklischen Phase und der zyklischen Phase. Im ersten Schritt der nicht zyklische Phase hybridisiert einer der inneren Primer mit seinem 3'-Ende an die zu amplifizierende DNA. Dadurch kann eine Strangverlängerung des Primers durch die Polymerase stattfinden und mithilfe der Strang Verdrängungs-Aktivität wird der ursprüngliche Doppelstrang abgelöst. Anschließend bindet der äußere Primer hinter dem neu entstandenen Doppelstrang, es findet abermals eine Strangverlängerung statt und der innere Primer mit der neu synthetisierten DNA wird verdrängt. Der nun entstandene DNA-Einzelstrang besitzt an einem Ende die Sequenz des inneren Primers, und bildet durch den hinteren komplementären Teil des Primers eine Schleife aus. Der beschriebene Amplifikations-Schritt wird mit den entgegen gesetzten inneren und äußeren Primern wiederholt, sodass eine einzelsträngige DNA entsteht, welche an beiden Enden die Sequenzen der inneren Primer besitzt. Dadurch nimmt diese einzelsträngige DNA, die oben erwähnte Form einer Hantel an und der nicht zyklische Teil der Amplifikation ist damit beendet (Parida et al. 2008).

Die gebildete Hantelstruktur dient in der zweiten Phase der Amplifikation als Startpunkt. Hier können nun die verschiedenen Primer gleichzeitig binden und somit die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigen. Ebenfalls

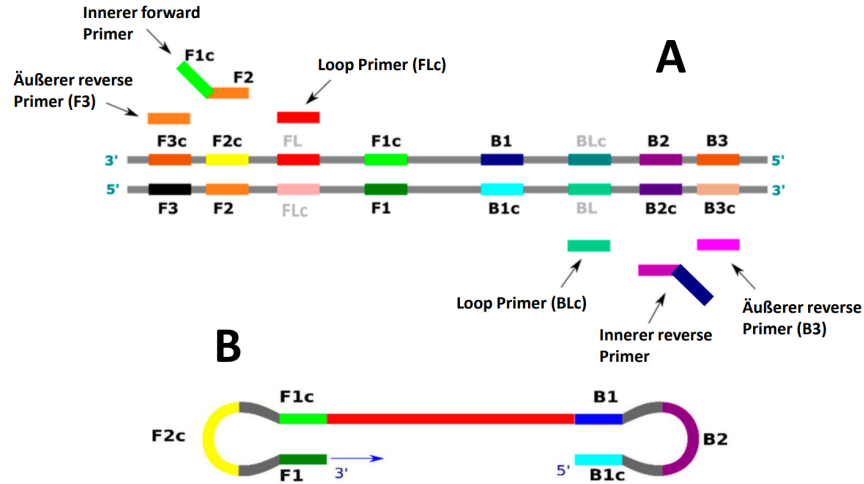


Abbildung 2: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP:** **A:** Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußeren Primer liegen “hinter” den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung für eine Verdrängung des DNA-Strangs. **B:** Hantelstruktur als Ausgangspunkt der zyklischen Phase. Die verschiedenen Bindestellen dienen als Startpunkte einer Amplifikation, wodurch eine exponentielle Amplifikation erreicht wird. Modifiziert nach Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska (2021)

dient das 3'-Ende der Hantelstruktur als Primer und somit als Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf der Reaktion entstehen verschiedenste Strukturen wie Konkatemere und blumenkohlähnliche Strukturen mit vielen Schleifen (Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska 2021; Silva, Pardee, and Pena 2019). Ebenfalls kann durch das zusätzliche Einbringen der Loop Primer, die Anzahl der Startpunkte abermals erhöht werden, was zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit führt (Nagamine, Hase, and Notomi 2002). Eine Amplifikation von RNA ist ebenfalls unproblematisch möglich, jedoch muss eine Reverse Transkriptase Reaktion vor der LAMP vorgeschaltet werden (Chander et al. 2014).

Zur Detektion der Amplifikation können kolorimetrische Fluoreszenzfarbstoffe wie Calcein, welche vor der Messung zugegeben werden (Tomita et al. 2008) oder Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I, welche nach Abschluss der Amplifikation zugegeben werden (Iwamoto, Sonobe, and Hayashi 2003) verwendet werden. Durch die eine hohe DNA-Endkonzentration von 10-20 µg am Ende der Reaktion kann eine Auswertung mit dem bloßen Auge erfolgen (Parida et al. 2008). Ebenfalls kann die Messung der Trübung für den Nachweis einer Positiven Reaktion verwendet werden. Durch die extrem hohe Menge an synthetisierter DNA entstehen große Mengen an Pyrophosphat, welches Magnesium-Ionen bindet und bei hohen Konzentrationen ausfällt. Diese Fällung führt zu einer Trübung der Reaktionsmischung, welches wiederum quantifiziert werden kann (Mori et al. 2001).

1.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation

Die Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA), auch bekannt unter *self-sustained sequence replication* (3SR) ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode zum Nachweis von Nukleinsäuren (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Die erstmals von Guatelli et al. (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzym-mix bestehend aus einer reversen Transkriptase (RT), des avian myeloblastosis virus, der RNase H und einer T7 DNA abhängi-

gen RNA-Polymerase (DdRp) (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer Primer 1 an das 3'-Ende einer einzelsträngigen RNA. Dadurch eignet sich die NASBA besonders zum Nachweis von RNA-Molekülen, da diese direkt zum Start der Reaktion benötigt werden. Durch diese Eigenschaft unterscheidet sich die NASBA zu anderen Amplifikationsmethoden, wo ein RT-Schritt vorgeschaltet werden muss (Compton 1991; Bachman 2013; Zhang et al. 2021). Dabei hybridisieren nur 20 bp am 3'-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5-Ende hingegen besitzt eine Promotor-Erkennungssequenz für die DdRp. Nachdem der Primer gebunden hat, wird eine cDNA bei einer Temperatur von 41 °C von der im Reaktionsmix enthaltenen RT synthetisiert. Das entstandene cDNA/RNA-Hybrid wird anschließend von der RNase H verdaut, sodass der einzelsträngige DNA-Anteil mit der Promotorsequenz im Reaktionsmix enthalten ist. Ein zweiter 20 bp langer Primer2, welcher komplementär zur DNA ist, hybridisiert und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche um die 100 RNA-Kopien pro DNA-Template erzeugt. Die neu entstandenen RNA-Moleküle gehen in den ersten Zyklus der NASBA ein, indem der Primer2 hybridisiert, die RT ein cDNA/RNA hybrid erzeugt und der RNA-Anteil durch die RNase H hydrolysiert wird. An diese cDNA bindet wiederum Primer1 und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang, sodass der Promotor wieder aktiv wird und neue RNA-Kopien erstellt werden können (Compton 1991).

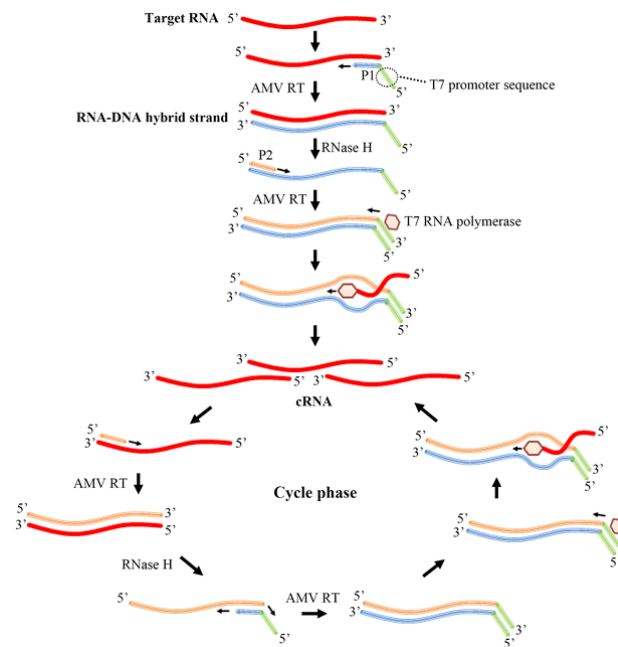


Abbildung 3: **Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der NASBA mit der Initialen Phase und der zyklischen Phase. Die Anfängliche RNA wird durch die Hybridisation von Primern in ein DNA/RNA hybrid überführt, dieses über einen RNase verdaut und erneute DNA synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt. Durch den auf dem doppelstrang aktiven Promotor werden viele RNA-Kopien erzeugt, welche in den Amplifikationszyklus eingehen.

Die Amplifikation von DNA-Molekülen als Ausgangsmaterial mittels NASBA ist ebenfalls möglich, jedoch mit einem erhöhten Aufwand und zusätzlichen Denaturierung-Schritten (Malek, Sooknanan, and Compton 1994). Hierbei hybridisiert nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C Primer1 mit der Ziel-DNA und wird durch die frisch dazugegebene RT verlängert. Da kein cDNA/RNA hybrid entstanden ist, kann

die RNase nicht den Gegenstrang hydrolysieren und ein weiterer Denaturierungsschritt ist nötig. Durch die hohen Temperaturen wird jedoch die RT inaktiviert, wodurch sie mit den anderen Enzymen neu zugegeben werden muss. Anschließend bindet Primer2, der Doppelstrang wird vervollständigt und die DdRp kann über den aktiven Promotor RNA-Kopien erstellen (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002).

Zur Detektion und Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle hybridisations-Sonden sogenannte “Molecular-Beacon” verwendet werden (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Diese besitzen die Struktur einer Stem-Loop, wobei das eine Ende mit einem Reporterfluorophor und das andere Ende mit einem Quencher gekoppelt sind. Die Stem-Loop ist dabei so ausgebildet, dass die beiden Enden der Sonde komplementär zueinander sind und somit Reporterfluorophor und Quencher in direkter Nähe zueinander sind. Die Sequenz innerhalb der ausgebildeten Schleife ist komplementär zu einer Region auf dem zu detektierenden RNA-Molekül. Bei der Bindung der Sonde an die Zielregion öffnet sich die Schleife, Reporterfluorophor und Quencher werden voneinander getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden (Omran et al. 2022).

1.4.5 RCA rolling circle Amplifikation

evtl.

1.4.6 HDA helicase dependent amplifikation

1.4.7 NEAR nicking enzyme amplifikation reaction

1.4.8 RPA rekombinase polymerase Amplifikation

1.5 Projektziel

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, jeweils ein RPA-System für die Point of care Diagnostik zum Nachweis der Influenza A und B Viren zu entwickeln und zu optimieren. Dabei soll das Influenza B System alle human pathogenen Viren detektieren können und das Influenza A System die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nachweisen können. Die Entwicklung der Systeme unterteilt sich dabei in folgende Punkte:

- Erstellung eines definierten RNA-Standards für die einzelnen Viren
- Design und Überprüfung von spezifischen Primer-Sonden-Sets
- Sensitivitäts und Spezifitäts-Testungen

Innerhalb der Optimierung soll das Optimum folgender Reaktionsparameter ermittelt werden:

- Reaktionstemperatur
- Mischzeitpunkt der Reaktion
- Primerkonzentration
- Ansatzvolumen der Reaktion (50 µl RPA und 8tel RPA)

Des Weiteren soll die Wirksamkeit der entwickelten und optimierten RPA-Systeme an Patientenproben getestet und die Sensitivität mit PCR-Systemen für die Detektion der gleichen Viren verglichen werden.

- Arranz, Rocío, Rocío Coloma, Francisco Javier Chichón, José Javier Conesa, José L. Carrascosa, José M. Valpuesta, Juan Ortín, and Jaime Martín-Benito. 2012. “The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins.” *Science* 338 (6114): 1634–37. <https://doi.org/10.1126/science.1228172>.
- Bachman, Julia. 2013. “Reverse-Transcription PCR (RT-PCR).” In *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*, 67–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6>.
- Bai, Chongzhi, Qiming Zhong, and George Fu Gao. 2021. “Overview of SARS-CoV-2 Genome-Encoded Proteins.” *Science China Life Sciences* 65 (2): 280–94. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>.
- Chander, Yogesh, Jim Koelbl, Jamie Puckett, Michael J. Moser, Audrey J. Klingele, Mark R. Liles, Abel Carrias, David A. Mead, and Thomas W. Schoenfeld. 2014. “A Novel Thermostable Polymerase for RNA and DNA Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).” *Frontiers in Microbiology* 5 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>.
- Charrel, Rémi N., Xavier de Lamballerie, and Didier Raoult. 2007. “Chikungunya Outbreaks — the Globalization of Vectorborne Diseases.” *New England Journal of Medicine* 356 (8): 769–71. <https://doi.org/10.1056/nejmp078013>.
- Chen, Xiaoyong, Shasha Liu, Mohsan Ullah Goraya, Mohamed Maarouf, Shile Huang, and Ji-Long Chen. 2018. “Host Immune Response to Influenza a Virus Infection.” *Frontiers in Immunology* 9 (March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>.
- Chlanda, Petr, and Joshua Zimmerberg. 2016. “Protein-Lipid Interactions Critical to Replication of the Influenza a Virus.” *FEBS Letters* 590 (13): 1940–54. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118>.
- Compton, J. 1991. “Nucleic Acid Sequence-Based Amplification.” *Nature* 350 (6313): 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>.
- Deiman, Birgit, Pierre van Aarle, and Peter Sillekens. 2002. “Characteristics and Applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA).” *Molecular Biotechnology* 20 (2): 163–80. <https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163>.
- Dharmapalan, Dhanya. 2020. “Influenza.” *The Indian Journal of Pediatrics* 87 (10): 828–32. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1>.
- Firth, Andrew E., and Ian Brierley. 2012. “Non-Canonical Translation in RNA Viruses.” *Journal of General Virology* 93 (7): 1385–1409. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0>.
- Guatelli, J C, K M Whitfield, D Y Kwok, K J Barringer, D D Richman, and T R Gingeras. 1990. “Isothermal, in Vitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (5): 1874–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>.
- Huang, Tianzeng, Linzhi Li, Xing Liu, Qi Chen, Xueen Fang, Jilie Kong, Mohamed S. Draz, and Hongmei Cao. 2020. “Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique: Principle, Development and Wide Application in Food Safety.” *Analytical Methods* 12 (46): 5551–61. <https://doi.org/10.1039/d0ay01768j>.
- Iwamoto, Tomotada, Toshiaki Sonobe, and Kozaburo Hayashi. 2003. “Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex, *M. Avium*, and *M. Intracellulare* in Sputum Samples.” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>.
- Jagger, B. W., H. M. Wise, J. C. Kash, K.-A. Walters, N. M. Wills, Y.-L. Xiao, R. L. Dunfee, et al. 2012. “An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza a Virus Segment 3 Modulates the Host Response.” *Science* 337 (6091): 199–204. <https://doi.org/10.1126/science.1222213>.
- Kordyukova, Larisa V., Eleonora V. Shtykova, Lyudmila A. Baratova, Dmitri I. Svergun, and Oleg V. Batishchev. 2018. “Matrix Proteins of Enveloped Viruses: A Case Study of Influenza a Virus M1 Protein.”

- Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (3): 671–90. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089>.
- Krammer, Florian, Gavin J. D. Smith, Ron A. M. Fouchier, Malik Peiris, Katherine Kedzierska, Peter C. Doherty, Peter Palese, et al. 2018. “Influenza.” *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>.
- Louie, Richard F., Tyler Kitano, T. Keith Brock, Robert Derlet, and Gerald J. Kost. 2009. “Point-of-Care Testing for Pandemic Influenza and Biothreats.” *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3 (S2): S193–202. <https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4>.
- Luo, Ming. 2011. “Influenza Virus Entry.” In *Viral Molecular Machines*, 201–21. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9.
- Malek, Larry, Roy Sooknunan, and Jean Compton. 1994. “Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™).” In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, 253–60. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253>.
- McCauley, J W, and B W J Mahy. 1983. “Structure and Function of the Influenza Virus Genome.” *Biochemical Journal* 211 (2): 281–94. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>.
- Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5>.
- Mori, Yasuyoshi, Kentaro Nagamine, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. 2001. “Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 150–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
- Muramoto, Yukiko, Takeshi Noda, Eiryo Kawakami, Ramesh Akkina, and Yoshihiro Kawaoka. 2013. “Identification of Novel Influenza a Virus Proteins Translated from PA mRNA.” *Journal of Virology* 87 (5): 2455–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12>.
- Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. “Accelerated Reaction by Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Loop Primers.” *Molecular and Cellular Probes* 16 (3): 223–29. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
- Nayak, Debi P., Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou, and Subrata Barman. 2009. “Influenza Virus Morphogenesis and Budding.” *Virus Research* 143 (2): 147–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>.
- Notomi, T. 2000. “Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA.” *Nucleic Acids Research* 28 (12): 63e–63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- Omran, Qusay Q, Olga Fedorova, Tianshuo Liu, and Anna M Pyle. 2022. “A Molecular Beacon Assay for Monitoring RNA Splicing.” *Nucleic Acids Research* 50 (13): e74–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac242>.
- Parida, Manmohan, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao, and Kouichi Morita. 2008. “Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A New Generation of Innovative Gene Amplification Technique; Perspectives in Clinical Diagnosis of Infectious Diseases.” *Reviews in Medical Virology* 18 (6): 407–21. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
- Park, Jee-Woong. 2022. “Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests.” *Biosensors* 12 (10): 857. <https://doi.org/10.3390/bios12100857>.
- Selman, Mohammed, Samar K Dankar, Nicole E Forbes, Jian-Jun Jia, and Earl G Brown. 2012. “Adaptive Mutation in Influenza a Virus Non-Structural Gene Is Linked to Host Switching and Induces a Novel Protein by Alternative Splicing.” *Emerging Microbes & Infections* 1 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1080/14737503.2012.681111>.

038/emi.2012.38.

- Silva, Severino Jefferson Ribeiro da, Keith Pardee, and Lindomar Pena. 2019. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review.” *Viruses* 12 (1): 19. <https://doi.org/10.3390/v12010019>.
- Soroka, Marianna, Barbara Wasowicz, and Anna Rymaszewska. 2021. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?” *Cells* 10 (8): 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>.
- To, Janet, and Jaume Torres. 2019. “Viroporins in the Influenza Virus.” *Cells* 8 (7): 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>.
- Tomita, Norihiro, Yasuyoshi Mori, Hidetoshi Kanda, and Tsugunori Notomi. 2008. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products.” *Nature Protocols* 3 (5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>.
- Valera, Enrique, Aaron Jankelow, Jongwon Lim, Victoria Kindratenko, Anurup Ganguli, Karen White, James Kumar, and Rashid Bashir. 2021. “COVID-19 Point-of-Care Diagnostics: Present and Future.” *ACS Nano* 15 (5): 7899–7906. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981>.
- Vasin, A. V., O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova, and O. I. Kiselev. 2014. “Molecular Mechanisms Enhancing the Proteome of Influenza a Viruses: An Overview of Recently Discovered Proteins.” *Virus Research* 185 (June): 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>.
- Velthuis, Aartjan J. W. te, and Ervin Fodor. 2016. “Influenza Virus RNA Polymerase: Insights into the Mechanisms of Viral RNA Synthesis.” *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 479–93. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>.
- Wise, Helen M., Edward C. Hutchinson, Brett W. Jagger, Amanda D. Stuart, Zi H. Kang, Nicole Robb, Louis M. Schwartzman, et al. 2012. “Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza a Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain.” Edited by Andrew Pekosz. *PLoS Pathogens* 8 (11): e1002998. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998>.
- Zhang, Wei S., Jianbin Pan, Feng Li, Min Zhu, Mengting Xu, Hongyan Zhu, Yanyan Yu, and Gaoxing Su. 2021. “Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Coupled with CRISPR-Cas12a for Facile and Highly Sensitive Colorimetric SARS-CoV-2 Detection.” *Analytical Chemistry* 93 (8): 4126–33. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013>.