

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Viren - Die Gefahr aus dem nichts	2
1.2	Die Influenza Viren - Pandemieversucher Nr. 1	3
1.2.1	Influenza A	4
1.2.2	Influenza B	6
1.3	Proteinbasierte Nachweismethoden von Influenza	6
1.4	Nukleinsäure amplifizierende Methoden zur Influenza Detektion	7
1.4.1	Die Polymerase Kettenreaktion	7
1.4.2	Isotherme Amplifikation	9
1.4.3	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation - LAMP	9
1.4.4	Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation - NASBA	10
1.4.5	Rekombinase Polymerase Amplifikation - RPA	12
1.5	Ziel der Arbeit	15

1 Einleitung

1.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Keime sind ernstzunehmende Bedrohungen für Menschen wie auch staatliche Systeme. Dabei sorgen gerade virale Epidemien und Pandemien wie die Spanische Grippe mit über 50 Millionen Toten ([Dharmapalan 2020](#)), das Chikungunya Virus mit mehr als 1,3 Millionen Infizierten ([Charrel et al. 2007](#)), und die aktuelle SARS-CoV-2 Pandemie mit weit über 140 Millionen Infizierten ([Bai et al. 2021](#)) für weltweite Krisen und Milliarden Schäden ([Louie et al. 2009](#)).

Viren sind ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, mit einem DNA oder RNA-Genom beschreiben. Dieses wird von Nucleoproteinen stabilisiert und ist von einer Proteinmatrix, dem sogenannten Capsid umgeben. Je nach Virusart wird das Capsid von einer zusätzlichen Phospholipid-Doppelschicht, die sogenannte Membranhülle, mit eingebetteten Membranproteinen umhüllt (siehe Abbildung 1). Dabei bilden Membranhülle und Capsid das Nucleocapsid ([Modrow et al. 2010](#)).

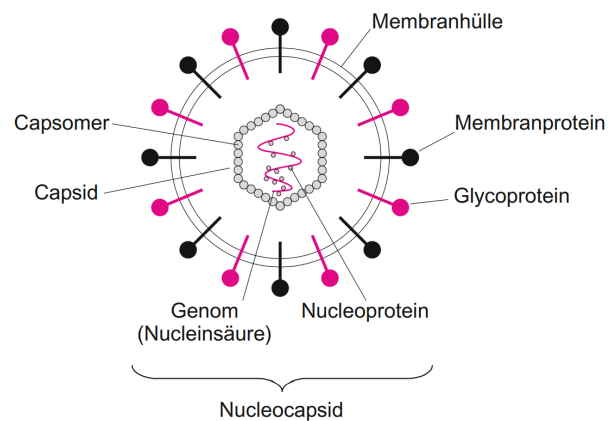


Abbildung 1: **Schematische Darstellung eines behüllten Virus** Das Virus-Genom wird von Nucleoproteinen gebunden liegt innerhalb des Capsids vor. Das Capsid ist von der Membranhülle umgeben, in welcher Membranproteine eingelagert sind ([Modrow et al. 2010](#)).

Da Viren keinen eigenen Reproduktionsmechanismus besitzen, sind sie auf die Infizierung von Zellen angewiesen, damit sie mittels der Reproduktions-Maschinerie des Wirtes ihre viralen Komponenten vervielfältigen können ([Modrow et al. 2010](#)). Eine beeindruckende Fähigkeit der Viren ist die Anpassung an neue Umgebungen und Wirte. Diese hängt von der jeweiligen Variabilität und Mutationsrate ab, welche es ihnen erlaubt eine große genetische Vielfalt zu erschaffen ([Sanjuán & Domingo-Calap 2016](#)). Dadurch bilden einige Viren ständig neue Varianten aus, welche durch ihre veränderten Infektionsstrukturen Immunlücken besetzen und dadurch Infektionsherde und Pandemien hervorrufen ([Lyons & Lauring 2018](#); [Cosar et al. 2022](#)). Die SARS-Cov-2 Pandemie hat gezeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um Infektionsketten schnell zu unterbrechen und Gesundheitssysteme zu entlasten ([Valera et al. 2021](#)). Dabei ist die Polymerase Ketten Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) die vorherrschende Testmethode **goldstandard** in der medizinischen Diagnostik, da sie durch die Amplifikation von Nukleinsäuren hohe Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht. Jedoch benötigt die PCR spezialisierte Laboratorien mit energieintensive Gerätschaften und geschultes Personal, sowie aufwendige Präparationsprotokolle, wodurch eine dezentrale Diagnostik erschwert wird ([Brendish et al. 2015](#); [Augustine et al. 2020](#); [Behrmann et](#)

al. 2020). Zusätzlich fallen durch zentrale Labore lange Transportwege an, was folglich eine Turnaround-Zeit von mehr als 24 Stunden bedingt (Brendish et al. 2015). Dadurch wird das Unterbrechen von Infektionsketten erschwert, da erkrankte Patienten binnen der 24h weitere Personen infizieren können (Sharma et al. 2021). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Routine-Diagnostik mit sensitiven und kostengünstigen Alternativen zu ergänzen, welche vor Ort als *point-of-care testing* (POCT) durchgeführt werden können (Goble & Rocafort 2016). Für das POCT werden isotherme Nukleinsäureamplifikationstechniken zur Detektion der Erreger immer interessanter, da diese im Vergleich zur PCR keine komplexen Geräte erfordern und kürzere Testzeiten anbieten können. Diese werden dezentral für die Diagnostik eingesetzt, was zu einer schnelleren Detektion am “*point of care*” führt. Durch den zielgerichteten Nachweis der Erreger können erkrankte Personen direkt identifiziert werden und somit möglicherweise eine Unterbrechung der Infektionsketten erreicht werden (Pumford et al. 2020; Islam & Koirala 2022).

1.2 Die Influenza Viren - Pandemieversacher Nr. 1

Die “echte” Grippe, verursacht durch die Influenza Viren, als bekanntester Vertreter der Orthomyxoviren, ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit jährlichen Todesfällen zwischen 290.000 und 650.000 weltweit (Iuliano et al. 2018; RKI 2019). Die Influenza Viren werden, aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und ihrer serologischen Charakteristika, in die Typen A, B, C und D eingeteilt. Sie 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, sogenannte Segmente unterteilt (Modrow et al. 2010). Von diesen Typen sind alle außer D, welcher nur Rinder und Schweine befällt, humanpathogen (Foni et al. 2017; Javanian et al. 2021). Typ A besitzt die höchste Virulenz (Yoo et al. 2018) und ist für die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verantwortlich. Dieser wird abermals in viele Subtypen, anhand der Oberflächenproteinen Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterteilt. Derzeit sind 18 Subtypen der HA bekannt (H1 - H18) und 11 Subtypen der NA (N1 - N11), welche sich abermals in Untergruppen und Kladen unterteilen lassen (Shao et al. 2017). Während nur die Subtypen H1 - H3 und N1 - N2 für den Menschen relevant sind kann Geflügel von allen Subtypen des Influenza A Virus befallen werden (Nicholson et al. 2003). Derzeit kursieren die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 in der Bevölkerung (Javanian et al. 2021). Die hohe Variabilität der HA und NA-Proteine lässt sich durch die spezielle RNA-Polymerase der Viren erklären. Diese besitzt eine hohe Replikations-Fehlerrate, welche zu veränderten Oberflächenproteinen und damit neuen Virusmutanten führt (Luo 2011). Dieser Prozess ist als “Antigendrift” bekannt und führt dazu, dass neue Varianten dem Immunsystem von vorher infizierten entgehen können (Luo 2011; Axelsen et al. 2014). Ein Besonderheit des Influenza A Virus ist der sogenannte Antigen shift. Durch das segmentierte Genom und die verschiedenen tierischen Reservoirs kann bei gleichzeitiger Infektion ein Austausch einzelner Genomsegmente erfolgen. Dies führt zu einer spontanen Neukombination der einzelnen Viruskomponenten und somit zu einer neuen HA, NA Subtyp-Kombination (Kim et al. 2018). Besonders interessant sind dabei Schweine, da sie sowohl als Wirt von den humanen als auch den geflügel Varianten dienen und somit eine Art “Mischgefäß” für den Antigen shift darstellen. Spanische Grippe erwähnen im Zusammenhang? Das kam ja auch vom Schwein glaube?

Influenza Typ B infiziert ausschließlich Menschen und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Jedoch ist die Pandemiegefahr eingeschränkt, da dieser Typ 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

meistens milde Krankheitsverläufe hervor. Jedoch wurden bei Kindern wurden jedoch Infektionen der unteren Atemwege mit schweren Verläufen beobachtet (Njouom *et al.* 2019). Neben humanen Infektionen sind auch Schweine als Wirt bekannt (Hause *et al.* 2013).

1.2.1 Influenza A

Das Genom ca. 13.5 kb große, segmentierte Genom des Influenza A Virus codiert 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 der Transkription dient (Modrow *et al.* 2010; Chen *et al.* 2018). Von den 17 codierten Proteinen sind zehn essentiell, während der Rest als sogenannte Accessoire-Proteine bezeichnet wird (Vasin *et al.* 2014). Zu den essenziellen Proteinen zählen die NA, welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das HA, welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixprotein (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). Der Aufbau des Virus sowie die Anordnung der essenziellen Proteine auf den Genom-Segmenten sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Accessoire-Proteine sind, im Gegensatz zu den essenziellen Proteinen, 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. Die alternativen ORF's entstehen dabei durch verschiedene molekularbiologische Mechanismen, wie beispielsweise *frame shifting* bei welchem das Ribosom während der Translation eine Base überspringt und somit den Leserahmen ändert, *readthrough* bei dem das Ribosom ein Stopp-codon überspringt, oder *internal Ribosome Entry* wobei das Ribosom an ein internes Start-Codon durch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird (Firth & Brierley 2012). Zu den Accessoire-Proteine zählen beispielsweise 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 2 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 ist (Krammer *et al.* 2018). Das Heterotrimer assoziiert innerhalb des Virus mit den komplementären Sequenzen an den einzelnen Genomsegmentenden. Die verbleibende RNA wird von oligomeren NP's gebunden, welches auf Segment 5 codiert ist. Der resultierende RNA-Protein-Komplex ist in der Literatur als vRNP-Komplex (engl.: *viral ribonucleoprotein*) beschrieben (Velthuis & Fodor 2016; Krammer *et al.* 2018). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des vRNP-Komplex zeigten eine doppel-helikale Struktur mit einer Schleife am nicht RNA-Polymerase assoziierten Ende (Arranz *et al.* 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht aus einer äußeren Cholesterol haltigen doppel-Lipid Schicht, in welche die Glykoproteine NA, HA und M2 integriert sind (Modrow *et al.* 2010; To & Torres 2019). 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 Glykoproteine, sowie die Lipidmembran durch seine positive Polarität (Chlanda & Zimmerberg 2016; Kordyukova *et al.* 2018). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essenzielle 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-Proteins am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley & Mahy 1983; Kordyukova

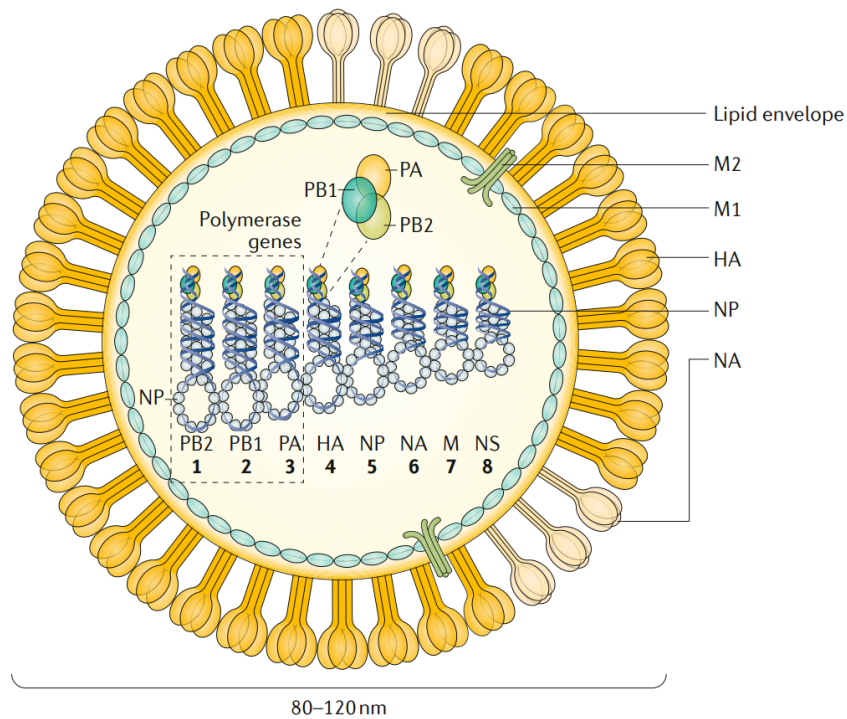


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Das Influenza A Virus besteht aus acht Genom-Segmenten, welche für die 10 essentielle Proteine codieren. Zu diesen zählen die Neuraminidase (NA), das Hämagglutinin (HA), das Matrixprotein (M1), das Membranprotein (M2), die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, das Nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, Pb1 und Pb2 der RNA-Polymerase ([Luo 2011](#); [Krammer et al. 2018](#)). Die Zahlen geben das das jeweilige Genomsegment an. Bild modifiziert nach Krammer *et al.* (2018).

et al. 2018). Das M2-Protein ist ein Ionen-Kanal, welcher im Verlauf der Virus-Infektion eine wichtige Rolle spielt (Takeuchi & Lamb 1994; To *et al.* 2016).

Infektionsmechanismus? oder wird das zu lang?

1.2.2 Influenza B

Innerhalb von saisonalen Epidemien ist das Influenza B Virus ein ständiger Begleiter des Influenza A Virus und co-zirkuliert mit diesem (Sandt *et al.* 2015). Jedoch liegt der Fokus der Forschung auf dem Influenza A Virus, da hier durch die etablierten tierischen Reservoirs ein deutlich erhöhtes Pandemierisiko besteht (Koutsakos *et al.* 2016; Zaraket *et al.* 2021). Dessen ungeachtet ist das Influenza B Virus für ca. 23 % aller Influenza-Erkrankungen mit einer besonders hohen Sterblichkeit von über 50 % bei Kindern (0 - 18 Jahre) verantwortlich (Zaraket *et al.* 2021).

Die Genomstruktur und der Aufbau der Influenza B Viren ist identisch mit dem des Influenza A Virus (siehe Abbildung 2) (Hampson & Mackenzie 2006). Jedoch unterscheiden sich die Proteine der Viren in Länge, Aminosäure-Komposition und Funktion (Koutsakos *et al.* 2016). So ist das Genom des Influenza B Virus mit rund 14,6 kb leicht größer und codiert für 11 Proteine (Paterson *et al.* 2003; Sandt *et al.* 2015). Dabei bleiben die 10 essenziellen Proteine erhalten (siehe Abbildung 2) während viele Accessoire-Proteine wegfallen (Sandt *et al.* 2015). Der wichtigste Unterschied zwischen Influenza B und Influenza liegt in zwei Proteinen, welche nur in dem Influenza B Virus enthalten sind. So codiert das Segment 6 ein NB-Protein, welches ein hochkonserviertes Protein mit Ionenkanalaktivität ist, sowie das BM2-Protein auf Segment 7 (Sandt *et al.* 2015). Letzteres ist ein kleines hydrophobes integrales Membranprotein, welches eine Ionenkanalaktivität, ähnlich wie das M2-Protein bei Influenza A, besitzt und essenziell für die Virus-Replikation ist (Paterson *et al.* 2003; Hatta *et al.* 2004). Außerdem unterscheidet sich Influenza B durch seine RNA-Polymerase, welche zusätzlich unmethylierte gecappte mRNA's erkennen kann sowie bei dem NP-Protein, welches deutliche strukturelle Unterschiede aufweist (Koutsakos *et al.* 2016). Des Weiteren besitzt das Influenza B Virus eine langsamere Mutationsrate von geschätzt Influenza A (Chen & Holmes 2008). Zusätzlich wurden bei dem Influenza B Virus keine großen Veränderungen der antigenen Oberflächenproteine beobachtet, was einerseits vermutlich daran liegt, dass keine tierischen Reservoirs vorhanden sind, andererseits kein Antigen shift mit den Influenza A Viren möglich ist (Paterson *et al.* 2003).

1.3 Proteinbasierte Nachweismethoden von Influenza

Respiratorische Erkrankungen hervorgerufen durch die Influenza Viren bleiben, trotz Impfungen und einem sich weiterentwickelndem Gesundheitssystem, ein ernst zu nehmendes Problem. Die Behandlung ist dabei zeitabhängig und Medikamente wie Oseltamivir sollten in den ersten 48h nach Symptombeginn verabreicht werden (Whitley 2007). Des Weiteren sind einige Medikamente wie Amantadin spezifisch bei dem Influenza A Virus zu verabreichen (Świerczyńska *et al.* 2022). Aus diesem Grund ist eine zeitige und spezifische Diagnostik entscheidend für eine rechtzeitige Behandlung (Vemula *et al.* 2016). Die Detektion der Influenzaviren erfolgt über standardverfahren wie Antikörpertests, Serologischen Methoden, Zellkultur sowie Nukleinsäure basierte Testverfahren wie Nukleinsäureamplifikation oder Sequenzierung erfolgen (Vemula *et al.* 2016). Bei serologischen Testverfahren wird auf Antikörper im Serum des Patienten untersucht, die gegen spezielle Virusproteinen (HA oder NA) gerichtet sind. Dadurch können einzelne Subtypen des Influenza A Virus unterschieden werden (Woźniak-Kosek A 2014). Jedoch benötigen serologische Tests für ein adäquates Ergebnis, mehrere Seren eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten. Dies verhindert eine schnelles Ergebniss und ist

somit für die Routine-Diagnostik ungeeignet (Chow *et al.* 2019). Die Diagnostik mittels Zellkultur benötigt spezielle Zelllinien und Präparation. Ein solches System ist nicht die erste Wahl für eine Schnelldiagnostik, da hier trotz hoher Spezifität und Sensivität, längere Inkubationszeiten entstehen.(Vemula *et al.* 2016; Chow *et al.* 2019). Bei den Antikörpertests wie dem direkten Fluoreszenz Antikörper Assay (engl.: *direct fluorescence antibody assay*, DFA) wird die dem Patienten entnommene Probe mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper auf Influenza spezifische Antigene untersucht. Diese kostengünstige Testmethode liefert bei kurzen Testzeiten von 2-4 h ein Ergebnis mit Sensitivitäten ab 70 % aufwärts (Kim & Poudel 2013). Des Weiteren können Influenza detektierende Schnelltests (engl.: *rapid influenza diagnosis tests*, RIDT) für die POCT verwendet werden, welche binnen 30 minuten ein Ergebniss liefern (Lin *et al.* 2022). Die Antikörpertests unterliegen jedoch Limitationen. So besitzen sie einerseits geringe Sensitivitäten und sind andererseits speifisch für ein Antigen (HA oder NA). Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, unterliegt besonders Influenza A Mutationen durch den Antigen Shift und Antigen Drift, wodurch vorallem in Pandemien neue Varianten der Antigene entstehen. Diese können nicht mehr von den Antikörpertests detektiert werden und es kommt zu falsch negativen Ergebnissen (Yi *et al.* 2013; Lin *et al.* 2022).

1.4 Nukleinsäure amplifizierende Methoden zur Influenza Detektion

Für eine genaue Diagnose sind Nachweis-Methoden mit hohen Sensitivitäten und Spezifitäten sind essentiell für eine genaue Diagnose und medizinische Behandlung. Dabei sind Nukleinsäure amplifizierende Methoden (engl.: *nucleic acid amplification techniques*, NAAT) zusammen mit Antikörpertests der Goldstandard in der klinischen Diagnostik und die empfohlenen Methoden zur Detektion von Influenzaviren (Uyeki *et al.* 2018). Innerhalb der NAAT werden einzelne Nukleinsäure-Moleküle über verschiedenste Methoden, wie PCR oder isotherme Amplifikation vermehrt (amplifiziert) und so ein Signal erzeugt. Somit ist es möglich spezifisch einzelene Nukleinsäure-Moleküle nachzuweisen (Özay & McCalla 2021; Kang *et al.* 2022). Für die Influenza Diagnostik wird routinemäßig RT-PCR verwendet, jedoch auch isotherme Assays, wie LAMP (engl.: *loop mediated isothermal amplifikation*) oder NASBA (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*) sind bereits beschrieben (Vemula *et al.* 2016). Gerade die RT-PCR biete dabei ähnlich hohe Sensitivitäten wie die Zellkultur und die Serologischen Tests und ist somit den Antikörpertests überlegen. Des Weiteren ist die Detektion von der Nukleinsäure abhänig. Durch die Wahl konservierter Sequenzbereiche sid NAAT nicht anfällig gegenüber veränderten Proteinstrukturen wodurch falsch negative Ergebnisse, hervorgerufen durch neue Varianten vermieden werden können. (Woźniak-Kosek A 2014).

dabei im Vergleich zu anderen Diagnostik-Methoden schnelle Resultate und können zwischen Subtypen unterscheiden (Uyeki *et al.* 2018).

1.4.1 Die Polymerase Kettenreaktion

Die PCR, entwickelt von Mullis *et al.* (1986) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Dies war ein Meilenstein in der Molekularbiologie, erstmals konnten Nukleinsäuren spezifisch vermehrt werden und somit für Genetik, Forensik und Diagnostik verwendet werden (Gaňová *et al.* 2021). Das Prinzip der PCR beruht auf einem Konzept von zwei ca. 20 bp großen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, welche einen bestimmten Sequenzbereich flankieren. Sie binden spezifisch an ein komplementäres DNA-Fragment binden und werden dann von einer Polymerase verlängert. Das sogenannte Primerpaar, besteht aus forward (komplementär zu einer Sequenz auf dem Sense-Strang) und reverse (komplementär zu einer Sequenz auf dem Antisense-Strang) Primer (Mülhardt 2009). Der grundlegende Reaktionsmechanismus der PCR besteht

aus 3 Zyklen; der 1) DNA-Denaturierung, der 2) Primerhybridisierung und der 3) Elongation. Im ersten Schritt werden mittels hoher Temperatur ($\approx 95^\circ\text{C}$) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgeschmolzen und damit die DNA denaturiert. Bei dem Hybridisations-Schritt ($55 - 65^\circ\text{C}$) kommt es zum sogenannten *annealing*, d.h. der Anlagerung der Primer an die DNA (Sreejith *et al.* 2018). Im nachfolgenden Amplifikationsschritt ($\approx 72^\circ\text{C}$) bindet die thermostabile Taq-Polymerase (Taq, abgeleitet von *Thermus aquaticus*) an das 3'-OH Ende des gebundenen Primers und erweitert den Primer anhand der komplementären DNA und verdoppelt diese (Clark & Pazdernik 2009). Somit ist ein Zyklus abgeschlossen und ein neuer beginnt mit einer erneuten DNA-Denaturierung. Für eine erfolgreiche Amplifikation werden bis zu 45 Zyklen hintereinander durchgeführt, wodurch die DNA jedes Mal verdoppelt/exponentiell vermehrt wird (Sreejith *et al.* 2018). Die amplifizierte DNA am Ende der PCR kann klassischerweise mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Wood *et al.* 1994).

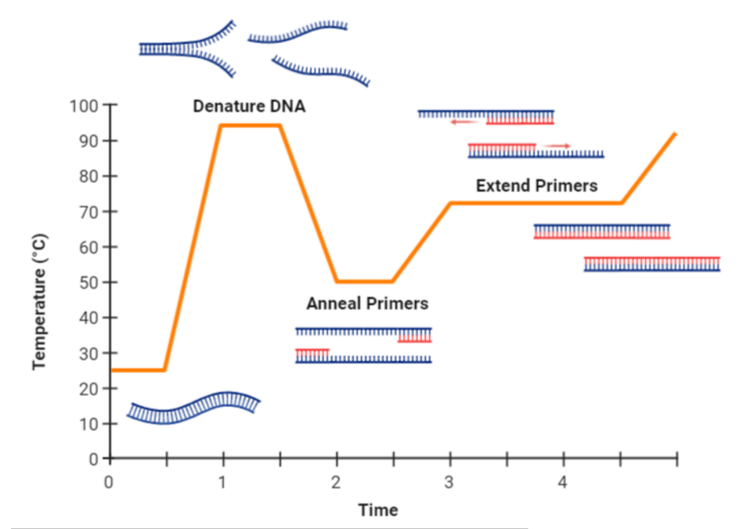


Abbildung 3: **Reaktionsmechanismus der 3-Stufen PCR:** Die PCR ist schematisch mit angefügter Temperaturkurve dargestellt, bestehend aus den 3 Schritten: 1) DNA-Denaturierung, 2) Primerhybridisierung und 3) Elongation. Die doppelsträngige DNA (blau) wird bei $\approx 95^\circ\text{C}$ denaturiert, und es können Primer (rot) bei 50°C an die einzelsträngige DNA binden. Diese werden mittels der Taq-Polymerase bei 72°C erweitert (rote Pfeile), bis zwei doppelsträngige DNA-Moleküle vorliegen. Bild modifiziert nach Tiago Lopes (2020)

Da die bei der Standard PCR verwendeten Taq-Polymerase keine RNA als Ausgangsmaterial erkennt, wird eine zusätzliche reverse Transkriptase (RT)-Reaktion der PCR benötigt. Bei der RT kommt es zur Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (engl.: *complementary DNA*, cDNA), welche anschließend über den beschriebenen PCR-Mechanismus amplifiziert werden kann (ODriscoll *et al.* 1993; Mülhardt 2009). Diese Erweiterung der PCR wird als reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) bezeichnet (Bustin *et al.* 2005).

Eine weiterer Fortschritt der PCR ist die quantitative PCR (qPCR). Hierbei wird dem PCR-Reaktionsmix ein fluoreszierendes Reportermolekül, wie beispielsweise ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, oder fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide zugesetzt (Ma *et al.* 2021). Goldstandard der qPCR sind die fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die sogenannten Sonden, welche spezifisch innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs hybridisieren (Ranasinghe & Brown 2005). Das Prinzip der Fluoreszenzsonden beruht dabei auf der Interaktion eines Fluorophors (Reportermolekül) mit einem sogenannten Quencher, welcher sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befindet. Der Quencher ist ein weiteres fluoreszierendes Molekül, welches von

die Emissionenergie (Fluoreszenz) des Reportermoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) aufnimmt und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann (Ranasinghe & Brown 2005). Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die hybridisierte Sonde innerhalb der Elongation hydrolysiert, wodurch Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt werden (Thornton & Basu 2011). Der FRET zwischen Fluorophor und Quencher wird aufgehoben und das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Mit dem freiwerdenden Fluoreszenzsignal kann ein bestimmtes Verhältnis zur amplifizierten DNA quantitativ abgeleitet werden, so dass eine Echtzeit-Verfolgung der Nukleinsäureamplifikation ermöglicht wird. Durch die Einführung eines Fluoreszenzemissions-Schwellenwertes, dem sogenannten *ct*-Wert (engl.: *cycle threshold*), welcher an einem Zeitpunkt von dem Fluoreszenzsignal überschritten wird, lässt sich ein bestimmter DNA-Gehalt der Reaktion mit der Reaktionszeit verknüpfen (Bustin 2000; Lovatt 2002).

1.4.2 Isotherme Amplifikation

Isotherme Amplifikationstechniken (IA) können Nukleinsäuren bei einer gleichbleibenden Temperatur amplifizieren (Kang *et al.* 2022). Sie bieten eine vereinfachte Handhabung wodurch weniger qualifiziertes Personal zur Durchführung benötigt wird. Durch die gleichbleibende Temperatur besitzen sie geringere Anforderungen an Gerätschaften, wodurch preisintensive Thermocycler, welche für die PCR verwendet werden, nicht benötigt (Behrmann *et al.* 2020; Boonbanjong *et al.* 2022). Dadurch bieten sie eine Alternative zur PCR für die POCT und können dezentral für die Diagnostik eingesetzt werden (Zhao *et al.* 2015). Ab den 1990er Jahren wurden viele isotherme Methoden entwickelt, die unterschiedliche Aspekte kombinieren und somit ein Repertoire für verschiedenste Applikationen bilden (Zhao *et al.* 2015). So kann die Influenza Diagnostik mit IA bereits ergänzt werden (Vemula *et al.* 2016). Besonders hervorzuheben unter den IA ist die RPA (engl.: *recombinase polymerase amplification*). Sie verbindet die Vorteile der positiven Effekte und bietet eine robuste, simple und effektive Plattform für die POCT (Li *et al.* 2019; Glöckler *et al.* 2021). Ausgewählte isotherme Goldstandard Methoden wie die LAMP, NASBA sowie die RPA werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation - LAMP

Die erstmalig im Jahr 2000 von Notomi (2000) entwickelte schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (engl.: *loop mediated isothermal amplification*, LAMP) ist die bekannteste isotherme Amplifikationsmethode. Die LAMP amplifiziert DNA bei einer konstanten Temperatur von 60 - 65 °C. Anders als z.B. bei der PCR werden bei der LAMP vier bis sechs Primer verwendet, wodurch sie zwar einerseits sehr hohe Spezifitäten erreicht, andererseits aber dadurch hohe Anforderungen an das Primer-Design sowie deren Optimierung bestehen (Soroka *et al.* 2021). Die LAMP-Primer werden in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer unterteilt. (Nagamine *et al.* 2002). Die Primerpaare binden jeweils an unterschiedlichen Regionen der Ziel-DNA (siehe Abbildung 4) und erfüllen verschiedene Aufgaben (Huang *et al.* 2020). Die DNA-Amplifikation der LAMP ist enzymatisch mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase realisiert, welche im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase mit ihrer Exonukleaseaktivität eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt (Thornton & Basu 2011; Park 2022).

Der Reaktionsmechanismus der LAMP kann grundsätzlich in zwei Phasen unterteilt werden; der nicht zyklischen Phase und der zyklischen Phase. Im ersten Schritt der nicht zyklischen Phase hybridisiert einer der inneren Primer mit seinem 3'-Ende an die zu amplifizierende DNA (siehe Abbildung 4). Dadurch kann eine Strangverlängerung des Primers durch die Polymerase stattfinden und mithilfe der Strangverdrängungsaktivität wird der ursprüngliche Doppelstrang abgelöst. Anschließend bindet der äußere Primer und es findet

abermals eine Strangverlängerung statt bei der der innere Primer mit der neu synthetisierten DNA verdrängt wird. Der entstandene DNA-Einzelstrang besitzt an einem Ende die Sequenz des inneren Primers, und bildet durch den hinteren komplementären Teil des Primers eine Schleife (engl.: *loop*) aus. Der eben beschriebene Amplifikationsschritt findet auch mit den entgegengesetzten inneren und äußeren Primern statt, welche die oben erwähnte Form einer Hantel besitzt (siehe Abbildung 4(Parida *et al.* 2008)).

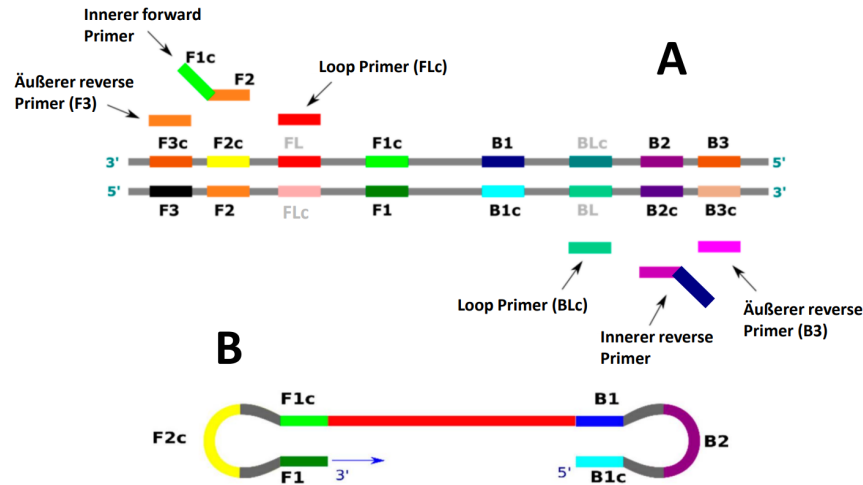


Abbildung 4: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP:** **A:** Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußeren Primer liegen “hinter” den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung 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 *et al.* (2021)

Die gebildete Hantelstruktur dient in der zweiten Phase der Amplifikation, der zyklischen Phase als Startpunkt. Hier können die verschiedenen Primer gleichzeitig binden und somit die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigen. Ebenfalls dient das 3'-Ende der Hantelstruktur als weiterer Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf der Reaktion entstehen verschiedenste Strukturen wie Konkatemere und blumenkohlähnliche Strukturen mit weiteren Schleifen (Silva *et al.* 2019; Soroka *et al.* 2021). Durch das zusätzliche Einbringen der Loop Primer, kann die Anzahl der Startpunkte abermals erhöht werden, was zu einer erhöhten Amplifikationsgeschwindigkeit führt (Nagamine *et al.* 2002). Die LAMP zeichnet sich durch hohe DNA-Endkonzentration von 10 - 20 µg am Ende der Reaktion aus, wodurch eine Auswertungen mit dem bloßen Auge über bestimmte Methoden erfolgen kann (Parida *et al.* 2008). So kann die Quantifizierung der Amplifikation einerseits über kolorimetrische Fluoreszenzfarbstoffe wie Calcein (Tomita *et al.* 2008) oder andererseits über Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I (Iwamoto *et al.* 2003) realisiert werden. Ebenfalls kann die Messung der Trübung für den Nachweis einer positiven Reaktion verwendet werden. Während der Amplifikation entstehen große Mengen an Pyrophosphat, welches Magnesium-Ionen bindet und bei hohen Konzentrationen ausfällt, was einer sichtbaren Trübung der Reaktionsmischung führt (Mori *et al.* 2001).

1.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation - NASBA

Die Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA), ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode zum Nachweis von RNA Aus-

gangsmaterial (engl.: *template*) (Compton 1991; Deiman *et al.* 2002). Im Gegensatz zur PCR benötigt die NASBA keinen vorhergehenden RT-Schritt und ist damit ideal zur Detektion von Influenza Viren, welche RNA Genome aufweisen (Compton 1991; Moore *et al.* 2004; Bachman 2013). Die erstmals von Guatelli *et al.* (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzym Mix bestehend aus einer RT des Alpharetrovirus, der RNase H und der T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (engl.: *DNA dependent RNA polymerase*, DdRp) (Deiman *et al.* 2002). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer DNA-Primer an das 3'-Ende der einzelsträngigen RNA. Dabei hybridisieren nur 20 bp am 3'-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5-Ende besitzt hingegen eine DdRp Promotor Sequenz. Der hybridisierte DNA-primer wird von der im Reaktionsmix enthaltenen RT verlängert (41 °C) und es entsteht ein cDNA/RNA-Hybrid. Der RNA-Anteil wird anschließend von der RNase H verdaut, sodass der einzelsträngige cDNA-Anteil mit der Promotorsequenz erhalten bleibt. Ein zweiter 20 bp langer Primer (komplementär zur cDNA) hybridisiert und vervollständigt mittels RT den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche viele RNA-Kopien des DNA-Templates erzeugt (siehe Abbildung 5). Die neu entstandenen RNA-Moleküle reihen sich in diesen Zyklus ein und es kommt zur exponentiellen Amplifikation (Compton 1991).

Zur Echtzeitdetektion und Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle hybridisations-Sonden sogenannte "*Molecular Beacon*" verwendet werden (Deiman *et al.* 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 (siehe Abbildung 5). 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).

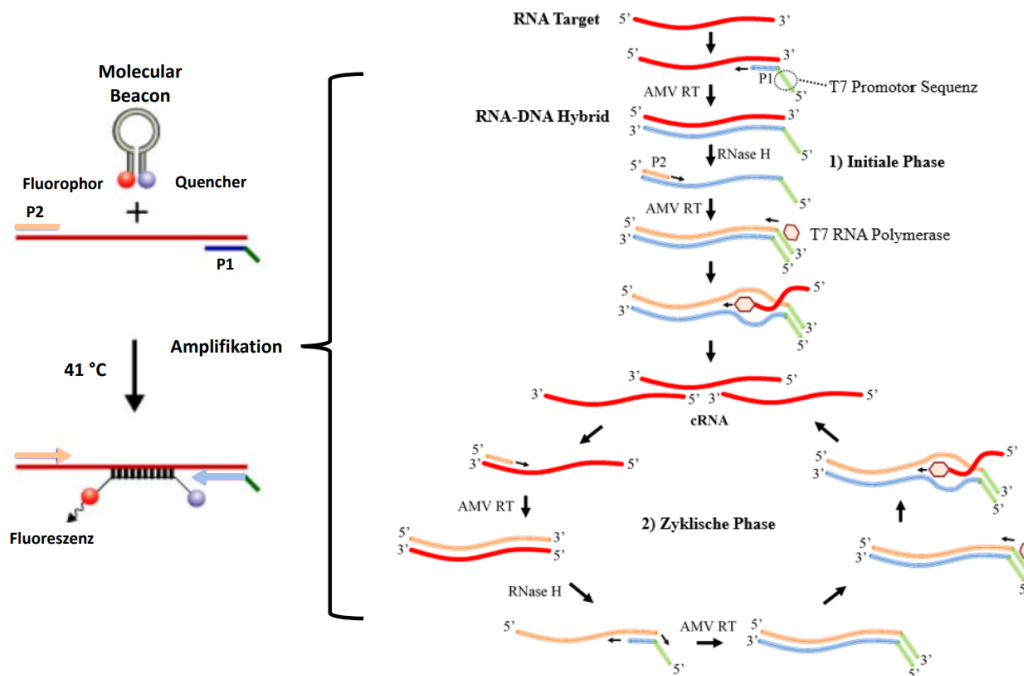


Abbildung 5: **Schematischer Reaktionsmechanismus und Detektion der Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (NASBA)** : Die NASBA lässt sich einteilen in die 1) initiale Phase und die 2) zyklische Phase. Die Template-RNA (rot) bildet durch die Hybridisation von Primer P1 ein cDNA/RNA Hybrid, welches über einen RNase-Verdau und erneute DNA Synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt wird. Durch den auf dem Doppelstrang aktiven Promotor (grün) werden viele RNA-Kopien erzeugt, welche in den Amplifikationszyklus eingehen. In diesem entsteht abermals ein DNA/RNA Hybrid, welches durch RNase-Verdau und DNA Synthese in einen DNA-Doppelstrang mit aktiven Promotor überführt wird. Die Detektion erfolgt über “Molecular Beacon”, welche mit der komplementären Sequenz im inneren der Schleife an die Ziel-RNA hybridisieren. Dadurch werden Quencher (grau) und Fluorophor (rot) voneinander getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Bild Modifiziert nach Zhong & Zhao (2018) und PREMIER (2023).

1.4.5 Rekombinase Polymerase Amplifikation - RPA

Die von (Piepenburg *et al.* 2006) entwickelte Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) ist ein von dem Replikationszyklus der T4 Bakteriophage angepasstes isothermes Amplifikationssystem (Li *et al.* 2019). Der Mechanismus der Vervielfältigung der DNA beruht dabei auf einem koordinierten Zusammenspiel der Rekombinase und dem Rekombinase loading factor der T4 Bakteriophage, den single-stranded binding proteinen (SSB) und der Sau DNA-Polymerase (abgeleitet von *Staphylococcus aureus*) (Li *et al.* 2019). Im ersten Schritt bindet die T4 UvsX Rekombinase mithilfe des T4 UvsX Rekombinase Co-Enzyms unter ATP-Verbrauch an einzelsträngige DNA-Primer (Daher *et al.* 2016; Lobato & OSullivan 2018). Der entstandene Rekombinase-Primer-Komplex migriert entlang doppelsträngiger DNA und sucht die zu den gebundenen Primern homologen Sequenzen. Wird ein homologer Bereich gefunden, verdrängt der Komplex den Doppelstrang und bindet mithilfe des Primers unter Bildung einer D-Schleife an den komplementären DNA-Einzelstrang. Der Rekombinase-Komplex dissoziiert nach erfolgreicher Primerbindung unter ATP Verbrauch und kann wieder an neue Primer binden. Eine Rehybridisierung und die damit einhergehende Verdrängung des gebundenen Primers durch den abgespaltenen DNA-Einzelstrang wird durch die Anlagerung von SSB's an den Einzelstrang verhindert (Babu *et al.* 2018). Anschließend bindet die Sau DNA-Polymerase an das freie 3'-OH Ende des

hybridisierten Primern und verlängert diesen komplementär zur DNA. Sie besitzt eine Strangverdrängungsaktivität, wodurch der DNA-Doppelstrang weiter aufgebrochen wird und somit die Verlängerung des Primers fortgesetzt wird. Dies führt zu zwei neu synthetisierten doppelsträngigen DNA-Molekülen, welche erneut in die oben beschriebene Reaktion eingehen und so zur exponentiellen Amplifikation führen (Babu *et al.* 2018; Tan *et al.* 2022).

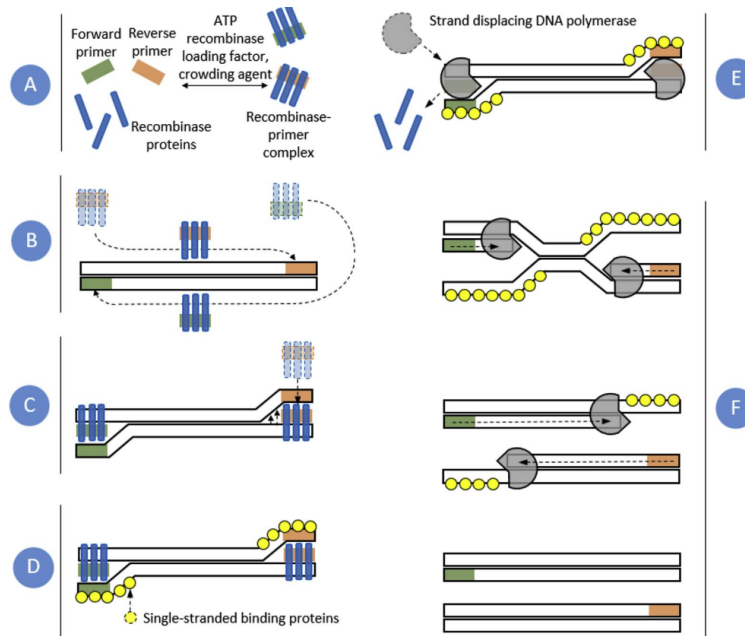


Abbildung 6: **Schematischer Reaktionsmechanismus der RPA:** Im ersten Reaktionsschritt der RPA bildet sich der Rekombinase-Primer-Komplex (A), welcher entlang der doppelsträngigen DNA migriert (B). Wird eine zu den Primern homologe Sequenz gefunden, wird der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz gebunden (C) und die SSB stabilisieren die verdängte einzelsträngige DNA (D). Die Polymerase bindet an die Primer (E) und verlängert diese (F). Bild modifiziert nach Lobato & OSullivan (2018).

Um die Dissoziation des Rekombinase-Primer-Komplexes zu unterbinden und die Amplifikation zu beschleunigen wird Polyethylen Glucol (PEG) als sogenanntes “crowding-agent” verwendet (Lillis *et al.* 2016; Lobato & OSullivan 2018). Dieses trägt zu einer Viskosität der Reaktionslösung bei und erschwert so die Diffusion. Zusammen mit den niedrigen Reaktionstemperaturen von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ und der dadurch geringen thermischen Konvektion kann es zur lokalen Reagenzien-Knappheit kommen, wodurch eine Minderung der Amplifikationsrate entsteht. Vor allem bei niedrigen DNA-Konzentrationen kann deshalb ein zusätzlicher Mischschritt während der laufenden RPA-Reaktion erforderlich sein (Lillis *et al.* 2016). Ebenfalls kann, ähnlich wie bei der RT-PCR, die RPA mit einer RT-Reaktion kombiniert werden, um RNA als template zu verwenden (Yoo *et al.* 2021).

Ein wichtiger Punkt der RPA ist das spezielle Primerdesign. Im Gegensatz zur PCR werden hier längere Oligonukleotide (zwischen 30 - 35 bp) verwendet, die einen Amplifikationsbereich von wenigen 100 bp flankieren (Li *et al.* 2019). Für das Design der RPA-Primer ist ein automatisiertes Programm beschrieben (Higgins *et al.* 2018). Innerhalb des Primerdesigns konnte gezeigt werden, dass bis zu drei Nukleotid-Fehlpaarungen pro Primer, die RPA nicht beeinflussen (Boyle *et al.* 2013). Jedoch konnte von Higgins *et al.* (2022) gezeigt werden, dass Art und Lage der Fehlpaarung größeren Einfluss als die Anzahl auf die RPA besitzen (Higgins *et al.* 2022).

Die Detektion der RPA kann einerseits nach vollendeter Reaktion über eine Agarose-Gelelektrophorese oder andererseits “*real time*” während der Reaktion durch die Zugabe von Sonden erfolgen. Man unterscheidet für die RPA verschiedene Sondentypen wie die Exonuklease (exo)-Sonde oder die Formamidopyrimidin DNA glykosylase (fpg)-Sonde (Powell *et al.* 2018; Babu *et al.* 2018). Das Prinzip der Sonden beruht ähnlich wie der PCR auf dem FRET-Prinzip zwischen einem Fluorophor und einem Quencher (Ranasinghe & Brown 2005; Lobato & OSullivan 2018). Bei der ca. 50 bp großen Exo-Sonde findet im Gegensatz zur PCR keine vollständige Hydrolyse, sondern die zielgerichtete Spaltung der Sonde an einer a-basischen Seite durch die Exonuklease III statt. Die a-basische Seite ist dabei so angeordnet, dass sie zwischen Fluorophor und Quencher liegt und diese beiden durch die Spaltung räumlich getrennt werden (Thornton & Basu 2011; Lobato & OSullivan 2018). Um zu vermeiden, dass die Sonde als Primer fungiert wird das 3'-Ende blockiert, jedoch erzeugt die Spaltung der Exonuklease ein weiteres unblockiertes 3'-Ende, welches als Primer in die Amplifikation eingeht (Daher *et al.* 2016). Die fpg-Sonde ist mit ca. 35 bp kleiner als die exo-Sonde funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Hier ist das Fluorophor direkt an das a-basische Nukleotid gekoppelt. Die Spaltung wird durch eine 8-oxoguanine DNA glykosylase katalysiert, wodurch das Fluorophor von der Sonde abgespalten wird und kein neues 3'-Ende entsteht. Jedoch wurden bei fpg-Sonden basierten RPA's geringere Sensitivitäten als bei dem Exo-Sonden Konterpart beobachtet (Daher *et al.* 2016).

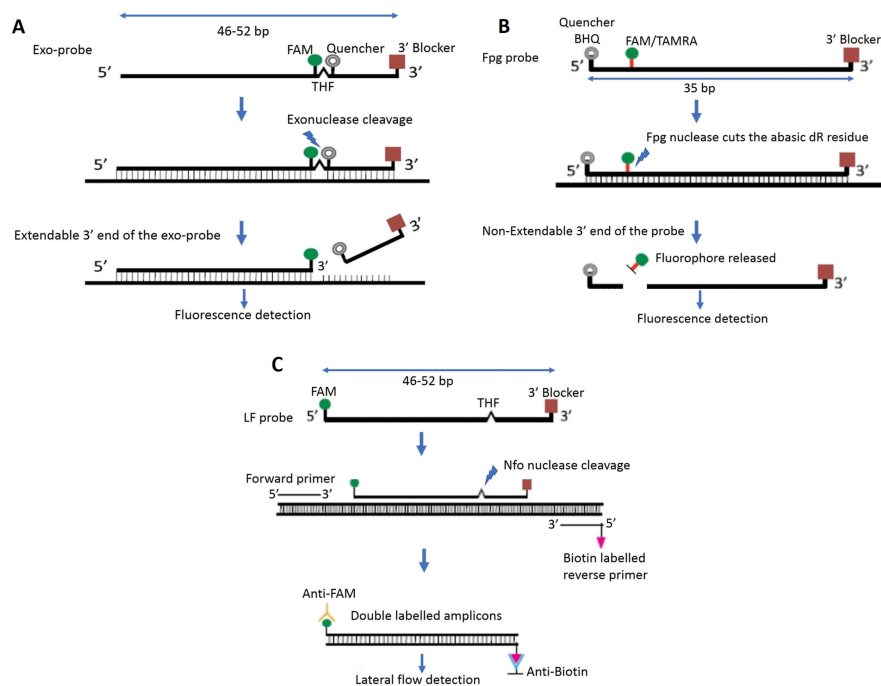


Abbildung 7: **Vergleichende Darstellung der RPA-Sondentypen:** Die quantitative Detektion der RPA kann über A) exo-Sonden oder B) fpg-Sonden erreicht werden sowie die Detektion über lateral flow mittels C) nfo-Sonde. **A,B:** Über eine enzymatische Aktivität wird die a-basische Seite gespalten, somit Fluorophor und Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. **C** Durch Spaltung der Sonde entstehen mit FAM und Biotin markierte Amplifikate, welche über Avidin gebunden werden und über Antikörper nachgewiesen werden.

Eine weitere Applikation der RPA ist die solid phase RPA, bei welcher einer der beiden Primer auf einer Oberfläche immobilisiert wird. Diese Applikation erlaubt ein besseres Multiplexing, da die verschiedenen Reaktionen räumlich getrennt voneinander ablaufen können (Rio *et al.* 2014). Die Detektion kann hier-

bei Elektrochemisch (Río *et al.* 2016), Kolorimetrisch (Yamanaka *et al.* 2017) oder markierungsfrei über Ring-Resonatoren (Shin *et al.* 2013) erfolgen. Ebenfalls ist es möglich RPA mithilfe von lateral flow Plattformen zu kombinieren, um mit dem bloßen Auge auswertbare Tests zu entwickeln (Lobato & OSullivan 2018; Heeroma & Gwenin 2020). Hierbei wird eine neue Sonde die Endonuklease IV (nfo)-Sonde verwendet, welche eine a-basische Seite besitzt und am 5'-Ende mit einem FAM-Fluorophor markiert ist. Zusammen mit Biotin markierten reverse Primern entstehen doppelt markierte Amplifikate (FAM und Biotin), welche über die Biotin-Streptavidin Interaktion an die lateral flow Oberfläche gebunden werden und über Anti-FAM Antikörper nachgewiesen werden (Daher *et al.* 2016).

1.5 Ziel der Arbeit

Ein aktuelles BMBF-Projekt befasst mit Point of Care Diagnostik von respiratorischen Viren. Für die vor Ort Analytik sollen verschiedene Systeme in ein mobiles Kofferlabors-System implementiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, jeweils ein Rekombinase Polymerase Amplifikations Assay zum Nachweis der Influenza Viren A und B zu entwickeln. Die Assays sollen für Influenza A die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nachweisen können sowie für Influenza B als Pan-Influenza B alle Influenza B Viruslinien detektieren. Dafür sollten Primer-Sonden-Sets designen und diese in einem Screening getestet werden. Die Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Systeme sollte mittels in vitro generierter artifizierlicher RNA Standards auf Eignung geprüft werden und hinsichtlich der selben Parameter direkt mit dem Goldstandard (PCR-Systemen) verglichen werden. Im Detail sollen Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt für die RPA Assays optimiert werden. Hinsichtlich der Variation der eingesetzten Oligonukleotid-Konzentration ist der Einfluss einer Primer-Asymmetrie zu analysieren. Zusätzlich sollen Auswirkungen unterschiedlicher Sondenmodifikation charakterisiert werden. Abschließend sollte die Eignung der RT-RPAs in einem simulierten klinischen Probenhintergrund getestet werden.

- Arranz R., Coloma R., Chichón F.J., Conesa J.J., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M., Ortín J. & Martín-Benito J. 2012. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* 338 (6114): 1634–1637. <https://doi.org/10.1126/science.1228172>
- Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T., Kevadiya B. & Thakor A. 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology* 9 (8): 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>
- Axelsen J.B., Yaari R., Grenfell B.T. & Stone L. 2014. Multiannual forecasting of seasonal influenza dynamics reveals climatic and evolutionary drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (26): 9538–9542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321656111>
- Babu B., Ochoa-Corona F.M. & Paret M.L. 2018. Recombinase polymerase amplification applied to plant virus detection and potential implications. *Analytical Biochemistry* 546: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>
- Bachman J. 2013. [Reverse-transcription PCR \(RT-PCR\)](#). In: *Laboratory methods in enzymology: RNA*: 67–74. Elsevier.
- Bai C., Zhong Q. & Gao G.F. 2021. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China Life Sciences* 65 (2): 280–294. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>
- Behrmann O., Bachmann I., Hufert F. & Dame G. 2020. Schnelldiagnostik von SARS-CoV-2 mit recombinase polymerase amplification. *BIOspektrum* 26 (6): 624–627. <https://doi.org/10.1007/s12268-020-1458-3>
- Boonbanjong P., Treeratrakoon K., Waiwinya W., Pitikultham P. & Japrun D. 2022. Isothermal amplification technology for disease diagnosis. *Biosensors* 12 (9): 677. <https://doi.org/10.3390/bios12090677>
- Boyle D.S., Lehman D.A., Lillis L., Peterson D., Singhal M., Armes N., Parker M., Piepenburg O. & Overbaugh J. 2013. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>
- Brendish N.J., Schiff H.F. & Clark T.W. 2015. Point-of-care testing for respiratory viruses in adults: The current landscape and future potential. *Journal of Infection* 71 (5): 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008>
- Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T. & Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3): 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Charrel R.N., Lamballerie X. de & Raoult D. 2007. Chikungunya outbreaks — the globalization of vectorborne diseases. *New England Journal of Medicine* 356 (8): 769–771. <https://doi.org/10.1056/nejmp078013>
- Chen R. & Holmes E.C. 2008. The evolutionary dynamics of human influenza b virus. *Journal of Molecular Evolution* 66 (6): 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>
- Chen X., Liu S., Goraya M.U., Maarouf M., Huang S. & Chen J.-L. 2018. Host immune response to influenza a virus infection. *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>

- Chlanda P. & Zimmerberg J. 2016. Protein-lipid interactions critical to replication of the influenza A virus. *FEBS Letters* 590 (13): 1940–1954. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118>
- Chow E.J., Doyle J.D. & Uyeki T.M. 2019. Influenza virus-related critical illness: Prevention, diagnosis, treatment. *Critical Care* 23 (1). <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2491-9>
- Clark D.P. & Pazdernik N.J. 2009. *Molekulare biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Compton J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350 (6313): 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>
- Cosar B., Karagulleoglu Z.Y., Unal S., Ince A.T., Uncuoglu D.B., Tuncer G., Kilinc B.R., Ozkan Y.E., Ozkoc H.C., Demir I.N., Eker A., Karagoz F., Simsek S.Y., Yasar B., Pala M., Demir A., Atak I.N., Mendi A.H., Bengi V.U., Seval G.C., Altuntas E.G., Kilic P. & Demir-Dora D. 2022. SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 63: 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001>
- Daher R.K., Stewart G., Boissinot M. & Bergeron M.G. 2016. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clinical Chemistry* 62 (7): 947–958. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>
- Deiman B., Aarle P. van & Sillekens P. 2002. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology* 20 (2): 163–180. <https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163>
- Dharmapalan D. 2020. Influenza. *The Indian Journal of Pediatrics* 87 (10): 828–832. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1>
- Firth A.E. & Brierley I. 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 E., Chiapponi C., Baioni L., Zanni I., Merenda M., Rosignoli C., Kyriakis C.S., Luini M.V., Mandola M.L., Bolzoni L., Nigrelli A.D. & Faccini S. 2017. Influenza 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>
- Gañová M., Zhang H., Zhu H., Korabečná M. & Neuzil P. 2021. Multiplexed digital polymerase chain reaction as a powerful diagnostic tool. *Biosensors and Bioelectronics* 181: 113155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155>
- Glökler J., Lim T.S., Ida J. & Frohme M. 2021. Isothermal amplifications – a comprehensive review on current methods. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 56 (6): 543–586. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1937927>
- Goble J.A. & Rocafort P.T. 2016. Point-of-care testing. *Journal of Pharmacy Practice* 30 (2): 229–237. <https://doi.org/10.1177/0897190015587696>
- Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwok D.Y., Barringer K.J., Richman D.D. & Gingeras T.R. 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): 1874–1878. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>
- Hampson A.W. & Mackenzie J.S. 2006. The influenza viruses. *Medical Journal of Australia* 185 (S10). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00705.x>

- Hatta M., Goto H. & Kawaoka Y. 2004. Influenza b virus requires BM2 protein for replication. *Journal of Virology* 78 (11): 5576–5583. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5576-5583.2004>
- Hause B.M., Ducatez M., Collin E.A., Ran Z., Liu R., Sheng Z., Armien A., Kaplan B., Chakravarty S., Hoppe A.D., Webby R.J., Simonson R.R. & Li F. 2013. Isolation of a novel swine influenza virus from oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza c viruses. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>
- Heeroma A.J. & Gwenin C. 2020. Development of solid-phase RPA on a lateral flow device for the detection of pathogens related to sepsis. *Sensors* 20 (15): 4182. <https://doi.org/10.3390/s20154182>
- Higgins M., Ravenhall M., Ward D., Phelan J., Ibrahim A., Forrest M.S., Clark T.G. & Campino S. 2018. PrimedRPA: Primer design for recombinase polymerase amplification assays. *Bioinformatics* 35 (4): 682–684. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>
- Higgins M., Stringer O.W., Ward D., Andrews J.M., Forrest M.S., Campino S. & Clark T.G. 2022. Characterizing the impact of primer-template mismatches on recombinase polymerase amplification. *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–1216. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005>
- Huang T., Li L., Liu X., Chen Q., Fang X., Kong J., Draz M.S. & Cao H. 2020. Loop-mediated isothermal amplification technique: Principle, development and wide application in food safety. *Analytical Methods* 12 (46): 5551–5561. <https://doi.org/10.1039/d0ay01768j>
- Islam M.M. & Koirala D. 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: 339338. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338>
- Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., Wu P., Kyncl J., Ang L.W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., Asten L. van, Silva S.P. da, Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M.-A., Bresee J.S., Azziz-Baumgartner E., Cheng P.-Y., Dawood F., Foppa I., Olsen S., Haber M., Jeffers C., MacIntyre C.R., Newall A.T., Wood J.G., Kundi M., Popow-Kraupp T., Ahmed M., Rahman M., Marinho F., Proschle C.V.S., Mallegas N.V., Luzhao F., Sa L., Barbosa-Ramírez J., Sanchez D.M., Gomez L.A., Vargas X.B., Acosta Herrera aBetsy, Llanés M.J., Fischer T.K., Krause T.G., Mølbak K., Nielsen J., Trebbien R., Bruno A., Ojeda J., Ramos H., Heiden M. an der, Carmen Castillo Signor L. del, Serrano C.E., Bhardwaj R., Chadha M., Narayan V., Kosen S., Bromberg M., Glatman-Freedman A., Kaufman Z., Arima Y., Oishi K., Chaves S., Nyawanda B., Al-Jarallah R.A., Kuri-Morales P.A., Matus C.R., Corona M.E.J., Burmaa A., Darmaa O., Obtel M., Cherkaoui I., Wijngaard C.C. van den, Hoek W. van der, Baker M., Bandaranayake D., Bissielo A., Huang S., Lopez L., Newbern C., Flem E., Grøneng G.M., Hauge S., Cosío F.G. de, Moltó Y. de, Castillo L.M., Cabello M.A., Horoch M. von, Osis J.M., Machado A., Nunes B., Rodrigues A.P., Rodrigues E., Calomfirescu C., Lupulescu E., Popescu R., Popovici O., Bogdanovic D., Kostic M., Lazarevic K., Milosevic Z., Todorovic B., Chen M., Cutter J., Lee V., Lin R., Ma S., Cohen A.L., Treurnicht F., Kim W.J., Delgado-Sanz C., Ontañón S. de mateo, Larrauri A., León I.L., Vallejo F., Born R., Junker C., Koch D., Chuang J.-H., Huang W.-T., Kuo H.-W., Tsai Y.-C., Bundhamcharoen K., Chittaganpitch M., Green H.K., Pebody R., Goñi N., Chiparelli H., Brammer L. & Mustaquim D. 2018. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: A modelling study. *The Lancet* 391 (10127): 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2)

- Iwamoto T., Sonobe T. & Hayashi K. 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): 2616–2622. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>
- Jagger B.W., Wise H.M., Kash J.C., Walters K.-A., Wills N.M., Xiao Y.-L., Dunfee R.L., Schwartzman L.M., Ozinsky A., Bell G.L., Dalton R.M., Lo A., Efstathiou S., Atkins J.F., Firth A.E., Taubenberger J.K. & Digard P. 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 M., Barary M., Ghebrehewet S., Koppolu V., Vasigala V. & Ebrahimpour S. 2021. A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology* 93 (8): 4638–4646. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>
- Kang T., Lu J., Yu T., Long Y. & Liu G. 2022. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID-19 point-of-care diagnostics as an example. *Biosensors and Bioelectronics* 206: 114109. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109>
- Kim D.-K. & Poudel B. 2013. Tools to detect influenza virus. *Yonsei Medical Journal* 54 (3): 560. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.3.560>
- Kim H., Webster R.G. & Webby R.J. 2018. Influenza virus: Dealing with a drifting and shifting pathogen. *Viral Immunology* 31 (2): 174–183. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>
- Kordyukova L.V., Shtykova E.V., Baratova L.A., Svergun D.I. & Batishchev O.V. 2018. Matrix proteins of enveloped viruses: A case study of influenza A virus M1 protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (3): 671–690. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089>
- Koutsakos M., Nguyen T.H., Barclay W.S. & Kedzierska K. 2016. Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiology* 11 (1): 119–135. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>
- Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G. & García-Sastre A. 2018. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Li J., Macdonald J. & Stetten F. von 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 L., Siverson J., Lee A., Cantera J., Parker M., Piepenburg O., Lehman D.A. & Boyle D.S. 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>
- Lin X., Liu X.-Y., Zhang B., Qin A.-Q., Hui K.-M., Shi K., Liu Y., Gabriel D. & Li X.J. 2022. A rapid influenza diagnostic test based on detection of viral neuraminidase activity. *Scientific Reports* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04538-4>
- Lobato I.M. & OSullivan C.K. 2018. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
- Louie R.F., Kitano T., Brock T.K., Derlet R. & Kost G.J. 2009. Point-of-care testing for pandemic influenza and biotreats. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3 (S2): S193–S202. <https://doi.org/10>

.1097/dmp.0b013e3181be6dc4

- Lovatt A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *Reviews in Molecular Biotechnology* 82 (3): 279–300. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(01\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(01)00043-5)
- Luo M. 2011. [Influenza virus entry](#). In: *Viral molecular machines*: 201–221. Springer US.
- Lyons D. & Lauring A. 2018. Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses* 10 (8): 407. <https://doi.org/10.3390/v10080407>
- Ma H., Bell K.N. & Loker R.N. 2021. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 20: 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>
- McCauley J.W. & Mahy B.W.J. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochemical Journal* 211 (2): 281–294. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>
- Modrow S., Falke D., Truyen U. & Schätzl H. 2010. *Molekulare virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moore C., Hibbitts S., Owen N., Corden S.A., Harrison G., Fox J., Gelder C. & Westmoreland D. 2004. Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza a. *Journal of Medical Virology* 74 (4): 619–628. <https://doi.org/10.1002/jmv.20221>
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N. & Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 150–154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>
- Mülhardt C. 2009. *Der experimentator: Molekularbiologie/ genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0): 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Muramoto Y., Noda T., Kawakami E., Akkina R. & Kawaoka Y. 2013. Identification of novel influenza a virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of Virology* 87 (5): 2455–2462. <https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12>
- Nagamine K., Hase T. & Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16 (3): 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H. & Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 143 (2): 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>
- Nicholson K.G., Wood J.M. & Zambon M. 2003. Influenza. *The Lancet* 362 (9397): 1733–1745. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14854-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14854-4)
- Njouom R., Monamele G.C., Ermetat B., Tchatchouang S., Moyo-Tetang S., McCauley J.W. & Daniels R.S. 2019. Detection of influenza c virus infection among hospitalized patients, cameroon. *Emerging Infectious Diseases* 25 (3): 607–609. <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>

- ODriscoll L., Daly C., Saleh M. & Clynes M. 1993. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology* 12 (1-3): 289–314. <https://doi.org/10.1007/bf00744669>
- Omran Q.Q., Fedorova O., Liu T. & Pyle A.M. 2022. A molecular beacon assay for monitoring RNA splicing. *Nucleic Acids Research* 50 (13): e74–e74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac242>
- Özay B. & McCalla S.E. 2021. A review of reaction enhancement strategies for isothermal nucleic acid amplification reactions. *Sensors and Actuators Reports* 3: 100033. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100033>
- Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L. & Morita K. 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): 407–421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Park J.-W. 2022. Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests. *Biosensors* 12 (10): 857. <https://doi.org/10.3390/bios12100857>
- Paterson R.G., Takeda M., Ohigashi Y., Pinto L.H. & Lamb R.A. 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)
- Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L. & Armes N.A. 2006. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology* 4 (7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Powell M.L., Bowler F.R., Martinez A.J., Greenwood C.J., Armes N. & Piepenburg O. 2018. New fpg probe chemistry for direct detection of recombinase polymerase amplification on lateral flow strips. *Analytical Biochemistry* 543: 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.003>
- PREMIER B. 2023. NASBA technology. online Verfügbar unter: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html.
- Pumford E.A., Lu J., Spaczai I., Prasetyo M.E., Zheng E.M., Zhang H. & Kamei D.T. 2020. Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 170: 112674. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>
- Ranasinghe R.T. & Brown T. 2005. Fluorescence based strategies for genetic analysis. *Chemical Communications* (44): 5487. <https://doi.org/10.1039/b509522k>
- Río J.S. del, Adly N.Y., Acero-Sánchez J.L., Henry O.Y.F. & OSullivan C.K. 2014. Electrochemical detection of francisella tularensis genomic DNA using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 54: 674–678. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.035>
- Río J.S. del, Svobodova M., Bustos P., Conejeros P. & O'Sullivan C.K. 2016. Electrochemical detection of piscirickettsia salmonis genomic DNA from salmon samples using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (30): 8611–8620. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9639-0>
- RKI 2019. [Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018](#). Robert-Koch-Institut.
- Sandt C.E. van de, Bodewes R., Rimmelzwaan G.F. & Vries R.D. de 2015. Influenza b viruses: Not to be

- discounted. *Future Microbiology* 10 (9): 1447–1465. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.65>
- Sanjuán R. & Domingo-Calap P. 2016. Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
- Shao W., Li X., Goraya M., Wang S. & Chen J.-L. 2017. Evolution of influenza a virus by mutation and re-assortment. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
- Sharma A., Balda S., Apreja M., Kataria K., Capalash N. & Sharma P. 2021. COVID-19 diagnosis: Current and future techniques. *International Journal of Biological Macromolecules* 193: 1835–1844. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016>
- Shin Y., Perera A.P., Kim K.W. & Park M.K. 2013. Real-time, label-free isothermal solid-phase amplification/detection (ISAD) device for rapid detection of genetic alteration in cancers. *Lab on a Chip* 13 (11): 2106. <https://doi.org/10.1039/c3lc50129a>
- Silva S.J.R. da, Pardee K. & Pena L. 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 M., Wasowicz B. & Rymaszewska A. 2021. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? *Cells* 10 (8): 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
- Sreejith K.R., Ooi C.H., Jin J., Dao D.V. & Nguyen N.-T. 2018. Digital polymerase chain reaction technology – recent advances and future perspectives. *Lab on a Chip* 18 (24): 3717–3732. <https://doi.org/10.1039/c8lc00990b>
- Świerczyńska M., Mirowska-Guzel D.M. & Pindelska E. 2022. Antiviral drugs in influenza. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (5): 3018. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053018>
- Takeuchi K. & Lamb R.A. 1994. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *Journal of Virology* 68 (2): 911–919. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.2.911-919.1994>
- Tan M., Liao C., Liang L., Yi X., Zhou Z. & Wei G. 2022. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1019071>
- Thornton B. & Basu C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145–154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Tiago Lopes J.C. Isabel Barata 2020. [Arabidopsis thaliana germination assays](#). *iGEM; Pine nemato fight*.
- To J., Surya W. & Torres J. 2016. [Targeting the channel activity of viroporins](#). In: *Advances in protein chemistry and structural biology*: 307–355. Elsevier.
- To J. & Torres J. 2019. Viroporins in the influenza virus. *Cells* 8 (7): 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>
- Tomita N., Mori Y., Kanda H. & Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3 (5): 877–882. <https://doi.org/10.1>

- Uyeki T.M., Bernstein H.H., Bradley J.S., Englund J.A., File T.M., Fry A.M., Gravenstein S., Hayden F.G., Harper S.A., Hirshon J.M., Ison M.G., Johnston B.L., Knight S.L., McGeer A., Riley L.E., Wolfe C.R., Alexander P.E. & Pavia A.T. 2018. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america: 2018 update on diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management of seasonal influenza. *Clinical Infectious Diseases* 68 (6): e1–e47. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy866>
- Valera E., Jankelow A., Lim J., Kindratenko V., Ganguli A., White K., Kumar J. & Bashir R. 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., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A. & Kiselev O.I. 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza a viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research* 185: 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>
- Velthuis A.J.W. te & Fodor E. 2016. Influenza virus RNA polymerase: Insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 479–493. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>
- Vemula S., Zhao J., Liu J., Wang X., Biswas S. & Hewlett I. 2016. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses* 8 (4): 96. <https://doi.org/10.3390/v8040096>
- Whitley R.J. 2007. The role of oseltamivir in the treatment and prevention of influenza in children. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 3 (5): 755–767. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.5.755>
- Wood G.S., Tung R.M., Heaffner A.C., Crooks C.F., Liao S., Orozco R., Veelken H., Kadin M.E., Koh H., Heald P., Barnhill R.L. & Sklar J. 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>
- Woźniak-Kosek A H.G. Kempieńska-Mirosławska B 2014. [Detection of the influenza virus yesterday and now.](#) *Acta Biochimica Polonica*. 61(3): 465–470.
- Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A. & Maquieira Ángel 2017. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection. *Microchimica Acta* 184 (5): 1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2144-0>
- Yi H., Kim Y.-H., Kim J.-S., Lee N.-J., Shin K., Choi J.-H., Kwon D., Lee J.-Y. & Kang C. 2013. Impact of influenza virus escape-mutations on influenza detection by the rapid influenza diagnostic test. *Journal of Medical Virology* 85 (4): 709–715. <https://doi.org/10.1002/jmv.23484>
- Yoo H.M., Kim I.-H. & Kim S. 2021. Nucleic acid testing of SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6150. <https://doi.org/10.3390/ijms22116150>
- Yoo S.J., Kwon T. & Lyoo Y.S. 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>
- Zaraket H., Hurt A.C., Clinch B., Barr I. & Lee N. 2021. Burden of influenza b virus infection and considerations for clinical management. *Antiviral Research* 185: 104970. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.20>

20.104970

- Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L. & Fan C. 2015. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical Reviews* 115 (22): 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
- Zhong J. & Zhao X. 2018. Isothermal amplification technologies for the detection of foodborne pathogens. *Food Analytical Methods* 11 (6): 1543–1560. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>