

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Diskussion</b>	<b>2</b>
1.1	Design der Primer und deren Einfluss auf die RT-RPA . . . . .	2
1.2	Vorteile der low-Volume RPA hinsichtlich Mischzeitpunkt und Sensitivität . . . . .	4
1.3	Diskussion Sensitivitäten . . . . .	5
1.4	Diskussion Asymmetrie . . . . .	5
1.5	Diskussion Sondeneinfluss . . . . .	5
1.6	Diskussion ditch . . . . .	5

# 1 Diskussion

Influenza Viren sind eine der bedeutendsten viralen Atemwegs-Infektionserkrankungen mit mehr als 300.000 jährlichen Todesfällen weltweit. Die Antivirale Therapie unterliegt einer starken Zeitanhängigkeit und muss spezifisch für die verschiedenen Subtypen angepasst werden, was eine frühzeitige Detektion für den Behandlungserfolg unerlässlich macht.

Ziel der Arbeit ist es jeweils ein RT-RPA Nachweissystem zur Detektion der Influenza A und B Viren für die Point-of-care Diagnostik zu entwickeln und dieses zu optimieren. Zusätzlich sollte der Einfluss einer Primerasymmetrie und verschiedener Sondenmodifikationen auf die RT-RPA untersucht werden.

Es konnten RT-RPA's für die Detektion der Influenza A und B Viren entwickelt werden, wobei die Influenza B RT-RPA als Pan-Influenza B Nachweis dient und die Influenza A RT-RPA die Subtypen H1N1 und H3N2 detektieren kann. Des Weiteren konnte ein positiver Effekt einer Primerasymmetrie auf die RPA festgestellt werden, welcher jedoch im Zusammenhang mit der Hybridisierungsposition der Sonde steht. Ebenfalls konnte anhand der Influenza A RT-RPA ein Einfluss des Sondendesigns hinsichtlich *dt-Quenched* und *internally Quenched* festgestellt werden, wobei die *dt-Quenched* Sonde zu einer erhöhten Sensitivität im Vergleich zu der *internally Quenched* Sonde führt.

## 1.1 Design der Primer und deren Einfluss auf die RT-RPA

Bei der Wahl des Amplifikationsbereiches für die Influenza B RT-RPA wurde sich für das Genomsegment 8 entschieden. Dabei wurde sich an der Literatur von RT-PCR Systemen orientiert (Goffard et al. 2008; NCIRD 2021). Da bei Influenza B im Gegensatz zu Influenza A eine geringere Mutationsrate vorliegt und zusätzlich keine großen Antigenen Veränderungen der Oberflächenproteine beobachtet wurden (Chen and Holmes 2008; Paterson et al. 2003) konnten wie in Kapitel ?? angegeben keine Differenzen zwischen verschiedenen Stämmen in dem entsprechenden Genomsegment festgestellt werden. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der gewählte Amplifikationsbereich geeignet ist alle Viruslinien zu detektieren. Dieses wird durch @Nakauchi2014 bestätigt, welcher für die Differenzierung von der Victoria- und Yamagata-Linie das HA-Protein auf dem Genomsegment 4 verwendet [@Nakauchi2014].

Als Amplifikationsbereich für die Influenza A RT-RPA wurde das M1-Gen auf dem Genomsegment 7 gewählt, da es durch seine Funktion das am stärksten konservierte Gen ist (McCauley and Mahy 1983). Zusätzlich wurde sich an der Literatur für RT-PCR Systeme orientiert welche ebenfalls das M1-Gen zur Detektion amplifizieren (Daum et al. 2007; Suwannakarn et al. 2008; NCIRD 2021). Trotz der konserviertheit des Gens besitzt das Alignment zwischen den Subtypen H1N1 und H3N2 etliche Basenfehlpaarungen, wobei die größte Homologie im Bereich zwischen 10 bp und 250 bp zu beobachten ist (siehe Abbildung 1). Aus diesem Grund befinden sich alle vom PrimedRPA designten und von Ehnts (2013) entwickelten Primer (siehe Tabelle ??) in diesem Bereich.

Um die Basenfehlpaarungen auszugleichen wurden wie in Kapitel ?? degenertierte Basen in den Primern und Sonden eingeführt, welche die Hybridisierung erleichtern und somit die Amplifikation verbessern (Linhart and Shamir 2005). Einen anderen Ansatz verfolgte Liang et al. (2022), welcher zur Detektion der beiden Subtypen innerhalb einer RT-RPA zwei verschiedene Genomsegmente wählte (Liang et al. 2022). Dies hat jedoch den Nachteil, dass Liang et al. (2022) zwei getrennte Reaktionen zum Nachweis der Influenza Viren benötigt, während während die in dieser Arbeit entwickelte Influenza A RT-RPA nur eine Reaktion für ein aussagekräftiges Ergebnis erfordert.

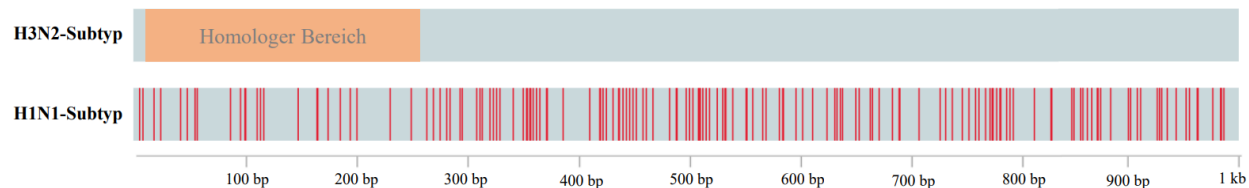


Abbildung 1: **Alignment zwischen den Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyp:** Alignment des Genomsegmentes 7 zwischen dem H1N1-Subtyp und dem H3N2-Subtyp. Der unterste Balken gibt die Sequenzlänge in bp an. Die roten Striche stehen für Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Genomsegmenten. Der orange markierte Bereich gibt den Sequenzabschnitt mit der größten Homologie an.

Wie in Abbildung ?? zu erkennen ist, sind die vom PrimedRPA Programm designten Primer für das Influenza A Virus aufgrund ihrer niedrigen Fluoreszenz und ihres späten Anstiegs unfunktionell. Betrachtet man hingegen das Primerscreening für die Influenza B RT-RPA (siehe Abbildung ??) zeigen alle entwickelten Primer-Sonden-Kombination eine Amplifikation und sind theoretisch funktionell. Somit ist eine deutliche Differenz hinsichtlich der Funktionalität des PrimedRPA Programms für die Entwicklung von Primer-Sonden-Kombinationen zu beobachten. Dies könnte an den verwendeten Sequenzvorlagen liegen, da bei Influenza A im Gegensatz zu Influenza B zwei nicht vollständig Homologe Sequenzen als Vorlage verwendet wurden. Dies führte dazu, dass die entwickelten Primer und Sonden bis zu 3 Basenfehlpaarungen je nach Subtyp aufwiesen. Jedoch konnte in der Literatur gezeigt werden, dass bis zu 6 Fehlpaarungen in den Primer die RPA nicht unfunktionell werden lassen (Boyle et al. 2013). Des Weiteren wurde durch Higgins et al. (2022) und Daher et al. (2015) gezeigt, dass vorallem Mismatches am 3' und 5'-Ende des Primers die RPA inhibieren, welche nur bei dem Forward 1 Primer auftrat und durch eine degenerierte Base teilweise vermieden wurde (Higgins et al. 2022; Daher et al. 2015). Interessanterweise besitzt das von Ehnts (2013) am 3'-Ende eine Basenfehlpaarung, welche ebenfalls durch eine degenerierte Base ausgeglichen wurde. Jedoch besitzt diese Primer-Sonden-Kombination von allen getesteten Kombinationen die beste Amplifikation. Durch die alternativen forward Primer (E.2 und E.3) wurde probiert diese Fehlpaarung zu gänzlich zu vermeiden, jedoch liegt die Amplifikation nahezu gleich bzw. leicht hinter den von Ehnts (2013) entwickelten Primern und Sonde. Dies spricht gegen die Beobachtungen Higgins et al. (2022) und Daher et al. (2015) jedoch wurden in den beiden Studien nur Fehlpaarungen in den Primer untersucht (Higgins et al. 2022; Daher et al. 2015). Liu et al. (2019) konnte zeigen, dass Mismatches in der Sonde zu einer vollständigen Inhibierung und sogar zu falsch positiven Amplifikationen der RPA führen können (Liu et al. 2019). Das könnte eine Erklärung zur großen Diskrepanz, zwischen dem von Ehnts (2013) entwickelten RPA-System und dem mit PrimedRPA designten Primer-Sonden-Kombinationen sein. Eventuell führt die Verteilung der Basenfehlpaarungen in den PrimedRPA-Sonden zu einer unfunktionellen RT-RPA während die von Ehnts (2013) entworfene Sonde nur bedingt inhibierende Fehlpaarungen aufweist. Des Weiteren ist bei dem Primerscreening der Influenza B RT-RPA (siehe Abbildung ??) am Beispiel der beiden getesteten Sonden zu erkennen, dass nicht nur Basenfehlpaarungen sondern auch andere Einflüsse zu unterschiedlicher RPA-Performance führen. So kann Einerseits die Hybridisierungsposition der Sonde im gleichen Amplifikationsbereich zu einer signifikanten Veränderung der Amplifikation führen (Liu et al. 2019). Andererseits kann die zu detektierende RNA, durch Bildung von Sekundärstrukturen die Amplifikation behindern (Saisuk et al. 2019). So konnte beispielsweise Wei and To (2003) innerhalb einer PCR zeigen, dass eine RNA-sekundärstruktur trotz der hohen Temperaturen in der PCR die Amplifikation inhibierte (Wei and To 2003).

Betrachtet man die Hybridisierungsposition der für die Influenza A RT-RPA entwickelten Primer und Son-

den liegen diese am Anfang der der Genomsequenz bei ~50 bp bis ~ 200 bp (siehe Tabelle ??). Wie in Kapitel ?? erwähnt sind die jeweiligen Enden eines Genomsegmentes komplementär zueinander und bilden im Virion eine Loop-Struktur aus (Modrow et al. 2010). Somit kann diese Loop-Struktur *in vitro* eventuell die Amplifikation der Influenza A RT-RPA inhibieren, da der Amplifikationsbereich am Anfang der Genomsequenz liegt. Damit lässt sich der Unterschied zwischen der Influenza A RT-RPA und der Influenza B RT-RPA erklären, da bei der Influenza B RT-RPA der Amplifikationsbereich mittig in der Genomsequenz zwischen ~650 bp und ~730 bp liegt und ist somit von der Loop-Struktur nicht beeinflusst wird.

Ausblick Primerdesign -> mismatches durch H1N1 und H3N2 (evtl. anderes Target diskutieren, polymerase oder so)

-> alternativen diskutieren (gleiche sonde aber 2 Primer paare, wie die PCR das gemacht hat)

## 1.2 Vorteile der low-Volume RPA hinsichtlich Mischzeitpunkt und Sensitivität

Wie in ?? erwähnt kommt es während der RPA durch geringe Thermische Konfektion und durch den crowding Agent erschwerte Diffusion zu lokaler Reagenzien-Knappheit. Um dem entgegen zu wirken, wird eine zusätzlichen Mischschritt während der Reaktion durchgeführt, welcher zu einer erneuten homogenisierung der Reaktion führt (Lillis et al. 2016). Lillis et al. (2016) konnte jedoch zeigen, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens auf 5 µl die Notwendigkeit des zusätzlichen Mischschrittes minimiert (Lillis et al. 2016). Wie in ?? gezeigt, konnte ein ähnliches Verhalten mit der low-Volume RPA anhand der Influenza B RT-RPA beobachtet werden. Hier wurde das Reaktionsvolumen auf 6,5 µl angepasst was einem leicht höheren Volumen als dem von Lillis et al. (2016) entspricht. Jedoch stellt sich im Vergleich zwischen den Mischzeiten des 50 µl Ansatzes und der low-volume RPA heraus, dass der Mischschritt bei der low-volume RPA erst einen deutlichen Einfluss bei  $10^1$  RNA-Kopien auswirkt (siehe Abbildung ??) und die maximale Fluoreszenz und die Anzahl der positiven Amplifikationen deutlich verbessert. Im 50 µl Ansatz hingegen kann schon eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenz und eine große Verbesserung des TT-Wertes bei  $10^4$  RNA-Kopien beobachtet werden. Diese Beobachtung stimmen mit den von Lillis et al. (2016) überein. Eine mögliche Begründung liegt darin, dass einerseits durch das verringerte Volumen ein größeres Verhältnis zwischen hinzugefügter Probe und Reaktionsmix besteht und dadurch eine bessere Diffusion stattfindet. Andererseits führt das geringere Volumen zu einem größeren Oberflächen-Volumen Verhältnis, welches zu einer besseren Wärmeübertragung und dementsprechend einer stärkeren Konvektion führt (Böckh and Wetzel 2017).

Des Weiteren konnte anhand der Influenza B RT-RPA beobachtet werden, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens zu einer deutlichen Sensitivitätserhöhung von über 50 % führt. Der gleiche Effekt konnte, wenn auch nicht so stark konnte ebenfalls durch Lillis et al. (2016) nachgewiesen werden. Ob es sich hierbei um eine signifikante Änderung handelt muss in einer weiteren Versuchsreihe bestätigt werden, da das Detektionslimit in dieser Arbeit für den 50 µl Ansatz nur in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Dieses Phänomen der Sensitivitätsverbesserung lässt sich ebenfalls durch das erhöhte Verhältnis zwischen eingesetzter Probe und RPA-Reaktion und der erhöhten Konvektion erklären.

Zusätzlich bietet die low-volume RPA den Vorteil der Kostenreduzierung, da aus einer kommerziell erhältlichen Reaktion acht Tests durchgeführt werden können (siehe ??). Dies macht die low-volume RPA gerade für ressourcen limitierte Umgebungen attraktiv, da sie geringe Kosten pro Test zusammen mit einfacher Handhabung, durch die gesteigerte Unabhängigkeit des Mischschrittes, hoher Sensitivität sowie robusten Reagenzien (Lillis et al. 2016) kombiniert (Jiang et al. 2021).

Durch das verringerte Reaktionsvolumen von 6,5 µl eignet sich die low-Volume RPA für den Einsatz in der

Mikrofluidik, wo sie mit 3D-gedruckten Detektionschips kombiniert werden kann (Behrmann, Hügler, et al. 2020). Dadurch erweitern sich ihre Applikationsmöglichkeiten in der POCT und Testsysteme können vereinfacht und verbessert werden (Behrmann, Bachmann, et al. 2020).

Es konnte beobachtet werden, dass große Mengen an DNA die RPA inhibieren (Li, Macdonald, and Stetten 2019; Rohrman and Richards-Kortum 2015), diese Inhibition ist jedoch Konzentrationsabhängig (Clancy et al. 2015). Dies könnte die low-volume RPA einschränken, da durch das erhöhte Proben/RPA-Verhältnis auch die Konzentration von humaner Hintergrund-DNA steigt und somit die RPA inhibiert. Zusätzlich konnten die positiven Effekte der low-Volume RPA nur anhand der Influenza A RT-RPA beobachtet werden. Eine Adaption an die low volume RPA für die Influenza A RT-RPA konnte durch die höheren TT-Werte und linearen Amplifikationsverlauf, welcher auf eine schlechte Kinetik deutet, da keine exponentielle Amplifikation mehr vorliegt, nicht erreicht werden. Dementsprechend lässt sich sagen, dass die low-volume RPA nicht für alle RPA-Assays adaptierbar ist und somit die Applikation eingeschränkt wird. Des Weiteren wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens nur bei RNA-Viren beschrieben (Lillis et al. 2016), wodurch eine Adaption auf DNA-basierte Amplifikationen noch unklar ist.

noch mal nen Abschlussatz schreiben ob jetzt low-volume Toll oder nicht ist oder das lieber in der Zusammenfassung/Ausblick

Shen et al. (2011) slipChip → digitale RPA = single nucleotide Detection

### 1.3 Diskussion Sensitivitäten

Wie in Kapitel ?? beschrieben liegt das Detektionslimit der optimierten low-Volume RT-RPA für den Influenza B Virus bei 14,6 RNA-Kopien. Im Vergleich zu der getesteten RT-PCR von NCIRD (2021) konnte eine Differenz von nur 3 Kopien festgestellt werden. Allerdings befinden sich hier die Sensitivitätsmessungen bei beiden Systemen im Bereich von  $2 \cdot 10^0$  RNA-Kopien. In diesen Sensitivitätsbereich spielt einerseits die zufällige Diffusion eine Rolle und bestimmt ob die einzelnen Reaktionskomponenten miteinander interagieren. Andererseits minimale Ungenauigkeiten bei der Verdünnung der RNA-Standards, welche dazu führen, dass keine nachweisbaren RNA-Kopien . Dies lässt sich in Abbildung @ref(fig:...) beobachten. Hier zeigt eine Amplifikation, bei welcher durch zufällige Diffusion die Reaktionskomponenten miteinander interagieren konnten, einen deutlichen Anstieg, während alle anderen Amplifikationen gar keine Signalveränderung aufweisen. Bei dem Vergleich der optimierten

→ Methode diskutieren

### 1.4 Diskussion Asymmetrie

### 1.5 Diskussion Sondeneinfluss

### 1.6 Diskussion ditch

Temperatur und Ditching

Glökler et al. (2021) → RPA als vorherrschende und beste Methode, da sie viel kombiniert (großer Vergleich mit anderen isothermen Amplifikationen) Lutz et al. (2010) ditch erstmals erwähnt Faye et al. (2021) dt Probe design

- Primer design

- Influenza B (gibt nicht viel zu diskutieren, hat super geklappt)
  - > warum gewähltes target
- Influenza A (warum hat es nicht geklappt)
  - > genomstruktur (macht sone schleife, mal in eigenhybridisierungs ding hauen )
- Optimierungen (warum wurden die Parameter so gewählt)
  - Influenza A
  - Influenza B -> lab on Chip mit 8tel Ansatz
  - wie wichtig ist Mischen am Beispiel in InfB
- Sensitivitätsanalysen
  - Vergleich mit PCR
  - Vergleich 50µl und 8tel-Ansatz -> welche Vorteile hat 8tel-Ansatz
  - Sensitivität im Klinischen Background reicht das für klinische Proben
- Spezifität
- R-Programm
  - unterschiede zwischen RPA und PCR
    - > Mischen (evtl. Lücke in den Daten)
    - > Negativkontrolle (leichter linearer Anstieg)
    - > Überexponentielle Amplifikation oder linearer Anstieg (nicht immer Sigmoidale Kurve, hängt mich dem Mechanismus zusammen)
    - > ditching
  - Wie wirken sich die Unterschiede auf die Tests aus
    - > Normalverteilung (sehr wichtig, kann aber auch bei PCR sein, wurde nicht getestet)
    - > linear Regression test (wird rausgelassen)
    - > resids growth test
  - mögliche Lösungen
    - > algorithmus für ditching
    - > normalverteilung anpassen
    - > threshold diskutieren

- Assymetrie
  - Warum hat die Assymetrie so einen Erfolg
  - Warum macht die Assymetrie so großes Ditching
- Sondendesign
  - warum ist dt-besser

- Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Martin Spiegel, Marina Schramm, Ahmed Abd El Wahed, Gerhard Dobler, Gregory Dame, and Frank T Hufert. 2020. “Rapid Detection of SARS-CoV-2 by Low Volume Real-Time Single Tube Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Using an Exo Probe with an Internally Linked Quencher (Exo-IQ).” *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–54. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>.
- Behrmann, Ole, Matthias Hügler, Franz Eckardt, Iris Bachmann, Cecilia Heller, Marina Schramm, Carrie Turner, Frank Hufert, and Gregory Dame. 2020. “3d Printed Monolithic Microreactors for Real-Time Detection of *Klebsiella Pneumoniae* and the Resistance Gene blaNDM-1 by Recombinase Polymerase Amplification.” *Micromachines* 11 (6): 595. <https://doi.org/10.3390/mi11060595>.
- Böckh, Peter von, and Thomas Wetzel. 2017. “Freie Konvektion.” In *Wärmeübertragung*, 141–54. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-55480-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-55480-7_4).
- 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>.
- Chen, Rubing, and Edward C. Holmes. 2008. “The Evolutionary Dynamics of Human Influenza b Virus.” *Journal of Molecular Evolution* 66 (6): 655–63. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>.
- Clancy, Eoin, Owen Higgins, Matthew S. Forrest, Teck Wee Boo, Martin Cormican, Thomas Barry, Olaf Piepenburg, and Terry J. Smith. 2015. “Development of a Rapid Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of *Streptococcus Pneumoniae* in Whole Blood.” *BMC Infectious Diseases* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1212-5>.
- Daher, Rana K., Gale Stewart, Maurice Boissinot, Dominique K. Boudreau, and Michel G. Bergeron. 2015. “Influence of Sequence Mismatches on the Specificity of Recombinase Polymerase Amplification Technology.” *Molecular and Cellular Probes* 29 (2): 116–21. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.11.005>.
- Daum, Luke T., Linda C. Canas, Bernard P. Arulanandam, Debra Niemeyer, James J. Valdes, and James P. Chambers. 2007. “Real-Time RT-PCR Assays for Type and Subtype Detection of Influenza a and b Viruses.” *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1 (4): 167–75. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2007.00024.x>.
- Ehnts, Kai Ilmo. 2013. “Entwicklung von Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Nachweisverfahren Für Virale Erreger von Atemwegsinfektionen.” *Dissertation Der Medizinischen Fakultät Der Georg-August-Universität Zu Göttingen*. <https://doi.org/10.53846/goediss-3943>.
- Faye, Martin, Ahmed Abd El Wahed, Oumar Faye, Jonas Kissenkötter, Bernd Hoffmann, Amadou Alpha Sall, and Ousmane Faye. 2021. “A Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Rabies Virus.” *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82479-8>.
- Glöckler, Jörn, Theam Soon Lim, Jeunice Ida, and Marcus Frohme. 2021. “Isothermal Amplifications – a Comprehensive Review on Current Methods.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 56 (6): 543–86. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1937927>.
- Goffard, A., A.-S. Beugin, D. Hober, J. Ogiez, and A. Dewilde. 2008. “Mise Au Point d’une Technique de



- RT-PCR Duplex En Temps réel Pour La détection Des Virus Influenza a Et b.” *Pathologie Biologie* 56 (7-8): 482–86. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.07.030>.
- 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>.
- Jiang, Nan, Natha Dean Tansukawat, Laura Gonzalez-Macia, H. Ceren Ates, Can Dincer, Firat Güder, Savas Tasoglu, and Ali K. Yetisen. 2021. “Low-Cost Optical Assays for Point-of-Care Diagnosis in Resource-Limited Settings.” *ACS Sensors* 6 (6): 2108–24. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00669>.
- 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>.
- Liang, Li-Guo, Miao-jin Zhu, Rui He, Dan-Rong Shi, Rui Luo, Jia Ji, Lin-Fang Cheng, et al. 2022. “Development of a Multi-Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Identification of COVID-19, Influenza a and b.” *Journal of Medical Virology* 95 (1). <https://doi.org/10.1002/jmv.28139>.
- 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>.
- Linhardt, Chaim, and Ron Shamir. 2005. “The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications.” *Journal of Computational Biology* 12 (4): 431–56. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>.
- Liu, Xiaoqing, Qiongying Yan, Jianfei Huang, Jing Chen, Zhengyang Guo, Zhongdong Liu, Lin Cai, et al. 2019. “Influence of Design Probe and Sequence Mismatches on the Efficiency of Fluorescent RPA.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (6). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2620-2>.
- Lutz, Sascha, Patrick Weber, Max Focke, Bernd Faltin, Jochen Hoffmann, Claas Müller, Daniel Mark, et al. 2010. “Microfluidic Lab-on-a-Foil for Nucleic Acid Analysis Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification (RPA).” *Lab on a Chip* 10 (7): 887. <https://doi.org/10.1039/b921140c>.
- 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>.
- NCIRD. 2021. “National Center for Immunization and Respiratory Diseases (u.s.).” *Research Use Only CDC Flu Sc2 Multiplex Assay Primers and Probes*, July. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/107944>.
- Paterson, Reay G, Makoto Takeda, Yuki Ohigashi, Lawrence H Pinto, and Robert A Lamb. 2003. “Influenza b Virus BM2 Protein Is an Oligomeric Integral Membrane Protein Expressed at the Cell Surface.” *Virology* 306 (1): 7–17. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00083-1).
- Rohrman, Brittany, and Rebecca Richards-Kortum. 2015. “Inhibition of Recombinase Polymerase Amplification by Background DNA: A Lateral Flow-Based Method for Enriching Target DNA.” *Analytical Chemistry* 87 (3): 1963–67. <https://doi.org/10.1021/ac504365v>.
- Saisuk, W., C. Srisawat, S. Yoksan, and T. Dharakul. 2019. “Hybridization Cascade Plus Strand-Displacement Isothermal Amplification of RNA Target with Secondary Structure Motifs and Its Application for Detecting Dengue and Zika Viruses.” *Analytical Chemistry* 91 (5): 3286–93. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03736>.



- Shen, Feng, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Jason E. Kreutz, Olaf Piepenburg, and Rustem F. Ismagilov. 2011. “Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions on SlipChip.” *Analytical Chemistry* 83 (9): 3533–40. <https://doi.org/10.1021/ac200247e>.
- Suwannakarn, Kamol, Sunchai Payungporn, Thaweesak Chieochansin, Rujipat Samransamruajkit, Alongkorn Amonsin, Thaweesak Songserm, Arunee Chaisingh, et al. 2008. “Typing (a/b) and Subtyping (H1/H3/H5) of Influenza A Viruses by Multiplex Real-Time RT-PCR Assays.” *Journal of Virological Methods* 152 (1-2): 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.002>.
- Wei, Shaojing, and Shing Shun Tony To. 2003. “Influence of RNA Secondary Structure on HEV Gene Amplification Using Reverse-Transcription and Nested Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Virology* 27 (2): 152–61. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00170-1](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00170-1).