

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	3
1.2.2	Influenza B	5
1.3	Nachweismethoden von Influenza	7
1.4	Nukleinsäure amplifizierende Methoden - NAAT	7
1.4.1	Die Polymerase Kettenreaktion	8
1.4.2	Isotherme Amplifikation	9
1.4.3	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation	9
1.4.4	Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation	10
1.4.5	Rekombinase Polymerase Amplifikation	12
1.5	Ziel der Arbeit	13

1 Einleitung

1.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Keime sind eine ernstzunehmende Bedrohung für Menschen und staatliche Systeme. Dabei sorgen 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, Lamballerie, and Raoult 2007), und die aktuelle SARS-CoV-2 Pandemie mit weit über 140 Millionen Infizierten (Bai, Zhong, and Gao 2021) für weltweite Krisen und Milliarden Schäden (Louie et al. 2009).

Viren lassen sich näherungsweise als ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, mit einem DNA oder RNA-Genom beschreiben. Dieses ist von einer Virushülle umgeben, welche aus einer Proteinmatrix, dem sogenannten Capsid und je nach Virusart aus einer zusätzlichen Phospholipid-Doppelschicht mit eingebetteten Hüllproteinen besteht.

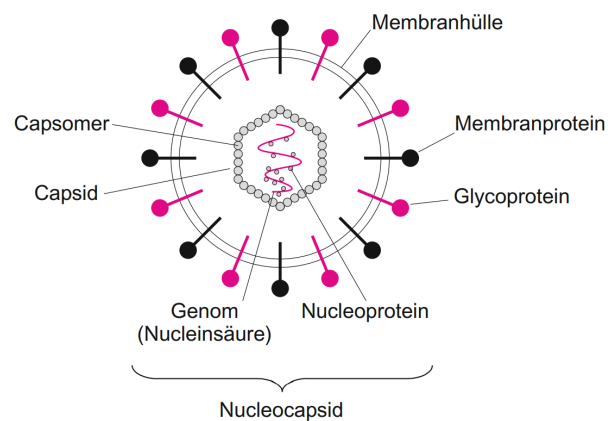


Abbildung 1: **Schematische Darstellung eines behüllten Virus** Typischer Aufbau eines behüllten Virus mit Capsid, Membranhülle und Hüllproteinen. Das Virus-Genom wird von angelagerten Nukleoproteinen stabilisiert (Modrow et al. 2010).

Da Viren keinen eigenen Reproduktionsmechanismus besitzen, sind sie auf die Infizierung von Zellen angewiesen, damit sie mittels der Reproduktions Maschinerie des Wirtes die viralen Komponenten vervielfältigen können (Modrow et al. 2010). Eine beeindruckende Fähigkeit der Viren ist die Anpassung an neue Umgebungen und Wirte. Diese hängt in von ihrer hohen genetischen Variabilität und Mutationsrate ab, welche es ihnen erlaubt eine große Vielfalt zu erschaffen (Sanjuán and Domingo-Calap 2016). Dadurch bilden einige Viren ständig neue Varianten, welche durch ihre veränderten Infektionsstrukturen Immunlücken besetzten. Dadurch entstehen neue Infektionsherde und Pandemien (quelle?) Die vorherrschende SARS-Cov-2 Pandemie hat zeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um Gesundheitssysteme zu entlasten und Infektionsketten schnell zu unterbrechen (Valera et al. 2021). Dabei ist die Polymerase Ketten Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) die vorherrschende Testmethode in der medizinischen Diagnostik, da sie durch die Amplifikation von Nukleinsäuren hohe Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht. Jedoch benötigt die PCR spezialisierte Laboratorien und geschultes Personal (Brendish, Schiff, and Clark 2015), sowie energieintensive Gerätschaften wodurch eine dezentrale Diagnostik erschwert wird (Behrmann et al. 2020). Durch Transportwege oder aufwendige Protokolle besitzt die PCR

oft eine Turnaround-Zeit von mehr als 24 Stunden (Brendish, Schiff, and Clark 2015; Augustine et al. 2020). Dadurch kann es schwierig werden, die Infektionsketten erfolgreich zu unterbrechen, da erkrankte Patienten binnen der 24h weitere Personen infizieren können (Sharma et al. 2021). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Diagnostik mit sensitiven und kostengünstigen Alternativen zu ergänzen, welche vor Ort durchgeführt werden können mit das sogenanntem *Point of care testing* (POCT) (Goble and Rocafort 2016). Für das POCT werden isotherme Nukleinsäureamplifikationstechniken zur Detektion der Erreger immer interessanter, da sie im Vergleich zur PCR keine komplexen Geräte erfordern sowie kürzere Testzeiten anbieten. Diese werden dezentral für die Diagnostik verwendet, was zu einer schnelleren Detektion vor Ort und möglicherweise zu einer Unterbrechung von Infektionsketten führen kann (Pumford et al. 2020; Islam and Koirala 2022).

1.2 Die Influenza Viren - Pandemieversacher Nr. 1

Die “echte” Grippe, verursacht durch die Influenza Viren, als bekannteste Vertreter der Orthomyxoviren, ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit mehr als 300000 Todesfällen weltweit (RKI 2019; Uyeki et al. 2022). Die Influenza Viren lassen sich, aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und ihrer serologischen Charakteristika in die Typen A, B, C und D einteilen. 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 unterteilt (Modrow et al. 2010). Von diesen können alle außer D, welcher nur Rinder und Schweine als Wirt befällt (Foni et al. 2017), Menschen infizieren und Krankheiten verursachen (Javanian et al. 2021). Typ A besitzt von den vier die höchste Virulenz (S. J. Yoo, Kwon, and Lyoo 2018) und ist für die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verantwortlich. Dieser wird abermals in viele Subtypen anhand von den Oberflächenproteinen Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterteilt, wovon die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 derzeit in der Bevölkerung kursieren (Javanian et al. 2021). Influenza Typ B infiziert ausschließlich Menschen und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Jedoch ist die Pandemiegefahr eingeschränkt, da er kein tierisches Reservoir besitzt und somit die Verbreitung gezielter begrenzt werden kann. Bei Influenza B findet keine Einteilung in Subtypen statt, jedoch sind zwei genetisch differenzierbare Viruslinien (Victoria/2/1987-like und Yamagata/16/1988-like) bekannt (Koutsakos et al. 2016). Influenza Typ C besitzt ähnlich wie Influenza B keine Pandemie-Gefahr und ruft eher milde Krankheitsverläufe hervor. Bei Infektion von Kindern wurden jedoch Infektionen der unteren Atemwege beobachtet. Neben humanen Infektionen sind auch Schweine als Wirt bekannt (Hause et al. 2013; Njouom et al. 2019).

1.2.1 Influenza A

Das Influenza A Virus Das ca. 13.5 kb große, segmentierte Genom codiert dabei für mindestens 17 Proteine, wobei die 3′ und 5′ Regionen keine codogenen Bereiche enthalten, sondern komplementär zueinander sind. Dadurch bilden sie über eine kurze Distanz einen Doppelstrang aus, welcher als Signalsequenz bei Transkription dient (Modrow et al. 2010; X. Chen et al. 2018). Von den 17 codierten Proteinen sind zehn essentiell, während der Rest als sogenannte Accessoire-Proteine bezeichnet werden (Vasin et al. 2014). Der Aufbau des Virus sowie die essentiellen Proteine sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Accessoire-Proteine sind, im Gegensatz zu den essentiellen Proteinen, auf alternativen offenen Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) codiert, welche es Viren erlauben eine größere Protein-Vielfalt auf engen 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 bei der translation eine Base überspringt und somit den Leseramen ändert, *readthrough* bei dem das Ribosom ein Stopp-codon überspringt, oder *internal Ribosom Entry* wobei das Ribosom an ein internes Start-Codon durch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird, sowie einige weitere (Firth and Brierley 2012). Die bekannten Accessoire-Proteine, wie beispielsweise die dem PA zugehörigen Proteine PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger et al. 2012; Muramoto et al. 2013) sind in Tabelle 1 angegeben.

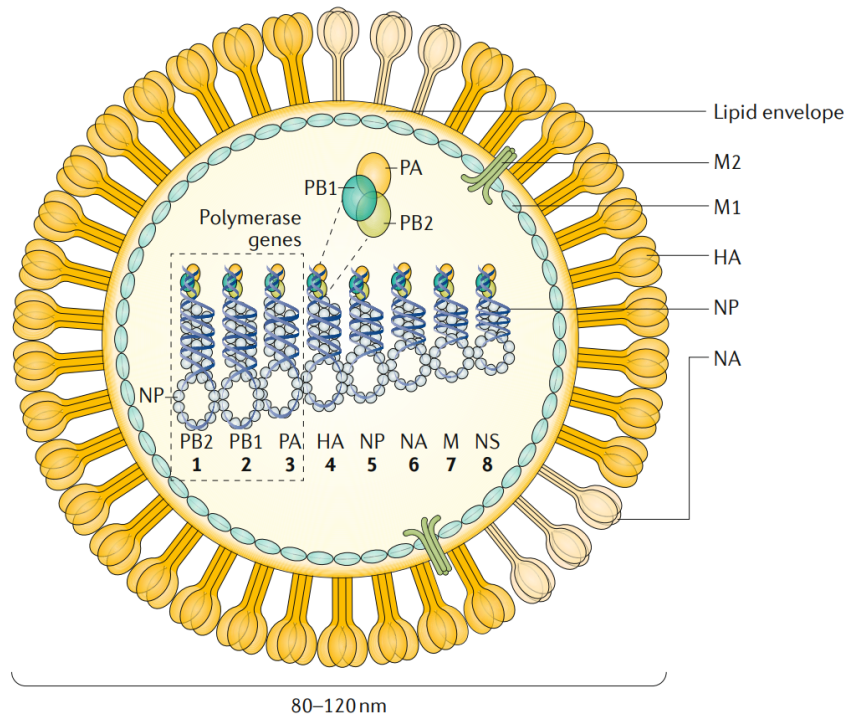


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den acht Genom-Segmenten. Das ca. 13.5 kb große, segmentierte Genom codiert dabei für 10 essentielle Proteine. Zu diesen zählen die Neuraminidase (NA), welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das Hämagglutinin (HA), welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixproteinen (M1), das Membranprotein (M2), die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, das Nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, PB1 und PB2 der RNA-Polymerase (Luo 2011; Krammer et al. 2018). Modifiziert nach Krammer et al. (2018).

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 sind (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 (Krammer et al. 2018; Velthuis and Fodor 2016). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des vRNP-Komplex zeigten eine doppel-helikale Struktur mit einer Schleife am nicht RNA-Polymerase assoziierten Ende. Die Helix-Struktur wird dabei durch eine Assoziation von unterschiedlich polaren oligo-NP-Proteinen stabilisiert (Arranz et al. 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 2 aus einer äußeren cholesterolhaltigen doppel-Lipid-Schicht, in welche die Glycoproteine NA, HA und M2 integriert

sind (To and Torres 2019; Modrow et al. 2010). Hier schon erwähnen, dass die Membran vom Wirt und nicht vom Virus stammt? Oder das doch lieber beim Infektionsmechanismus. Die darunter liegende Proteinmatrix besteht aus oligomeren M1-Proteinen, welche auf dem Genom-Segment 7 codiert sind. Dieses Matrixprotein dient als Angelpunkt und bindet alle anderen Struktur-bildenden Komponenten wie den vRNP-Komplex, die Membranbindenden Glycoproteine, sowie die Lipidmembran durch seine positive Polarität (Kordyukova et al. 2018; Chlanda and Zimmerberg 2016). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essentielle Rolle bei dem Zusammenbau des Virus und der nachfolgenden Umhüllung mit Wirts-Lipiden, dem sogenannten *Budding* (Nayak et al. 2009). Durch seine komplexe Funktion und die verschiedenen Bindungsdomänen für die anderen Strukturkomponenten, ist die Aminosäuresequenz des M1-Protein am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley and Mahy 1983; Kordyukova et al. 2018). Das M2-Protein ist ein Ionen-Kanal, welcher im Verlauf der Virus-Infektion eine wichtige Rolle spielt. Einerseits wird durch eine Ansäuerung des Virusinneren die Freilassung des genetischen Materials mediert und andererseits durch den pH-Wert Regulierung um den Golgi-Apparat das Budding durch Konformationsänderung des HA zu vermitteln (To, Surya, and Torres 2016; Takeuchi and Lamb 1994). Die oberflächen Proteine HA und NA sind am variablesten und spielen aus dem Grund bei der Klassifizierung der Influenza A Viren eine große Rolle (Krammer et al. 2018). Sie sind der Hauptangriffspunkt von neutralisierenden Antikörpern und lassen sich in verschiedene Subtypen einteilen. 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, Wood, and Zambon 2003). Die hohe Variabilität der HA und NA-Proteine lässt sich durch die spezielle RNA-Polymerase der Viren erklären. Diese besitzt eine hohe Fehlerate, wodurch es während der Replikation zu Mutationen kommt, welches wiederum zu veränderten Oberflächenproteinen führt (Luo 2011). Dieser Prozess ist als "Antigendrift" bekannt und führt dazu, dass neue Varianten dem Immunsystem von vorher Infizierten Individuen entgehen kann (Luo 2011; Axelsen et al. 2014). Ein weiterer wichtiger Teil der generellen Variabilität 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 (H. Kim, Webster, and Webby 2018). Abschluss Satz nach dem Motto: deswegen ist Influenza unberechenbar und kann plötzlich auftauchen oder so haha

Infektionsmechanismus? oder wird das zu lang?

1.2.2 Influenza B

Das Influenza B Virus ist ein ständiger Begleiter des Influenza A Virus und co-zirkuliert zusammen mit dem Influenza A Virus in saisonalen Epidemien (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 (Zaraket et al. 2021; Koutsakos et al. 2016). Nichts desto trotz ist das Influenza B Virus für ca. 23 % aller Influenza-Erkrankungen mit einer besonders hohen Mortalität bei Kindern (0 - 18 Jahre) von über 50 % verantwortlich (Zaraket et al. 2021).

Die Genomstruktur und der Aufbau der Influenza B Viren ist identisch mit dem des Influenza A Virus (Hampson and Mackenzie 2006), jedoch unterscheiden sich die Proteine der Viren in Länge, Aminosäure-Komposition und Funktion (Koutsakos et al. 2016). So codiert das Influenza A Genom für mindestens 17

Proteine (Vasin et al. 2014), während das leicht größere Genom des Influenza B Virus mit rund 14,6 kb nur 11 Proteine codiert (Paterson et al. 2003; Sandt et al. 2015). Der Vergleich der einzelnen Proteine mit ihren entsprechenden Aminosäure(AS) -Längen ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Übersicht und Vergleich der Proteine von Influenza A und B (Modifiziert nach Sandt et al. (2015))

RNA-Segment	Influenza A		Influenza B		Funktion
	Protein	Länge[AS]	Protein	Länge[AS]	
1	PB2	759	PB2	770	Untereinheit der RNA-Polymerase
2	PB1	757	PB1	752	Katalytische Untereinheit der RNA-Polymerase
2	PB1-F2	87		/	Proapoptotische Aktivität, Regulierung der Immunreaktionen, Interaktion mit PB1 zur Regulierung der Polymeraseaktivität
2	PB1-N40	718		/	N-terminal verkürzte Version von PB1; interagiert mit Polymerasekomplex Untereinheiten, Gleichgewicht der PB1- und PB1-F2-Expression, genaue Funktion unbekannt
3	PA	716	PA	726	Untereinheit der RNA-Polymerase
3	PA-X	61		/	Moduliert die Wirtsgenexpression, negativer Virulenzregulator
3	PA-N155	568		/	N-terminal verkürzte Version von PA; Funktion unbekannt
3	PA-N182	535		/	N-terminal verkürzte Version von PA; Funktion unbekannt
4	HA	550	HA	584	Oberflächenglykoprotein; Rezeptorbindung und Membranfusion; antigene Determinante
5	NP	498	NP	560	Verkapselung der viralen genomischen RNA
6	NA	454	NA	486	Oberflächenglykoprotein; Neuraminidase-Aktivität, Freisetzung neuer Viruspartikel nach Budding; antigene Determinante
6		/	NB	100	Ionenkanalaktivität; Funktion unbekannt
7	M1	252	M1	248	viraler Zusammenbau, Budding
7	M2	97	BM2	109	Ionenkanalaktivität; wesentlich für die Entschichtung, Rolle bei der Viruskapsung
7	M42	99		/	M2-Isoform mit alternativer Domäne, Ionenkanalaktivität; kann M2 ergänzen/ersetzen
8	NS1	230	NS1	281	Regulierung des viralen RNA-Polymerase-Komplexes, Beeinflussung des antiviralen Zustands der Zelle
8	NS2	121	NS2	122	Kern-Export-RNP, Regulierung von Transkription und Replikation
8	NS3	174		/	NS1-Isoform mit einer internen Deletion; Funktion unbekannt, mögliche Rolle: Wirtsanpassung und Überwindung der Speziesbarriere

* Y=C oder T; V=A, C oder T ** (ref:design)

Die wichtigsten Unterschiede hierbei sind das NB-Protein, welches ein hochkonserviertes Protein mit Ionenkanalaktivität ist sowie das BM2-Protein (Sandt et al. 2015). Letzteres ist ein kleines hydrophobes integrales Membranprotein, welches eine Ionenaktivität, ähnlich wie das M2-Protein bei Influenza A, besitzt und essen-

tiell für die Virus-Replikation ist (Paterson et al. 2003; Hatta, Goto, and Kawaoka 2004). Weitere Differenzen liegen unter anderem bei der RNA-Polymerase, welche zusätzlich unmethylierte gecappte mRNA's erkennen kann oder 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 $0,14 \times 10^{-3}$ bis $3,32 \times 10^{-3}$ Substitutionen/Jahr/untersuchter Sequenz als Influenza A mit einer Mutationsrate von rund $2,68 \times 10^{-3}$ bis $12,50 \times 10^{-3}$ Substitutionen/Jahr/untersuchter Sequenz (R. Chen and 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 Antigenshift mit den Influenza A Viren möglich ist (Paterson et al. 2003).

1.3 Nachweismethoden von Influenza

Trotz guter Impfungen und einem sich immer weiterentwickelndem Gesundheitssystem bleiben respiratorische Erkrankungen hervorgerufen durch die Influenza Viren ein ernst zu nehmendes Problem. So liegen die geschätzten jährlichen Todesfälle im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen verursacht durch Influenza Viren zwischen 290.000 und 650.000 (Iuliano et al. 2018). Aus diesem Grund ist eine zeitige Diagnostik entscheidend um eine rechtzeitige Behandlung zu gewährleisten (Vemula et al. 2016). Die Detektion der Influenzaviren kann über Antikörpertest, Serologischen Methoden, Zellkultur, und Nukleinsäure basierte Testverfahren wie Nukleinsäureamplifikation oder Sequenzierung erfolgen (Vemula et al. 2016). Bei serologischen Testverfahren wird auf entwickelte Antikörper im Serum des Patienten gegenüber den speziellen Virusproteinen wie HA, NA getestet. Dadurch ist es möglich, zwischen einzelnen Subtypen des Influenza A Virus zu unterscheiden (Woźniak-Kosek A 2014). Jedoch sind serologische Tests für die klinische Diagnostik nicht empfehlenswert, da für ein Ergebnis mehrere Seren zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen werden müssen, was eine schnelle Diagnostik verhindert (Chow, Doyle, and Uyeki 2019). Ebenso ist die Zellkultur, bei welcher spezielle Zelllinien mit der Patientenprobe inkubiert und über eine markierte Antikörper nachgewiesen werden, nicht für die Diagnostik geeignet, da sie trotz hoher Spezifität und Sensitivität längere Inkubationszeiten zur Folge hat (Chow, Doyle, and Uyeki 2019; Vemula et al. 2016). 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 (D.-K. Kim and Poudel 2013). Sie sind zusammen mit Nukleinsäure amplifizierende Methoden (engl.: *nucleic acid amplification techniques*, NAAT), welche als Goldstandard in der klinischen Diagnostik gelten, die empfohlenen Methoden zur Detektion von Influenzaviren (Uyeki et al. 2018).

1.4 Nukleinsäure amplifizierende Methoden - NAAT

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) ein mächtiges Werkzeug um genau diese Ziele zu erreichen (Kang et al. 2022). Hierbei werden einzelne DNA/RNA-Moleküle detektiert und das Signal über verschiedenste Methoden, wie PCR oder isotherme Amplifikation verstärkt (Kang et al. 2022; Özyay and McCalla 2021). Des Weiteren sind Benutzerfreundlichkeit, robust, schnell, sowie -> auf die POCT herleiten -> Paper based tests usw.

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 vermehrt werden und somit für Genetik, Forensik und Diagnostik verwendet werden (Gaňová et al. 2021). Das Prinzip der PCR beruht dabei auf zwei ca. 20 bp großen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, welche spezifisch an ein komplementäres DNA-Fragment binden und von einer Polymerase verlängert werden. Ein Primerpaar, bestehend aus Forward (in Leserichtung der Amplifikation) und reverse (entgegengesetzt der Leserichtung) Primer flankiert jeweils einen definierten DNA-Abschnitt, welcher in einer PCR amplifiziert wird (Ableitner 2018). Der 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 ($\sim 95^{\circ}\text{C}$) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und die DNA denaturiert. Bei dem Hybridisations schritt (Temperatur auf $55 - 65^{\circ}\text{C}$) kommt es zum sogenannten *annealing*, der Anlagerung der Primer an die DNA (Sreejith et al. 2018). Dabei ist der Vorwärtsprimer komplementär zu einer Sequenz auf dem Sense-Strang der DNA und der Rückwärtsprimer komplementär zu einer Sequenz auf dem Antisense-Strang (Mülhardt 2009). Im nachfolgenden Amplifikationsschritt bindet die Polymerase bei $\sim 72^{\circ}\text{C}$ die gebundenen Primer und synthetisiert neue Nukleotide anhand der komplementären DNA-Vorlage an den Primer. So werden diese erweitert und somit die DNA verdoppeln. Anschließend wird eine erneute DNA-Denaturierung durchgeführt und ein PCR-Zyklus ist abgeschlossen. Für eine erfolgreiche Amplifikation werden mehrere Zyklen hintereinander durchgeführt, wodurch die DNA jedes mal verdoppelt/ **exponentiell vermehrt** wird (Sreejith et al. 2018). Die amplifizierte DNA am Ende der PCR kann klassischerweise mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (Wood et al. 1994). Da DNA abhängige DNA Polymerasen keine RNA als Ausgangsmaterial erkennt, wird eine zusätzliche reverse Transkriptase (RT)-Reaktion der PCR vorangestellt, um auch RNA Proben mittels dieser Methode analysieren zu können. Bei der RT kommt es zur Umschreibung der RNA in cDNA. Die DNA kann anschließend über den beschriebenen PCR-Mechanismus amplifiziert werden (Mülhardt 2009; ODriscoll et al. 1993). Diese erweiterte PCR wird als reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) bezeichnet (S. A. Bustin et al. 2005).

Eine weitere besondere Form 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, Bell, and Loker 2021). Goldstandard der qPCR sind die fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die sogenannten Sonden, welche spezifisch innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs hybridisieren (Ranasinghe and Brown 2005). Das Prinzip der Fluoreszenzsonden beruht dabei auf der Interaktion eines Fluorophors und einem sogenannten Quencher, welche sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befinden. Der Quencher ist ein weiteres fluoreszierendes Molekül, welches von der Emission des Reportermoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) angeregt wird und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann (Ranasinghe and Brown 2005). Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die hybridisierte Sonde hydrolysiert, wodurch Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt werden (Thornton and Basu 2011). Der Quencher blockiert das Signal des Reportermoleküls nicht mehr und das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Dabei steht das freiwerdende Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur amplifizierten DNA, was eine die Echtzeit-Verfolgung der Nukleinsäureamplifikation erlaubt. Durch die Einführung eines fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten ct-Wert (engl.: *cycle threshold*), welcher von dem ersten Fluoreszenzsignal, welches sich vom Grundrauschen abhebt, überschritten wird, lässt sich der

DNA-Gehalt der Reaktion mit der Reaktionszeit verknüpfen. Somit ermöglicht die qPCR eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge (Lovatt 2002; S. Bustin 2000).

1.4.2 Isotherme Amplifikation

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

1.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation

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

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

erstmals von Guatelli et al. (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzym-mix bestehend aus einer reversen Transkriptase (RT), des avian myeloblastosis Virus, der RNase H und einer T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (DdRp) (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer Primer 1 an das 3'-Ende einer einzelsträngigen RNA. Dadurch eignet sich die NASBA besonders zum Nachweis von RNA-Molekülen, da diese direkt zum Start der Reaktion benötigt werden. Durch diese Eigenschaft unterscheidet sich die NSABA zu anderen Amplifikationsmethoden, wo ein RT-Schritt vorgeschaltet werden muss (Compton 1991; Bachman 2013; Zhang et al. 2021). Dabei hybridisieren nur 20 bp am 3'-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5-Ende hingegen besitzt eine Promotor-Erkennungssequenz für die DdRp. Nachdem der Primer gebunden hat, wird eine cDNA bei einer Temperatur von 41 °C von der im Reaktionsmix enthaltenen RT synthetisiert. Das entstandene cDNA/RNA-Hybrid wird anschließend von der RNase H verdaut, sodass der einzelsträngige DNA-Anteil mit der Promotorsequenz im Reaktionsmix enthalten ist. Ein zweiter 20 bp langer Primer2, welcher komplementär zur DNA ist, hybridisiert und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche um die 100 RNA-Kopien pro DNA-Template erzeugt. Die neu entstandenen RNA-Moleküle gehen in den ersten Zyklus der NASBA ein, indem der Primer2 hybridisiert, die RT ein cDNA/RNA hybrid erzeugt und der RNA-Anteil durch die RNase H hydrolysiert wird. An diese cDNA bindet wiederum Primer1 und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang, sodass der Promotor wieder aktiv wird und neue RNA-Kopien erstellt werden können (Compton 1991).

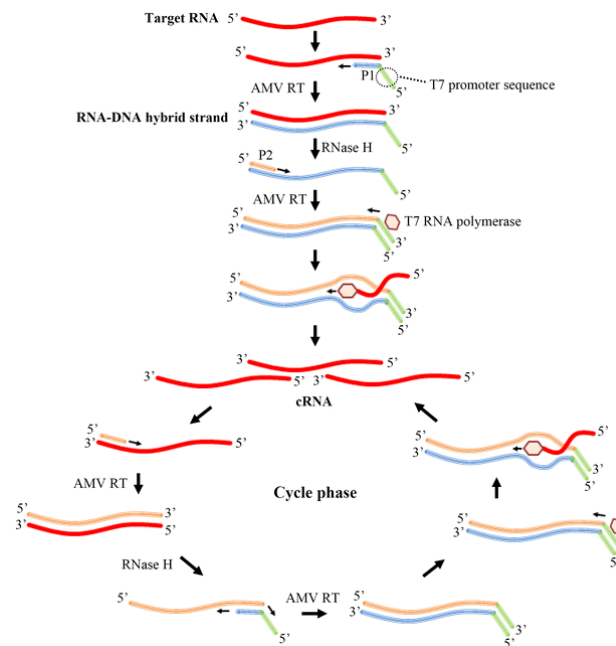


Abbildung 4: **Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der NASBA mit der Initialen Phase und der zyklischen Phase. Die Anfängliche RNA wird durch die Hybridisation von Primern in ein DNA/RNA hybrid überführt, dieses über einen RNase verdaut und erneute DNA Synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt. Durch den auf dem Doppelstrang aktiven Promotor werden viele RNA-Kopien erzeugt, welche in den Amplifikationszyklus eingehen. Modifiziert nach Zhong and Zhao (2018).

Die Amplifikation von DNA-Molekülen als Ausgangsmaterial mittels NASBA ist ebenfalls möglich, jedoch

mit einem erhöhten Aufwand und zusätzlichen Denaturierung-Schritten (Malek, Sooknanan, and Compton 1994). Hierbei hybridisiert nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C Primer1 mit der Ziel-DNA und wird durch die frisch dazugegebene RT verlängert. Da kein cDNA/RNA hybrid entstanden ist, kann die RNase nicht den Gegenstrang hydrolysieren und ein weiterer Denaturierungsschritt ist nötig. Durch die hohen Temperaturen wird jedoch die RT inaktiviert, wodurch sie mit den anderen Enzymen neu zugegeben werden muss. Anschließend bindet Primer2, der Doppelstrang wird vervollständigt und die DdRp kann über den aktiven Promotor RNA-Kopien erstellen (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002).

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

1.4.5 Rekombinase Polymerase Amplifikation

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

Um unter anderem eine Dissoziation des Rekombinase-Primer-Komplexes zu unterbinden und so die Amplifikation zu beschleunigen wird ein Polyethylen Glucol (PEG) mit hohem molekularem Gewicht, ein sogenannter “Crowding-Agent” verwendet (Lobato and OSullivan 2018; Lillis et al. 2016). Dieser trägt zu einer Viskosität der Reaktionslösung bei und erschwert so die Diffusion. Zusammen mit den niedrigen Reaktionstemperaturen von ~40 °C und der dadurch geringen Thermischen Konvektion kann es zur lokalen

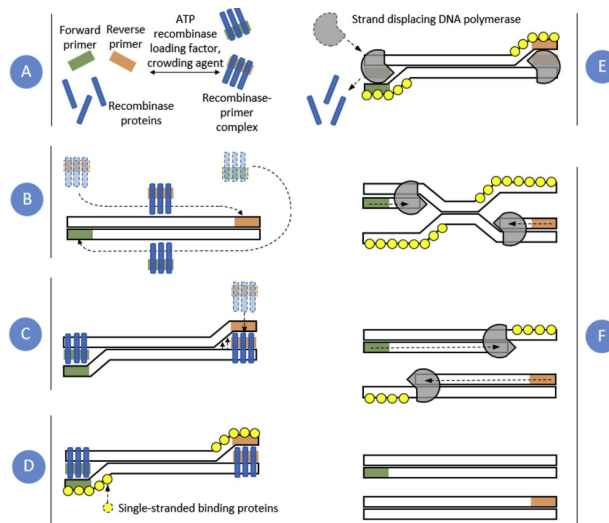


Abbildung 5: **Schematischer Reaktionsmenismus der RPA:** **A:** Bildung der Rekombinase-Primer-Komplexe unter ATP verbrauch. **B:** Migration der Rekombinase-Primer-Komplexe entlang der Ziel DNA bis zu den homologen Primersequenzen. **C:** Insertion des Rekombinase-Primer-Komplexes in die doppelsträngige DNA mit der Bindung des Primer an die komplementäre Sequenz. **D:** Stabilisierung der einzelsträngigen DNA durch die SSB's. **E:** Dissoziation der Rekombinase nach erfolgreicher Primerbindung und beginn der Amplifikation durch die Polymerase. **F:** Fortschreiten der Amplifikation bis zwei neue komplementäre doppelsträngige DNA-Moleküle vorliegen und der Mechanismus von vorne beginnen kann. Modifiziert nach Lobato and OSullivan (2018).

Reagenzien-Knappheit kommen, wodurch eine minderung der Amlifikationsrate entsteht. Aus diesem Grund kann vor allem bei niedrigen DNA-Konzentrationen ein zusätzlicher Mischschritt während der laufenden RPA-Reaktion erforderlich sein (Lillis et al. 2016). Ebenfalls kann Analog zur RT-PCR, die RPA mit einer Reversen Transkriptase Reaktion kombiniert werden um RNA zu vervielfältigen (H. M. Yoo, Kim, and Kim 2021).

Ein wichtiger Punkt der RPA ist das spezielle Primerdesign. Im gegensatz zur PCR werden hier längere Oligonukleotide (zwischen 30 - 35 bp) verwendet, welche ein Amplifikationsbereich von wenigen 100 Nukleotiden einspannen (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Ein automatisiertes Programm für das Design der RPA-Primer ist in der Literatur beschrieben (Higgins et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass bis zu drei Nukleotid-Mismatches in den jeweiligen Primern, die Detektion nicht beeinflussen (Boyle et al. 2013), auch wenn eine Studie von Higgins et al. (2022) zum Schluss kam, dass viel mehr die Kombination der Mismatches als die Anzahl einen Einfluss auf die Reaktion hat (Higgins et al. 2022). Die

solidphase RPA

Stel ansatz erwähnen

1.5 Ziel der Arbeit

Das Projekt R&C.net befasst sich mit der Erstellung eines mobilen Kofferlabors für die Point of Care Diagnostik und vor Ort Analytik. Schwerpunkt bildet dabei die Detektion viraler Atemwegs-Infektionserkrankungen. Ziel der Arbeit ist es, jeweils ein RPA-System für den Einsatz im Kofferlabor zum Nachweis der Influenza A und B Viren zu entwickeln. Dabei soll das Influenza A System die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nach-

weisen können und die Influenza B RPA alle PAN-Influenza B Viren detektieren können. Die Entwicklung der RPA-Systeme unterteilt sich dabei in das Design von Primer-Sonden-Sets, welche anschließend auf Eignung geprüft werden, sowie Sensitivitäts- und Spezifitätstest des geeigneten Systems. weiterführend soll die Wirksamkeit der Entwickelten RPA-Systeme in einem klinischen Probenhintergrund getestet und die Sensitivität mit PCR-Systemen für die Detektion der gleichen Viren verglichen werden. Um diese Tests durchführen zu können ist die *in vitro* Erstellung einer artifizieller viraler RNA notwendig. Des Weiteren ist es ein Ziel Optimierungsschritte zur Verbesserung der RPA-Performance der entwickelten Systeme vorzunehmen. Dabei sollen Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt der Reaktion sowie Ansatzvolumen im Vergleich zwischen 50 µl und 6 µl (8tel Ansatz) untersucht werden. Zusätzlich soll überprüft werden, ob eine Primerassymetrie einen positiven Einfluss auf die Reaktion ausübt.

- Ableitner, Oksana. 2018. *Einführung in Die Molekularbiologie*. Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-20624-6>.
- Arranz, Rocío, Rocío Coloma, Francisco Javier Chichón, José Javier Conesa, José L. Carrascosa, José M. Valpuesta, Juan Ortín, and Jaime Martín-Benito. 2012. “The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins.” *Science* 338 (6114): 1634–37. <https://doi.org/10.1126/science.1228172>.
- Augustine, Robin, Anwarul Hasan, Suvathi Das, Rashid Ahmed, Yasuyoshi Mori, Tsugunori Notomi, Bhavesh Kevadiya, and Avnesh Thakor. 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, Jacob Bock, Rami Yaari, Bryan T. Grenfell, and Lewi Stone. 2014. “Multiannual Forecasting of Seasonal Influenza Dynamics Reveals Climatic and Evolutionary Drivers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (26): 9538–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321656111>.
- Babu, Binoy, Francisco M. Ochoa-Corona, and Mathews L. Paret. 2018. “Recombinase Polymerase Amplification Applied to Plant Virus Detection and Potential Implications.” *Analytical Biochemistry* 546 (April): 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>.
- Bachman, Julia. 2013. “Reverse-Transcription PCR (RT-PCR).” In *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*, 67–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6>.
- Bai, Chongzhi, Qiming Zhong, and George Fu Gao. 2021. “Overview of SARS-CoV-2 Genome-Encoded Proteins.” *Science China Life Sciences* 65 (2): 280–94. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>.
- Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Frank Hufert, and Gregory Dame. 2020. “Schnellnachweis von SARS-CoV-2 Mit Recombinase Polymerase Amplification.” *BIOspektrum* 26 (6): 624–27. <https://doi.org/10.1007/s12268-020-1458-3>.
- Boyle, David S., Dara A. Lehman, Lorraine Lillis, Dylan Peterson, Mitra Singhal, Niall Armes, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, and Julie Overbaugh. 2013. “Rapid Detection of HIV-1 Proviral DNA for Early Infant Diagnosis Using Recombinase Polymerase Amplification.” Edited by Gary J. Nabel. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>.
- Brendish, Nathan J., Hannah F. Schiff, and Tristan W. Clark. 2015. “Point-of-Care Testing for Respiratory Viruses in Adults: The Current Landscape and Future Potential.” *Journal of Infection* 71 (5): 501–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008>.
- Bustin, S A, V Benes, T Nolan, and M W Pfaffl. 2005. “Quantitative Real-Time RT-PCR – a Perspective.” *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3): 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>.
- Bustin, SA. 2000. “Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays.” *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–93. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- Chander, Yogesh, Jim Koelbl, Jamie Puckett, Michael J. Moser, Audrey J. Klingele, Mark R. Liles, Abel Carrias, David A. Mead, and Thomas W. Schoenfeld. 2014. “A Novel Thermostable Polymerase for RNA and DNA Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).” *Frontiers in Microbiology* 5 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>.
- Charrel, Rémi N., Xavier de Lamballerie, and Didier Raoult. 2007. “Chikungunya Outbreaks — the Globalization of Vectorborne Diseases.” *New England Journal of Medicine* 356 (8): 769–71. <https://doi.org/10.1056/nejmp078013>.
- Chen, 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>.

- Chen, Xiaoyong, Shasha Liu, Mohsan Ullah Goraya, Mohamed Maarouf, Shile Huang, and Ji-Long Chen. 2018. "Host Immune Response to Influenza a Virus Infection." *Frontiers in Immunology* 9 (March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>.
- Chlanda, Petr, and Joshua Zimmerberg. 2016. "Protein-Lipid Interactions Critical to Replication of the Influenza a Virus." *FEBS Letters* 590 (13): 1940–54. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118>.
- Chow, Eric J., Joshua D. Doyle, and Timothy M. Uyeki. 2019. "Influenza Virus-Related Critical Illness: Prevention, Diagnosis, Treatment." *Critical Care* 23 (1). <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2491-9>.
- Compton, J. 1991. "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification." *Nature* 350 (6313): 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>.
- Daher, Rana K, Gale Stewart, Maurice Boissinot, and Michel G Bergeron. 2016. "Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications." *Clinical Chemistry* 62 (7): 947–58. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>.
- Deiman, Birgit, Pierre van Aarle, and Peter Sillekens. 2002. "Characteristics and Applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)." *Molecular Biotechnology* 20 (2): 163–80. <https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163>.
- Dharmapalan, Dhanya. 2020. "Influenza." *The Indian Journal of Pediatrics* 87 (10): 828–32. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1>.
- Firth, Andrew E., and Ian Brierley. 2012. "Non-Canonical Translation in RNA Viruses." *Journal of General Virology* 93 (7): 1385–1409. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0>.
- Foni, Emanuela, Chiara Chiapponi, Laura Baioni, Irene Zanni, Marianna Merenda, Carlo Rosignoli, Constantinos S. Kyriakis, et al. 2017. "Influenza d in Italy: Towards a Better Understanding of an Emerging Viral Infection in Swine." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12012-3>.
- Gaňová, Martina, Haoqing Zhang, Hanliang Zhu, Marie Korabečná, and Pavel Neuzil. 2021. "Multiplexed Digital Polymerase Chain Reaction as a Powerful Diagnostic Tool." *Biosensors and Bioelectronics* 181 (June): 113155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155>.
- Goble, Joseph A., and Patrick T. Rocafort. 2016. "Point-of-Care Testing." *Journal of Pharmacy Practice* 30 (2): 229–37. <https://doi.org/10.1177/0897190015587696>.
- Guatelli, J C, K M Whitfield, D Y Kwok, K J Barringer, D D Richman, and T R Gingeras. 1990. "Isothermal, in Vitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (5): 1874–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>.
- Hampson, Alan W, and John S Mackenzie. 2006. "The Influenza Viruses." *Medical Journal of Australia* 185 (S10). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00705.x>.
- Hatta, Masato, Hideo Goto, and Yoshihiro Kawaoka. 2004. "Influenza b Virus Requires BM2 Protein for Replication." *Journal of Virology* 78 (11): 5576–83. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5576-5583.2004>.
- Hause, Ben M., Mariette Ducatez, Emily A. Collin, Zhiguang Ran, Runxia Liu, Zizhang Sheng, Anibal Armien, et al. 2013. "Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza c Viruses." Edited by Ron A. M. Fouchier. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>.
- Higgins, Matthew, Matt Ravenhall, Daniel Ward, Jody Phelan, Amy Ibrahim, Matthew S Forrest, Taane G Clark, and Susana Campino. 2018. "PrimedRPA: Primer Design for Recombinase Polymerase Amplification Assays." Edited by John Hancock. *Bioinformatics* 35 (4): 682–84. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>.
- Higgins, Matthew, Oliver W. Stringer, Daniel Ward, Jennifer M. Andrews, Matthew S. Forrest, Susana

- Campino, and Taane G. Clark. 2022. “Characterizing the Impact of Primer-Template Mismatches on Recombinase Polymerase Amplification.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–16. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005>.
- Huang, Tianzeng, Linzhi Li, Xing Liu, Qi Chen, Xueen Fang, Jilie Kong, Mohamed S. Draz, and Hongmei Cao. 2020. “Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique: Principle, Development and Wide Application in Food Safety.” *Analytical Methods* 12 (46): 5551–61. <https://doi.org/10.1039/d0ay01768j>.
- Islam, Md Mamunul, and Dipak Koirala. 2022. “Toward a Next-Generation Diagnostic Tool: A Review on Emerging Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques for the Detection of SARS-CoV-2 and Other Infectious Viruses.” *Analytica Chimica Acta* 1209 (May): 339338. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338>.
- Iuliano, A Danielle, Katherine M Roguski, Howard H Chang, David J Muscatello, Rakhee Palekar, Stefano Tempia, Cheryl Cohen, et al. 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, Tomotada, Toshiaki Sonobe, and Kozaburo Hayashi. 2003. “Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex, *M. Avium*, and *M. Intracellulare* in Sputum Samples.” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>.
- Jagger, B. W., H. M. Wise, J. C. Kash, K.-A. Walters, N. M. Wills, Y.-L. Xiao, R. L. Dunfee, et al. 2012. “An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response.” *Science* 337 (6091): 199–204. <https://doi.org/10.1126/science.1222213>.
- Javanian, Mostafa, Mohammad Barary, Sam Ghebrehewet, Veerendra Koppolu, VeneelaKrishnaRekha Vasigala, and Soheil Ebrahimpour. 2021. “A Brief Review of Influenza Virus Infection.” *Journal of Medical Virology* 93 (8): 4638–46. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>.
- Kang, Tongjia, Jingming Lu, Tian Yu, Yi Long, and Guozhen Liu. 2022. “Advances in Nucleic Acid Amplification Techniques (NAATs): COVID-19 Point-of-Care Diagnostics as an Example.” *Biosensors and Bioelectronics* 206 (June): 114109. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109>.
- Kim, Dae-Ki, and Barun Poudel. 2013. “Tools to Detect Influenza Virus.” *Yonsei Medical Journal* 54 (3): 560. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.3.560>.
- Kim, Hyunsuh, Robert G. Webster, and Richard J. Webby. 2018. “Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen.” *Viral Immunology* 31 (2): 174–83. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>.
- Kordyukova, Larisa V., Eleonora V. Shtykova, Lyudmila A. Baratova, Dmitri I. Svergun, and Oleg V. Batishchev. 2018. “Matrix Proteins of Enveloped Viruses: A Case Study of Influenza A Virus M1 Protein.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (3): 671–90. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089>.
- Koutsakos, Marios, Thi HO Nguyen, Wendy S Barclay, and Katherine Kedzierska. 2016. “Knowns and Unknowns of Influenza B Viruses.” *Future Microbiology* 11 (1): 119–35. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>.
- Krammer, Florian, Gavin J. D. Smith, Ron A. M. Fouchier, Malik Peiris, Katherine Kedzierska, Peter C. Doherty, Peter Palese, et al. 2018. “Influenza.” *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>.
- Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix von Stetten. 2019. “Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification.” *The Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01837a>.

- [g/10.1039/c8an01621f](https://doi.org/10.1039/c8an01621f).
- Lillis, Lorraine, Joshua Siverson, Arthur Lee, Jason Cantera, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, Dara A. Lehman, and David S. Boyle. 2016. "Factors Influencing Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Assay Outcomes at Point of Care." *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>.
- Lobato, Ivan Magriñá, and Ciara K. OSullivan. 2018. "Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98 (January): 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
- Louie, Richard F., Tyler Kitano, T. Keith Brock, Robert Derlet, and Gerald J. Kost. 2009. "Point-of-Care Testing for Pandemic Influenza and Biothreats." *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3 (S2): S193–202. <https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4>.
- Lovatt, Archie. 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, Ming. 2011. "Influenza Virus Entry." In *Viral Molecular Machines*, 201–21. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9.
- Ma, Haiyan, Kristin N. Bell, and Rossi N. Loker. 2021. "qPCR and qRT-PCR Analysis: Regulatory Points to Consider When Conducting Biodistribution and Vector Shedding Studies." *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 20 (March): 152–68. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>.
- Malek, Larry, Roy Sooknanan, and Jean Compton. 1994. "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™)." In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, 253–60. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253>.
- McCauley, J W, and B W J Mahy. 1983. "Structure and Function of the Influenza Virus Genome." *Biochemical Journal* 211 (2): 281–94. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>.
- Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5>.
- Mori, Yasuyoshi, Kentaro Nagamine, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. 2001. "Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 150–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
- Mülhardt, Cornel. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0): 263–73. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- Muramoto, Yukiko, Takeshi Noda, Eiryo Kawakami, Ramesh Akkina, and Yoshihiro Kawaoka. 2013. "Identification of Novel Influenza a Virus Proteins Translated from PA mRNA." *Journal of Virology* 87 (5): 2455–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12>.
- Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. "Accelerated Reaction by Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Loop Primers." *Molecular and Cellular Probes* 16 (3): 223–29. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
- Nayak, Debi P., Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou, and Subrata Barman. 2009. "Influenza Virus Morphogenesis and Budding." *Virus Research* 143 (2): 147–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres>

- .2009.05.010.
- Nicholson, Karl G, John M Wood, and Maria Zambon. 2003. "Influenza." *The Lancet* 362 (9397): 1733–45. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14854-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14854-4).
- Njouom, Richard, Gwladys Chavely Monamele, Burcu Ermetal, Serge Tchatchouang, Sylvie Moyo-Tetang, John W. McCauley, and Rodney S. Daniels. 2019. "Detection of Influenza c Virus Infection Among Hospitalized Patients, Cameroon." *Emerging Infectious Diseases* 25 (3): 607–9. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181213>.
- Notomi, T. 2000. "Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA." *Nucleic Acids Research* 28 (12): 63e–63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- ODriscoll, Lorraine, Carmel Daly, Mohamad Saleh, and Martin Clynes. 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, Qusay Q, Olga Fedorova, Tianshuo Liu, and Anna M Pyle. 2022. "A Molecular Beacon Assay for Monitoring RNA Splicing." *Nucleic Acids Research* 50 (13): e74–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac242>.
- Özay, Burcu, and Stephanie E McCalla. 2021. "A Review of Reaction Enhancement Strategies for Isothermal Nucleic Acid Amplification Reactions." *Sensors and Actuators Reports* 3 (November): 100033. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100033>.
- Parida, Manmohan, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao, and Kouichi Morita. 2008. "Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A New Generation of Innovative Gene Amplification Technique; Perspectives in Clinical Diagnosis of Infectious Diseases." *Reviews in Medical Virology* 18 (6): 407–21. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
- Park, Jee-Woong. 2022. "Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests." *Biosensors* 12 (10): 857. <https://doi.org/10.3390/bios12100857>.
- 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).
- Piepenburg, Olaf, Colin H Williams, Derek L Stemple, and Niall A Armes. 2006. "DNA Detection Using Recombination Proteins." Edited by James Haber. *PLoS Biology* 4 (7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- Pumford, Elizabeth A., Jiakun Lu, Iza Spaczai, Matthew E. Prasetyo, Elaine M. Zheng, Hanxu Zhang, and Daniel T. Kamei. 2020. "Developments in Integrating Nucleic Acid Isothermal Amplification and Detection Systems for Point-of-Care Diagnostics." *Biosensors and Bioelectronics* 170 (December): 112674. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>.
- Ranasinghe, Rohan T., and Tom Brown. 2005. "Fluorescence Based Strategies for Genetic Analysis." *Chemical Communications*, no. 44: 5487. <https://doi.org/10.1039/b509522k>.
- RKI. 2019. "Infektionsepidemiologisches Jahrbuch Meldepflichtiger Krankheiten Für 2018." *Robert-Koch-Institut*. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile.
- Sandt, Carolien E van de, Rogier Bodewes, Guus F Rimmelzwaan, and Rory D de Vries. 2015. "Influenza b Viruses: Not to Be Discounted." *Future Microbiology* 10 (9): 1447–65. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.65>.
- Sanjuán, Rafael, and Pilar Domingo-Calap. 2016. "Mechanisms of Viral Mutation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4433–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.
- Shao, Wenhan, Xinxin Li, Mohsan Goraya, Song Wang, and Ji-Long Chen. 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, Aarjoo, Sanjeev Balda, Mansi Apreja, Kirti Kataria, Neena Capalash, and Prince Sharma. 2021. “COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques.” *International Journal of Biological Macromolecules* 193 (December): 1835–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016>.
- Silva, Severino Jefferson Ribeiro da, Keith Pardee, and Lindomar Pena. 2019. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review.” *Viruses* 12 (1): 19. <https://doi.org/10.3390/v12010019>.
- Soroka, Marianna, Barbara Wasowicz, and Anna Rymaszewska. 2021. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?” *Cells* 10 (8): 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>.
- Sreejith, Kamalalayam Rajan, Chin Hong Ooi, Jing Jin, Dzung Viet Dao, and Nam-Trung Nguyen. 2018. “Digital Polymerase Chain Reaction Technology – Recent Advances and Future Perspectives.” *Lab on a Chip* 18 (24): 3717–32. <https://doi.org/10.1039/c8lc00990b>.
- Takeuchi, K, and R A Lamb. 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): 911–19. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.2.911-919.1994>.
- Tan, Meiying, Chuan Liao, Lina Liang, Xueli Yi, Zihan Zhou, and Guijiang Wei. 2022. “Recent Advances in Recombinase Polymerase Amplification: Principle, Advantages, Disadvantages and Applications.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (November). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1019071>.
- Thornton, Brenda, and Chhandak Basu. 2011. “Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software.” *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145–54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- To, Janet, Wahyu Surya, and Jaume Torres. 2016. “Targeting the Channel Activity of Viroporins.” In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 307–55. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.12.003>.
- To, Janet, and Jaume Torres. 2019. “Viroporins in the Influenza Virus.” *Cells* 8 (7): 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>.
- Tomita, Norihiro, Yasuyoshi Mori, Hidetoshi Kanda, and Tsugunori Notomi. 2008. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products.” *Nature Protocols* 3 (5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>.
- Uyeki, Timothy M, Henry H Bernstein, John S Bradley, Janet A Englund, Thomas M File, Alicia M Fry, Stefan Gravenstein, et al. 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): e1–47. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy866>.
- Uyeki, Timothy M, David S Hui, Maria Zambon, David E Wentworth, and Arnold S Monto. 2022. “Influenza.” *The Lancet* 400 (10353): 693–706. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5).
- Valera, Enrique, Aaron Jankelow, Jongwon Lim, Victoria Kindratenko, Anurup Ganguli, Karen White, James Kumar, and Rashid Bashir. 2021. “COVID-19 Point-of-Care Diagnostics: Present and Future.” *ACS Nano* 15 (5): 7899–7906. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981>.
- Vasin, A. V., O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova, and O. I. Kiselev. 2014. “Molecular Mechanisms Enhancing the Proteome of Influenza a Viruses: An Overview of Recently Discovered Proteins.” *Virus Research* 185 (June): 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>.
- Velthuis, Aartjan J. W. te, and Ervin Fodor. 2016. “Influenza Virus RNA Polymerase: Insights into the

- Mechanisms of Viral RNA Synthesis.” *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 479–93. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>.
- Vemula, Sai, Jiangqin Zhao, Jikun Liu, Xue Wang, Santanu Biswas, and Indira Hewlett. 2016. “Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans.” *Viruses* 8 (4): 96. <https://doi.org/10.3390/v8040096>.
- Wood, Gary S., Rosnn M. Tung, Andreas C. Heaffner, Carol F. Crooks, Shaoyi Liao, Rachaci Orozco, Hendrik Veelken, et al. 1994. “Detection of Clonal t-Cell Receptor γ Gene Rearrangements in Early Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome by Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR/DGGE).” *Journal of Investigative Dermatology* 103 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114>.
- Woźniak-Kosek A, Hoser G., Kempnińska-Mirosławska B. 2014. “Detection of the Influenza Virus Yesterday and Now.” *Acta Biochimica Polonica*. 61(3): 465–70. PMID: 25180218.
- Yoo, Hee Min, Il-Hwan Kim, and Seil Kim. 2021. “Nucleic Acid Testing of SARS-CoV-2.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6150. <https://doi.org/10.3390/ijms22116150>.
- Yoo, Sung J., Taeyong Kwon, and Young S. Lyoo. 2018. “Challenges of Influenza a Viruses in Humans and Animals and Current Animal Vaccines as an Effective Control Measure.” *Clinical and Experimental Vaccine Research* 7 (1): 1. <https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1>.
- Zaraket, Hassan, Aeron C. Hurt, Barry Clinch, Ian Barr, and Nelson Lee. 2021. “Burden of Influenza b Virus Infection and Considerations for Clinical Management.” *Antiviral Research* 185 (January): 104970. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104970>.
- Zhang, Wei S., Jianbin Pan, Feng Li, Min Zhu, Mengting Xu, Hongyan Zhu, Yanyan Yu, and Gaoxing Su. 2021. “Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Coupled with CRISPR-Cas12a for Facile and Highly Sensitive Colorimetric SARS-CoV-2 Detection.” *Analytical Chemistry* 93 (8): 4126–33. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013>.
- Zhao, Yongxi, Feng Chen, Qian Li, Lihua Wang, and Chunhai Fan. 2015. “Isothermal Amplification of Nucleic Acids.” *Chemical Reviews* 115 (22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>.
- Zhong, Junliang, and Xihong Zhao. 2018. “Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Food-borne Pathogens.” *Food Analytical Methods* 11 (6): 1543–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>.