

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	3
1.2.2	Influenza B	5
1.3	Nachweismethoden von Influenz	5
1.4	Amplifikation	5
1.4.1	Die Polymerase Kettenreaktion	5
1.4.2	Isotherme Amplifikation	6
1.4.3	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation	6
1.4.4	Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation	7
1.4.5	Rekombinase Polymerase Amplifikation	9
1.5	Ziel der Arbeit	10

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 diese, durch leicht veränderte Infektionsstrukturen Immunlücken besetzen ([Sanjuán and Domingo-Calap 2016](#)). Dadurch entstehen neue Infektionsherde und 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](#)). Dabei ist die Polymerase Ketten Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) die vorherrschende Testmethode, da sie durch die Amplifikation von Nucleinsäuren hohe Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht. Jedoch benötigt die PCR meist mehr als 24h bis zum Ergebnis, sowie spezialisierte Laboratorien und geschultes Personal ([Brendish, Schiff, and Clark 2015](#)). Dadurch kann es schwierig werden, die Infektionsketten erfolgreich zu unterbrechen, da erkrankte Patienten binnen der 24h weitere Personen infizieren können ([Sharma et al. 2021](#)). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Diagnostik mit sensitiven und kostengünstigen Alternativen zu ergänzen, welche vor Ort durchgeführt werden können; das sogenannte *Point of care testing* (POCT) ([Goble and Rocafort 2016](#)). Ein großes Feld innerhalb der PoCT spielen dabei isotherme Amplifikationstechniken, welche ebenfalls Erreger anhand ihrer Nukleinsäuren detektieren, jedoch keine großen Geräte erfordern und kürzere Testzeiten bieten. Dadurch können diese Techniken innerhalb des PoCT dezentral für die Diagnostik verwendet werden, was zu einer schnelleren Detektion und somit zu einem unterbrechen der Infektionsketten führen kann ([Pumford et al. 2020](#); [Islam and Koirala 2022](#)).

1.2 Die Influenza Viren - Pandemieversacher Nr. 1

Die Grippe, verursacht durch die Influenza Viren ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit mehr als 300000 Todesfällen weltweit ([RKI 2019](#); [Uyeki et al. 2022](#)). Mehrere Influenza Pandemien erfolgten in den letzten 100 Jahren, darunter die bekannte Spanische Grippe (1918) mit über 50 Millionen toten ([Paules and Subbarao 2017](#); [Biggerstaff et al. 2014](#)). Weitere Pandemien waren die Asiatische Grippe (1957), die Hongkong Grippe (1968) sowie die Schweinegrippe (2009) bei welcher durch eine Reassortierung in Schweinen die Viren auf den Menschen übersprangen ([Paules and Subbarao 2017](#)).

Die zur Virusfamilie der Orthomyxoviren gehörige Influenza Viren sind behüllte, einzelsträngige RNA-Viren. Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5'-3' Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Abschnitte unterteilt ([Modrow et al. 2010](#)). Die Influenza Viren lassen sich in die vier Typen A, B, C und D unterteilen. Von diesen können alle außer D, welcher nur

Rinder und Schweine als Wirt befällt (Foni et al. 2017), Menschen infizieren und Krankheiten verursachen (Javanian et al. 2021). Typ A besitzt von den vier die höchste Virulenz (S. J. Yoo, Kwon, and Lyoo 2018) und ist für die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verantwortlich. Dieser wird abermals in viele Subtypen anhand von Oberflächenproteinen unterteilt, wovon die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 derzeit in der Bevölkerung kursieren (Javanian et al. 2021). Influenza Typ B infiziert ausschließlich Menschen und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Jedoch ist die Pandemiegefahr eingeschränkt, da er kein tierisches Reservoir besitzt und somit die Verbreitung gezielter begrenzt werden kann. Bei Influenza B findet keine Einteilung in Subtypen statt, jedoch sind zwei genetisch differenzierbare Viruslinien (Victoria/2/1987-like und Yamagata/16/1988-like) bekannt (Koutsakos et al. 2016). Influenza Typ C besitzt ähnlich wie Influenza B keine Pandemie-Gefahr und ruft eher milde Krankheitsverläufe hervor. Bei Infektion von Kindern wurden jedoch Infektionen der unteren Atemwege beobachtet. Neben humanen Infektionen sind auch Schweine als Wirt bekannt (Hause et al. 2013; Njouom et al. 2019).

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 Ribosomal 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).

Die RNA-abhängige RNA Polymerase des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 1 gezeigt aus den 3 Untereinheiten 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*)

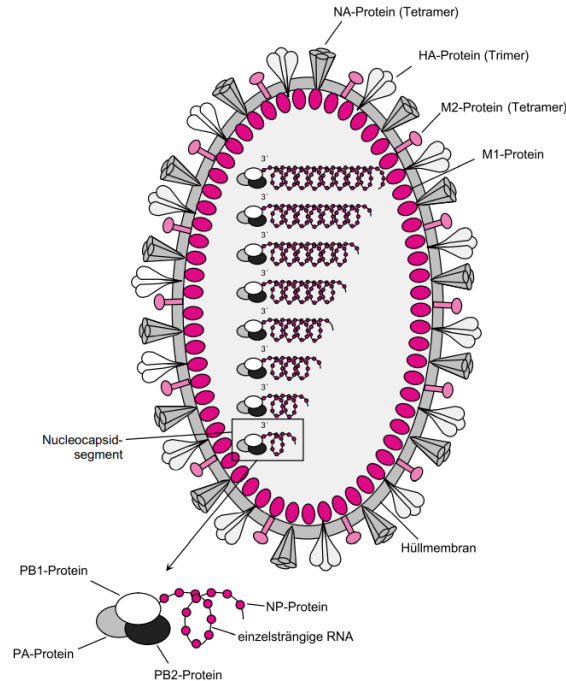


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den Längen der einzelnen Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Modifizierte nach Modrow et al. (2010).

beschrieben (Krammer et al. 2018; Velthuis and Fodor 2016). Kryoelektronenmikroskopische 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 oligo-NP-Proteinen stabilisiert (Arranz et al. 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung aus einer äußeren cholesterol haltigen doppel-Lipid Schicht, 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 sogenannten *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 Die Polymerase Kettenreaktion

Die PCR, entwickelt von Mullis et al. (1986) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA und ist ein Meilenstein in der Molekularbiologie. Erstmals konnten Nukleinsäuren vermehrt werden und somit für Genetik, Forensik und Diagnostik verwendet werden (Gaňová et al. 2021). Das Prinzip der PCR beruht dabei auf 2 ca. 20 bp großen Oligonukleotiden, die sogenannten Primer, welche spezifisch an ein DNA-Fragment binden und von einer hitzestabilen Polymerase verlängert werden. Ein Primerpaar, bestehend aus forward und reverse Primer flankiert jeweils einen definierten DNA-Abschnitt, welcher in einer PCR amplifiziert wird (Ableitner 2018). Der Reaktionsmechanismus der PCR besteht aus 3 Zyklen; Denaturierung, Hybridisation und Amplifikation. Im ersten Schritt der Reaktion werden durch hohe Temperaturen ($\sim 95^{\circ}\text{C}$) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und die DNA so denaturiert. Bei dem Hybridisationsschritt wird die Temperatur auf 55 - 65 $^{\circ}\text{C}$ erniedrig und es können sich die Primer an die DNA anlagern (Sreejith et al. 2018). Dabei ist der Vorwärtsprimer komplementär zu einer Sequenz auf dem Sense-Strang der DNA und der Rückwärtsprimer komplementär zu einer Sequenz auf dem Antisense-Strang (Mülhardt 2009). Nun kann im nachfolgenden Amplifikationsschritt die Polymerase bei $\sim 72^{\circ}\text{C}$ die gebundenen Primer Anhand der DNA-Vorlage erweitern und somit die DNA verdoppeln. Für eine erfolgreiche Amplifikation werden mehrere Zyklen hintereinander durchgeführt, wodurch die DNA jedes mal verdoppelt/ **exponentiell vermehrt** wird (Sreejith et al. 2018). Die amplifizierte DNA am Ende der PCR kann über eine Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (Wood et al. 1994). Bei RNA als Ausgangsmaterial wird eine reverse Transkriptase-Reaktion vor der PCR durchgeführt, um die RNA und DNA umzuschreiben. Die DNA kann anschließend über den beschriebenen PCR-Mechanismus amplifiziert werden (Mülhardt 2009). Diese erweiterte PCR wird als reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) in der Literatur bezeichnet (S. A. Bustin et al. 2005).

Eine besondere Form der PCR ist die quantitative PCR (qPCR). Hierbei wird ein fluoreszierendes Reportermolekül dem Reaktionsmix zugesetzt (Ma, Bell, and Loker 2021). Über die Messung der Fluoreszenz kann der DNA-Gehalt während der laufenden Reaktion bestimmt werden. Typische Reportermoleküle sind dabei Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, sogenannten Sonden, welche innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs binden (Ranasinghe and Brown 2005). Das Prinzip der Fluoreszenzsonden beruht dabei auf der Interaktion eines Fluorophors und einem sogenannten Quencher, welche sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befinden. Der Quencher ist ein weiteres Fluorophor, welches von der Emission des Reportermoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) angeregt wird und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann (Ranasinghe and Brown 2005). Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde bei einer erfolgreichen Bindung hydrolysiert und somit Fluorophor und Quencher voneinander getrennt (Thornton and Basu 2011). Der Quencher kann nicht mehr das Signal des Reportermoleküls blockieren und die Fluoreszenz kann detektiert werden. Durch das steigende Fluoreszenzsignal kann ein Rückschluss auf die amplifizierte DNA-Menge erfolgen und Reaktion live verfolgt werden (S. Bustin 2000).

1.4.2 Isotherme Amplifikation

Wie bereits in 1.1 erwähnt unterliegt die PCR einigen Limitationen, welche sie für die POCT ungeeignet machen. Isotherme Amplifikationstechniken bieten eine große Alternative bei der Amplifikation von Nukleinsäuren und für die POCT (Kang et al. 2022). Ihr großer Vorteil liegt in der simplen Handhabung und der gleichbleibenden Temperatur. Dadurch ist es möglich Nukleinsäuren mit einfachen Gerätschaften wie beispielsweise einem Wasserbad zu vervielfältigen. Seit den 1990 Jahren wurden viele isotherme Methoden entwickelt, welche unterschiedliche Eigenschaften kombinieren und somit ein Repertoire für verschiedenste Applikationen bildet (Zhao et al. 2015). In dem folgenden Kapiteln werden ausgewählte isotherme Methoden vorgestellt.

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 entgegengesetzten 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 dient das 3'-Ende der Hantelstruktur als Primer und somit als Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf

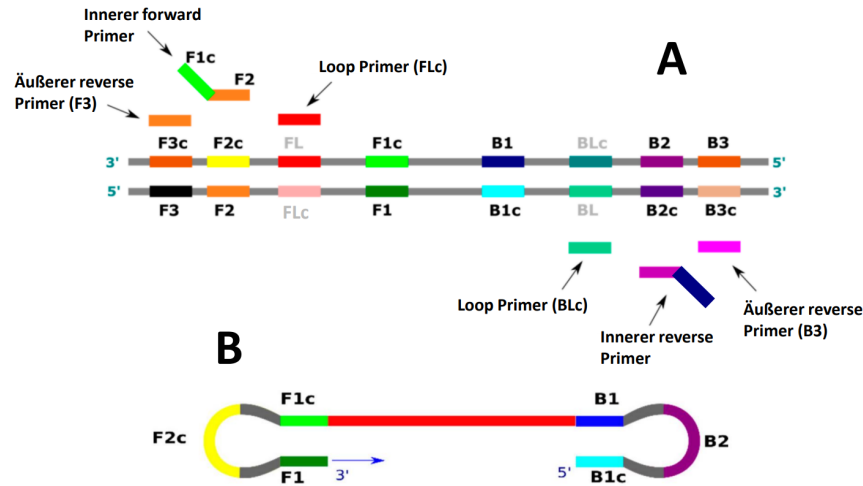


Abbildung 2: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP:** **A:** Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußeren Primer liegen "hinter" den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung 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)

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, welche 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 abhängigen 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 NSABA 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).

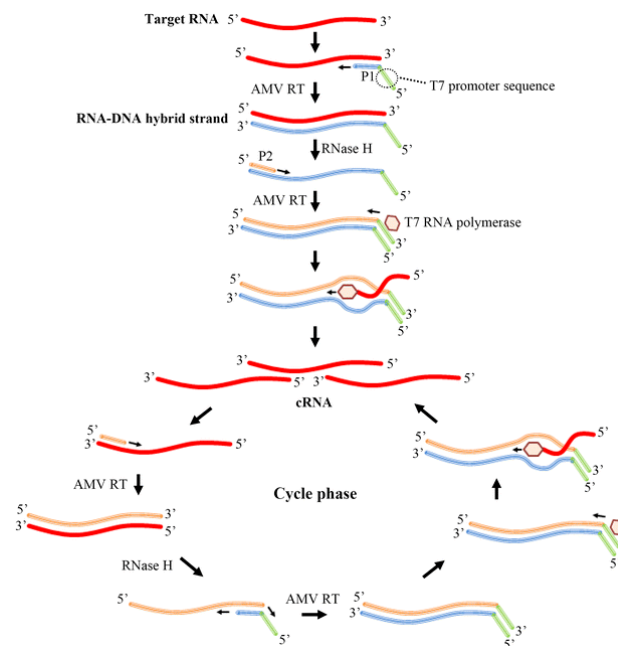


Abbildung 3: **Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der NASBA mit der Initialen Phase und der zyklischen Phase. Die Anfängliche RNA wird durch die Hybridisation von Primern in ein DNA/RNA hybrid überführt, dieses über einen RNase verdaut und 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. Modifiziert nach Zhong and Zhao (2018).

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 liegen, wodurch der FRET-Effekt einsetzt. 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 Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die von (Piepenburg et al. 2006) entwickelte Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) ist ein von dem Replikationszyklus der T4 Bakteriophage angepasstes isothermales Amplifikationssystem (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Der Mechanismus beruht dabei auf einem Zusammenspiel aus mehreren Enzymen (recombinase, recombinase loading factor, single-stranded binding protein und DNA-Polymerase), welche die vervielfältigung von DNA koordinieren (Li, Macdonald, and Stetten 2019; [anquelle?](#)). Im ersten Schritt bindet die T4 UvsX Rekombinase mithilfe des T4 UvsX Rekombinase Co-Enzyms unter ATP verbrauch an einzelsträngige Primer (Daher et al. 2016; Lobato and OSullivan 2018). Der entstandene Rekombinase-Primer-Komplex migriert entlang doppelsträngiger DNA und sucht zu den gebundenen Primern homologe Sequenzen. Wird ein homologer Bereich gefunden, verdrängt der Komplex den Doppelstrang und bindet mithilfe des Primers unter Bildung einer D-Schleife an den homologen DNA-Einzelstrang. Der Rekombinase-Komplex dissoziiert nach erfolgreicher Primerbindung unter ATP verbrauch und kann wieder an neue Primer binden. Eine rehybridisierung und die damit verbundene Verdünnung des gebundenen Primer durch den abgespaltenen DNA-Einzelstrang wird durch die Anlagerung von single stranded binding Proteins (SSB's) an diesen Verhindert (Babu, Ochoa-Corona, and Paret 2018). Anschließend bindet die DNA-Polymerase (Sau DNA polymerase, abgeleitet von dem Bakterium *staphylococcus aureus*) an das freie 3'-OH Ende des hybridisierten Primers und verlängert diesen komplementär zur DNA. Dabei besitzt die Sau DNA Polymerase eine Strangverdrängungsaktivität, wodurch die den DNA-Doppelstrang weiter aufbrechen und somit die Verlängerung des Primers fortsetzen kann. Dies führt zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA (Babu, Ochoa-Corona, and Paret 2018; Tan et al. 2022).

Um unter anderem eine Dissoziation des Rekombinase-Primer-Komplexes zu unterbinden und so die Amplifikation zu beschleunigen wird ein Polyethylen Glucol (PEG) mit hohem molekularem Gewicht, ein sogenannter “Crowding-Agent” verwendet (Lobato and OSullivan 2018; Lillis et al. 2016). Dieser trägt zu einer Viskosität der Reaktionslösung bei und erschwert so die Diffusion. Zusammen mit den niedrigen Reaktionstemperaturen von ~40 °C und der dadurch geringen Thermischen Konvektion kann es zur lokalen Reagenzien-Knappheit kommen, wodurch eine Minderung der Amplifikationsrate entsteht. Aus diesem Grund kann vorallem bei niedrigen DNA-Konzentrationen ein zusätzlicher Mischschritt während der laufenden RPA-Reaktion erforderlich sein (Lillis et al. 2016). Ebenfalls kann Analog zur RT-PCR, die RPA mit ei-

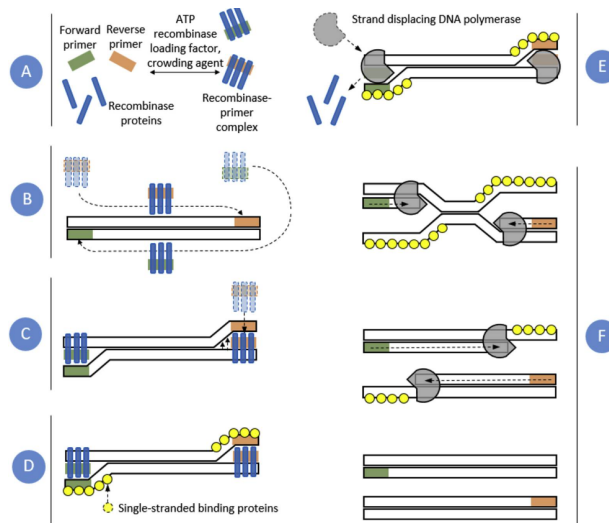


Abbildung 4: **Schematischer Reaktionsmenismus der RPA:** **A:** Bildung der Rekombinase-Primer-Komplexe unter ATP verbrauch. **B:** Migration der Rekombinase-Primer-Komplexe entlang der Ziel DNA bis zu den homologen Primersequenzen. **C:** Insertion des Rekombinase-Primer-Komplexes in die doppelsträngige DNA mit der Bindung des Primer an die komplementäre Sequenz. **D:** Stabilisierung der einzelsträngigen DNA durch die SSB's. **E:** Dissoziation der Rekombinase nach erfolgreicher Primerbindung und beginn der Amplifikation durch die Polymerase. **F:** Fortschreiten der Amplifikation bis zwei neue komplementäre doppelsträngige DNA-Moleküle vorliegen und der Mechanismus von vorne beginnen kann. Modifiziert nach Lobato and OSullivan (2018).

ner Reversen Transkription Reaktion kombiniert werden um RNA zu vervielfältigen (H. M. Yoo, Kim, and Kim 2021). Ein wichtiger Punkt der RPA ist das spezielle Primerdesign. Im Gegensatz zur PCR werden hier längere Oligonukleotide (zwischen 30 - 35 bp) verwendet, welche einen Amplifikationsbereich von wenigen 100 Nukleotiden einspannen (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Es konnte gezeigt werden, dass bis zu drei Nukleotid-Mismatches in den jeweiligen Primern, die Detektion nicht beeinflussen (Boyle et al. 2013), auch wenn eine Studie von Higgins et al. (2022) zum Schluss kam, dass viel mehr die Kombination der Mismatches als die Anzahl einen Einfluss auf die Reaktion hat (Higgins et al. 2022). Ein automatisiertes Programm für das Design der RPA-Primer wurde ebenfalls beschrieben (Higgins et al. 2018). Detektion mit Sonde + Sondendesign

solidphase RPA

8tel ansatz erwähnen

1.5 Ziel der Arbeit

Das Projekt R&C.net befasst sich mit der Erstellung eines mobilen Kofferlabors für die Point of Care Diagnostik und vor Ort Analytik. Schwerpunkt bildet dabei die Detektion viraler Atemwegs-Infektionserkrankungen. Ziel der Arbeit ist es, jeweils ein RPA-System für den Einsatz im Kofferlabor zum Nachweis der Influenza A und B Viren zu entwickeln. Dabei soll das Influenza A System die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nachweisen können und die Influenza B RPA alle PAN-Influenza B Viren detektieren können. Die Entwicklung der RPA-Systeme unterteilt sich dabei in das Design von Primer-Sonden-Sets, welche anschließend auf Eignung geprüft werden, sowie Sensitivitäts- und Spezifitätstest des geeigneten Systems. weiterführend soll die Wirk-

samkeit der Entwickelten RPA-Systeme in einem klinischen Probenhintergrund getestet und die Sensitivität mit PCR-Systemen für die Detektion der gleichen Viren verglichen werden. Um diese Tests durchführen zu können ist die *in vitro* Erstellung einer artifizieller viraler RNA notwendig. Des Weiteren ist es ein Ziel Optimierungsschritte zur Verbesserung der RPA-Performance der entwickelten Systeme vorzunehmen. Dabei sollen Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt der Reaktion sowie Ansatzvolumen im Vergleich zwischen 50 µl und 6 µl (8tel Ansatz) untersucht werden. Zusätzlich soll überprüft werden, ob eine Primerassymetrie einen positiven Einfluss auf die Reaktion ausübt.

- Ableitner, Oksana. 2018. *Einführung in Die Molekularbiologie*. Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-20624-6>.
- 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>.
- Babu, Binoy, Francisco M. Ochoa-Corona, and Mathews L. Paret. 2018. “Recombinase Polymerase Amplification Applied to Plant Virus Detection and Potential Implications.” *Analytical Biochemistry* 546 (April): 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>.
- 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>.
- Biggerstaff, Matthew, Simon Cauchemez, Carrie Reed, Manoj Gambhir, and Lyn Finelli. 2014. “Estimates of the Reproduction Number for Seasonal, Pandemic, and Zoonotic Influenza: A Systematic Review of the Literature.” *BMC Infectious Diseases* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-480>.
- Boyle, David S., Dara A. Lehman, Lorraine Lillis, Dylan Peterson, Mitra Singhal, Niall Armes, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, and Julie Overbaugh. 2013. “Rapid Detection of HIV-1 Proviral DNA for Early Infant Diagnosis Using Recombinase Polymerase Amplification.” Edited by Gary J. Nabel. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>.
- Brendish, Nathan J., Hannah F. Schiff, and Tristan W. Clark. 2015. “Point-of-Care Testing for Respiratory Viruses in Adults: The Current Landscape and Future Potential.” *Journal of Infection* 71 (5): 501–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008>.
- Bustin, S A, V Benes, T Nolan, and M W Pfaffl. 2005. “Quantitative Real-Time RT-PCR – a Perspective.” *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3): 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>.
- Bustin, SA. 2000. “Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays.” *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–93. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- 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>.
- Daher, Rana K, Gale Stewart, Maurice Boissinot, and Michel G Bergeron. 2016. “Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications.” *Clinical Chemistry* 62 (7): 947–58. <https://doi.org/10.1373>

[clinchem.2015.245829](#).

- 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>.
- Foni, Emanuela, Chiara Chiapponi, Laura Baioni, Irene Zanni, Marianna Merenda, Carlo Rosignoli, Constantinos S. Kyriakis, et al. 2017. "Influenza d in Italy: Towards a Better Understanding of an Emerging Viral Infection in Swine." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12012-3>.
- Gaňová, Martina, Haoqing Zhang, Hanliang Zhu, Marie Korabečná, and Pavel Neužil. 2021. "Multiplexed Digital Polymerase Chain Reaction as a Powerful Diagnostic Tool." *Biosensors and Bioelectronics* 181 (June): 113155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155>.
- Goble, Joseph A., and Patrick T. Rocafort. 2016. "Point-of-Care Testing." *Journal of Pharmacy Practice* 30 (2): 229–37. <https://doi.org/10.1177/0897190015587696>.
- Guatelli, J C, K M Whitfield, D Y Kwoh, 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>.
- Hause, Ben M., Mariette Ducatez, Emily A. Collin, Zhiguang Ran, Runxia Liu, Zizhang Sheng, Anibal Armien, et al. 2013. "Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza c Viruses." Edited by Ron A. M. Fouchier. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>.
- Higgins, Matthew, Matt Ravenhall, Daniel Ward, Jody Phelan, Amy Ibrahim, Matthew S Forrest, Taane G Clark, and Susana Campino. 2018. "PrimedRPA: Primer Design for Recombinase Polymerase Amplification Assays." Edited by John Hancock. *Bioinformatics* 35 (4): 682–84. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>.
- Higgins, Matthew, Oliver W. Stringer, Daniel Ward, Jennifer M. Andrews, Matthew S. Forrest, Susana Campino, and Taane G. Clark. 2022. "Characterizing the Impact of Primer-Template Mismatches on Recombinase Polymerase Amplification." *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–16. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005>.
- 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>.
- Islam, Md Mamunul, and Dipak Koirala. 2022. "Toward a Next-Generation Diagnostic Tool: A Review on Emerging Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques for the Detection of SARS-CoV-2 and Other Infectious Viruses." *Analytica Chimica Acta* 1209 (May): 339338. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338>.
- 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>.
- Javanian, Mostafa, Mohammad Barary, Sam Ghebrehewet, Veerendra Koppolu, VeneelaKrishnaRekha Vasisgala, and Soheil Ebrahimpour. 2021. “A Brief Review of Influenza Virus Infection.” *Journal of Medical Virology* 93 (8): 4638–46. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>.
- Kang, Tongjia, Jingming Lu, Tian Yu, Yi Long, and Guozhen Liu. 2022. “Advances in Nucleic Acid Amplification Techniques (NAATs): COVID-19 Point-of-Care Diagnostics as an Example.” *Biosensors and Bioelectronics* 206 (June): 114109. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109>.
- 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>.
- Koutsakos, Marios, Thi HO Nguyen, Wendy S Barclay, and Katherine Kedzierska. 2016. “Knowns and Unknowns of Influenza b Viruses.” *Future Microbiology* 11 (1): 119–35. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>.
- 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>.
- Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix von Stetten. 2019. “Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification.” *The Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>.
- Lillis, Lorraine, Joshua Siverson, Arthur Lee, Jason Cantera, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, Dara A. Lehman, and David S. Boyle. 2016. “Factors Influencing Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Assay Outcomes at Point of Care.” *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>.
- Lobato, Ivan Magriñá, and Ciara K. OSullivan. 2018. “Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances.” *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98 (January): 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
- 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.
- Ma, Haiyan, Kristin N. Bell, and Rossi N. Loker. 2021. “qPCR and qRT-PCR Analysis: Regulatory Points to Consider When Conducting Biodistribution and Vector Shedding Studies.” *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 20 (March): 152–68. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>.
- Malek, Larry, Roy Sooknanan, 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>.
- Mülhardt, Cornel. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0): 263–73. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- 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>.
- Njouom, Richard, Gwladys Chavely Monamele, Burcu Ermetel, Serge Tchatchouang, Sylvie Moyo-Tetang, John W. McCauley, and Rodney S. Daniels. 2019. "Detection of Influenza c Virus Infection Among Hospitalized Patients, Cameroon." *Emerging Infectious Diseases* 25 (3): 607–9. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181213>.
- 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>.
- Paules, Catharine, and Kanta Subbarao. 2017. "Influenza." *The Lancet* 390 (10095): 697–708. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30129-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30129-0).
- Piepenburg, Olaf, Colin H Williams, Derek L Stemple, and Niall A Armes. 2006. "DNA Detection Using Recombination Proteins." Edited by James Haber. *PLoS Biology* 4 (7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- Pumford, Elizabeth A., Jiakun Lu, Iza Spaczai, Matthew E. Prasetyo, Elaine M. Zheng, Hanxu Zhang, and Daniel T. Kamei. 2020. "Developments in Integrating Nucleic Acid Isothermal Amplification and Detection Systems for Point-of-Care Diagnostics." *Biosensors and Bioelectronics* 170 (December): 112674. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>.
- Ranasinghe, Rohan T., and Tom Brown. 2005. "Fluorescence Based Strategies for Genetic Analysis." *Chemical Communications*, no. 44: 5487. <https://doi.org/10.1039/b509522k>.

- RKI. 2019. “Infektionsepidemiologisches Jahrbuch Meldepflichtiger Krankheiten Für 2018.” *Robert-Koch-Institut*. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile.
- Sanjuán, Rafael, and Pilar Domingo-Calap. 2016. “Mechanisms of Viral Mutation.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4433–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.
- 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/10.1038/emi.2012.38>.
- Sharma, Aarjoo, Sanjeev Balda, Mansi Apreja, Kirti Kataria, Neena Capalash, and Prince Sharma. 2021. “COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques.” *International Journal of Biological Macromolecules* 193 (December): 1835–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016>.
- 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>.
- Sreejith, Kamalalayam Rajan, Chin Hong Ooi, Jing Jin, Dzung Viet Dao, and Nam-Trung Nguyen. 2018. “Digital Polymerase Chain Reaction Technology – Recent Advances and Future Perspectives.” *Lab on a Chip* 18 (24): 3717–32. <https://doi.org/10.1039/c8lc00990b>.
- Tan, Meiying, Chuan Liao, Lina Liang, Xueli Yi, Zihan Zhou, and Guijiang Wei. 2022. “Recent Advances in Recombinase Polymerase Amplification: Principle, Advantages, Disadvantages and Applications.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (November). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1019071>.
- Thornton, Brenda, and Chhandak Basu. 2011. “Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software.” *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145–54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- 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>.
- Uyeki, Timothy M, David S Hui, Maria Zambon, David E Wentworth, and Arnold S Monto. 2022. “Influenza.” *The Lancet* 400 (10353): 693–706. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5).
- 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>.
- Wood, Gary S., Rosnn M. Tung, Andreas C. Heaffner, Carol F. Crooks, Shaoyi Liao, Rachaci Orozco, Hendrik Veelken, et al. 1994. "Detection of Clonal t-Cell Receptor γ Gene Rearrangements in Early Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome by Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR/DGGE)." *Journal of Investigative Dermatology* 103 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114>.
- Yoo, Hee Min, Il-Hwan Kim, and Seil Kim. 2021. "Nucleic Acid Testing of SARS-CoV-2." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6150. <https://doi.org/10.3390/ijms22116150>.
- Yoo, Sung J., Taeyong Kwon, and Young S. Lyoo. 2018. "Challenges of Influenza a Viruses in Humans and Animals and Current Animal Vaccines as an Effective Control Measure." *Clinical and Experimental Vaccine Research* 7 (1): 1. <https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1>.
- 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>.
- Zhao, Yongxi, Feng Chen, Qian Li, Lihua Wang, and Chunhai Fan. 2015. "Isothermal Amplification of Nucleic Acids." *Chemical Reviews* 115 (22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>.
- Zhong, Junliang, and Xihong Zhao. 2018. "Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Food-borne Pathogens." *Food Analytical Methods* 11 (6): 1543–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>.