**Inhaltsverzeichnis**

[1 Einleitung 2](#_Toc14715)

[1.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts 2](#_Toc14716)

[1.2 Die Influenza Viren - Pandemieverursacher Nr. 1 2](#_Toc14717)

[1.2.1 Influenza A 3](#_Toc14718)

[1.2.2 Influenza B 5](#_Toc14719)

[1.3 Nachweismethoden von Influenz 5](#_Toc14720)

[1.4 Amplifikation 5](#_Toc14721)

[1.4.1 Die Polymerase Kettenreaktion 5](#_Toc14722)

[1.4.2 Isotherme Amplifikation 6](#_Toc14723)

[1.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation 6](#_Toc14724)

[1.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation 7](#_Toc14725)

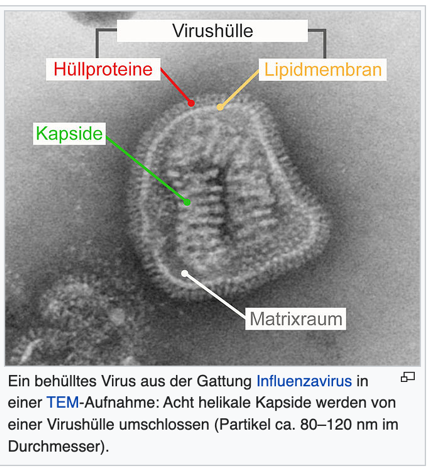
[1.4.5 Rekombinase Polymerase Amplifikation 9](#_Toc14726)

[1.5 Ziel der Arbeit 9](#_Toc14727)

# Einleitung

## 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 (1918) mit über 50 Millionen Toten (Dharmapalan, 2020), das Chikungunya Virus (2006) 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 Milliardenschäden (Louie *et al.*, 2009). Viren lassen sich, in einer ersten Annäherung, als ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten mit einem DNA oder RNA-Genom beschreiben. Einige, sogenannte behüllte Viren weisen zudem eine Virushülle bestehend aus viralen Hüllproteinen auf, die in eine Phospholipid-Doppelschicht eingebettet sind.



Beispiel Influenza virus aus wiki geklaut

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). The remarkable capacity of some viruses to adapt to new hosts and environments is highly dependent on their ability to generate *de novo* diversity in a short period of time. und diese, durch leicht veränderte Infektionsstrukturen mögliche Immunlücken besetzen können (Sanjuán & Domingo-Calap, 2016). Dadurch entstehen neue Infektionsherde und Pandemien (**quelle?**)Die vorherrschende SARS-CoV-2 Pandemie 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).

Die Polymerase Ketten Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) ist die vorherrschende Testmethode in der medizinischen Diagnostik, weil durch die Amplifikation der Nukleinsäuren hohe Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht werden. Jedoch benötigt die PCR meist mehr als 24 h bis zum Ergebnis, sowie spezialisierte Laboratorien und geschultes Personal (Brendish *et al.*, 2015). Dadurch kann es schwierig werden, die Infektionsketten erfolgreich zu unterbrechen, da erkrankte Patienten binnen der 24h weitere Personen infizieren können (Sharma *et al.*, 2021). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Diagnostik mit sensitiven und kostengünstigen Alternativen zu ergänzen, welche vor Ort durchgeführt werden können mit sogenanntem *Point of care testing* (POCT) (Goble & Rocafort, 2016). Für das POCT werden isotherme Nukleinsäureamplifikationstechniken zur Detektion der Erreger eingesetzt, die 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 & Koirala, 2022).

## Die Influenza Viren – Orthomyxoviren

Die bekanntesten Vertreter Orthomyxo-Virusfamilie sind die Influenzaviren. Man unterscheidet, aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und der serologischen Charakteristika ihrer NP- und M-Proteine die Typen A, B C und D (seit 2011 neu entdeckt). Modrow /Foni zitiert. Die Influenza-A-Viren, verursachen beim Menschen die klassische Virusgrippe.

Die Influenza Viren sind behüllte, einzelsträngige RNA-Viren Abbildung .... Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5´→3´ Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Segmente unterteilt (Modrow *et al.*, 2010). Von diesen können alle außer Typ D, welcher nur Rinder und Schweine als Wirt befällt (Foni *et al.*, 2017), Menschen infizieren und Krankheiten verursachen (Javanian *et al.*, 2021). Influenza Typ A besitzt die höchste Virulenz (Yoo *et al.*, 2018) und ist für die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verantwortlich. I

nfluenza-A- und -B-Viren codieren für je ein Hämagglutinin (HA) und eine Neuraminidase (NA). Nutze die Abbildung den Aufbau zu beschreiben

Kurz auf die Funktionen eingehen

Hier fehlt eine Weiterbildung/Kurzkapitel zu antigenic drift and shift dann wird klar was unten mit der Reassortierung hier oder später up to you

Derzeit kursieren eide Influenza-A Subtypen, H1N1 und H3N2, in der Bevölkerung (Javanian *et al.*, 2021). Influenza Typ B infiziert dagegen ausschließlich Menschen und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Die Pandemiegefahr ist dadurch eingeschränkt, da es 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 hierfür auch Schweine als Wirt bekannt (Hause *et al.*, 2013; Njouom *et al.*, 2019).

Die „echte“ Grippe, verursacht durch die Influenza Viren xyz ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit mehr als 300.000 Todesfällen weltweit (RKI, 2019; Uyeki *et al.*, 2022). Mehrere Influenza Pandemien ereigneten sich allein in den letzten 100 Jahren, darunter die bekannte Spanische Grippe mit über 50 Millionen toten (Paules & Subbarao, 2017; Biggerstaff *et al.*, 2014). Weitere Pandemien waren die Asiatische Grippe (1957), die Hongkong Grippe (1968) sowie die Schweinegrippe (2009) bei welcher durch eine Reassortierung in Schweinen die Viren auf den Menschen übersprangen (Paules & Subbarao, 2017).

### Influenza A

Das zur Virusfamilie der Orthomyxoviren gehörige Influenza A Virus ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA Virus. Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5´-3´ Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 1). Das ca. 14 kb (oder 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 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 werden (Vasin *et al.*, 2014). Zu den essentiellen Proteinen zählen die Neuraminidase (NA), welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das Hämagglutinin (HA), welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixproteinen (M1), das Membranprotein (M2), die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, das Nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, Pb1 und Pb2 der RNA-Polymerase (Luo, 2011; Krammer *et al.*, 2018). Die Accessoire-Proteine sind 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,. Die alternativen ORFs 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 überspring, oder *internal RibosomEntry* wobei das Ribosom an ein internes Start-Codon durch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird(Firth & Brierley, 2012).

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 1 gezeigt aus den 3 Untereinheiten PA, PB1 und PB2, wobei die Gensequenz für PA auf dem Segment 3, für PB1 auf dem Segment 2 und PB2 auf dem Segment 1 codiert sind (Krammer *et al.*, 2018). Das Heterotrimer assoziiert innerhalb des Virus mit den komplementären Sequenzen der einzelnen Genomsegmentenden. Verbleibende einzelsträngige RNA wird von oligomeren NPs gebunden, welche auf Segment 5 codiert sind. Der resultierende RNA-Protein-Komplex ist in der Literatur als vRNP-Komplex (engl.: *viral ribonucleoprotein*) beschrieben (Krammer *et al.*, 2018; Velthuis & Fodor, 2016).

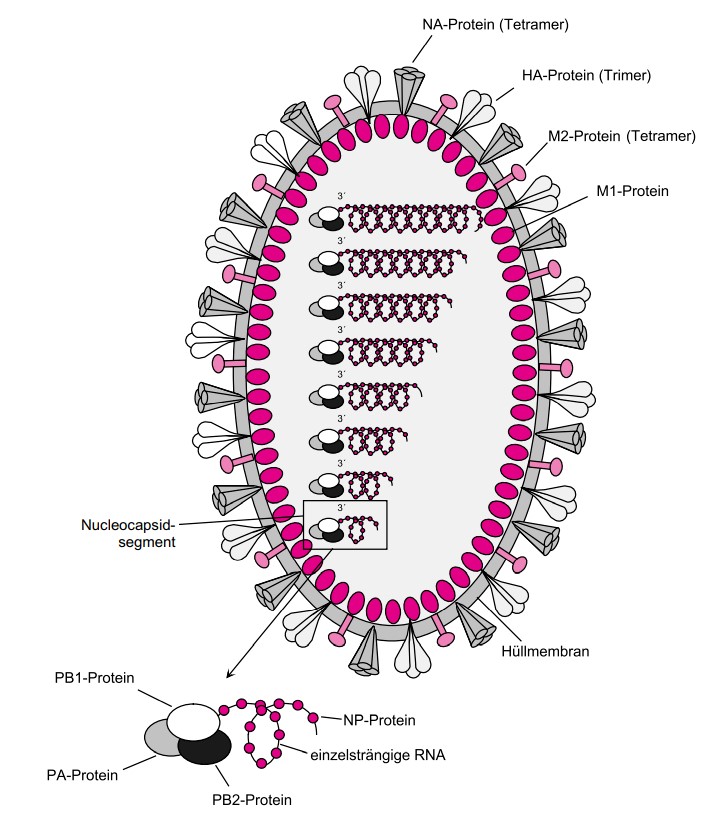


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau des Influenza A Virus**: Das Influenza A Virus besitzt ein xyz Genom …(Genom beschrieben). Das Virus ist behüllt, … auf Hüllproteine eingehen, dann Überleitung zu anderen wichtigen Proteinen

Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Abbildung modifizierte nach Modrow *et al.* (2010).

Das Virion des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung aus einer äußeren cholesterol-haltigen doppel-Lipid Schicht, in welche die Glycoproteine NA, HA und M2 integriert sind (To & 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 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 & Zimmerberg, 2016). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essenzielle Rolle bei dem Zusammenbau des Virus und der nachfolgenden Umhüllung mit Wirts-Lipiden, dem sogenaannten *Budding* (Nayak *et al.*, 2009). Durch seine komplexe Funktion und die verschieden Bindungsdomänen für die anderen Strukturkomponenten, ist die Aminosäuresequenz des M1-Protein am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley & Mahy, 1983; Kordyukova *et al.*, 2018).

### Influenza B

## Molekulare genetische Nachweismethoden von Influenza

## … (NAATs)

### Die Polymerase Kettenreaktion - der Stand der Technik

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 in der 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 hitzestabilen DNA-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; 1) der DNA-Denaturierung, der 2) Primerhybridisierung und der 3) Elongation. Im ersten Schritt der werden mittels hoher Temperatur (~95 °C) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und die DNA denaturiert. Bei dem Hybridisierungsschritt (Temperatur auf 55 - 65 °C) kommt es zum sogenannten annealing, der Anlagerung 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 ~72 °C die gebundenen Primer Anhand der DNA-Vorlage erweitern und somit die DNA verdoppeln. Für eine erfolgreiche Amplifikation werden mehrere Zyklen hintereinander durchgeführt, wodurch die DNA jedes Mal verdoppelt/ exponentiell vermehrt wird (Sreejith *et al.*, 2018). Die amplifizierte DNA am Ende der PCR kann klassischerweise mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Wood *et al.*, 1994).

Da DNA abhängige DNA Polymerasen, wie die *Taq*- Polymerase 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). Diese erweiterte PCR wird als reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) bezeichnet (Bustin *et al.*, 2005).

Eine weitere besondere Form der PCR ist die quantitative PCR (qPCR). Hierbei wird dem PCR-Reaktionsmix ein fluoreszierendes Reportermolekül zugesetzt (Ma *et al.*, 2021). Über die Messung der Fluoreszenz kann der DNA-Gehalt während der laufenden Reaktion bestimmt werden.

Goldstandard bei der sogenannten real-time PCR sind fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide als Sonden bezeichnet, welche spezifisch innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs hybridisieren (Ranasinghe & Brown, 2005). Das Prinzip der Fluoreszenzsonden beruht dabei auf der Interaktion eines Fluorophors und einem sogenannten Quencher, welcher sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befindet. Der Quencher ist ein weiteres Fluorophor, welches von der Emission des Reportermoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) angeregt wird und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann (Ranasinghe & Brown, 2005). Durch die Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase wird die hybridisierte Sonde hydrolysiert, wodurch Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt werden(Thornton & Basu, 2011). Der Quencher blockiert das Signal des Reportermoleküls nicht mehr und das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Die Art der Signalgenerierung erlaubt Rückschlüsse auf die amplifizierte DNA-Menge und erlaubt somit die Echtzeit-Verfolgung der Nukleinsäureamplifikation (Bustin, 2000).

### Isotherme Amplifikationstechniken

Wie bereits in 1.1 erwähnt unterliegt die PCR einigen Limitationen, die sie für die POC weniger geeignet machen. Isotherme Amplifikationstechniken bieten eine Alternative für die POCT (Kang *et al.*, 2022) durch vereinfachte Handhabungen sowie die gleichbleibende Amplifikationstemperatur ermöglicht Nukleinsäuren mit einfachen Gerätschaften wie beispielsweise sogar einem Wasserbad zur vervielfältigen. Seit den 1990 Jahren wurden viele isotherme Methoden wie ....... entwickelt, welche unterschiedliche Eigenschaften kombinieren und somit ein Repertoire für verschiedenste Applikationen bildet (Zhao *et al.*, 2015). In dem folgenden Kapiteln werden ausgewählte isotherme Goldstandard Methoden für einen kleinen Überblick vorgestellt.

### Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation

Die erstmal im Jahr 2000 von Notomi (2000) entwickelte schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (engl.: *loop mediated isothermal amplification*, LAMP) ist die wohl 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 4 bis 6 Primer verwendet, wodurchurch sie einerseits sehr hohe Spezifitäten erreicht, andererseits aber hohe Anforderung an die Optimierung und das Primer-Design bestehen(Soroka *et al.*, 2021). Die LAMP-Primer werden in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer unterteilt. (Nagamine *et al.*, 2002). Die Amplifikation der LAMP ist enzymatisch mittels einer DNA abh. DNA-Polymerase realisiert, welche eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt, im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase mit seiner intrinsischen Exonukleaseaktivität (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. Dadurch kann eine Strangverlängerung des Primers durch die Polymerase stattfinden und mithilfe der Strangverdrängungsaktivität wird der ursprüngliche Doppelstrang abgelöst. Anschließend bindet der äußere Primer es findet abermals eine Strangverlängerung statt bei der der innere Primer mit der neu synthetisierten DNA verdrängt wird. Der entstandene DNA-Einzelstrang bildet durch den hinteren komplementären Teil des Primers eine Schleife (Loop) aus. Der eben beschriebene Amplifikations-Schritt auch mit den entgegen gesetzten, inneren und äußeren Primern statt, sodass eine einzelsträngige DNA entsteht, die die oben erwähnte Form einer Hantel besitzt (Parida *et al.*, 2008).

Die gebildete Hantelstruktur dient in der zweiten Phase der Amplifikation, der zyklischen Phase, als Startpunkt. Hier können nun die verschiedenen Primer gleichzeitig binden und somit die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigen. Ebenfalls dient das 3’-Ende der Hantelstruktur als weiterer Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf der Reaktion entstehen verschiedene Strukturen wie Konkatemere und blumenkohlähnliche Strukturen mit

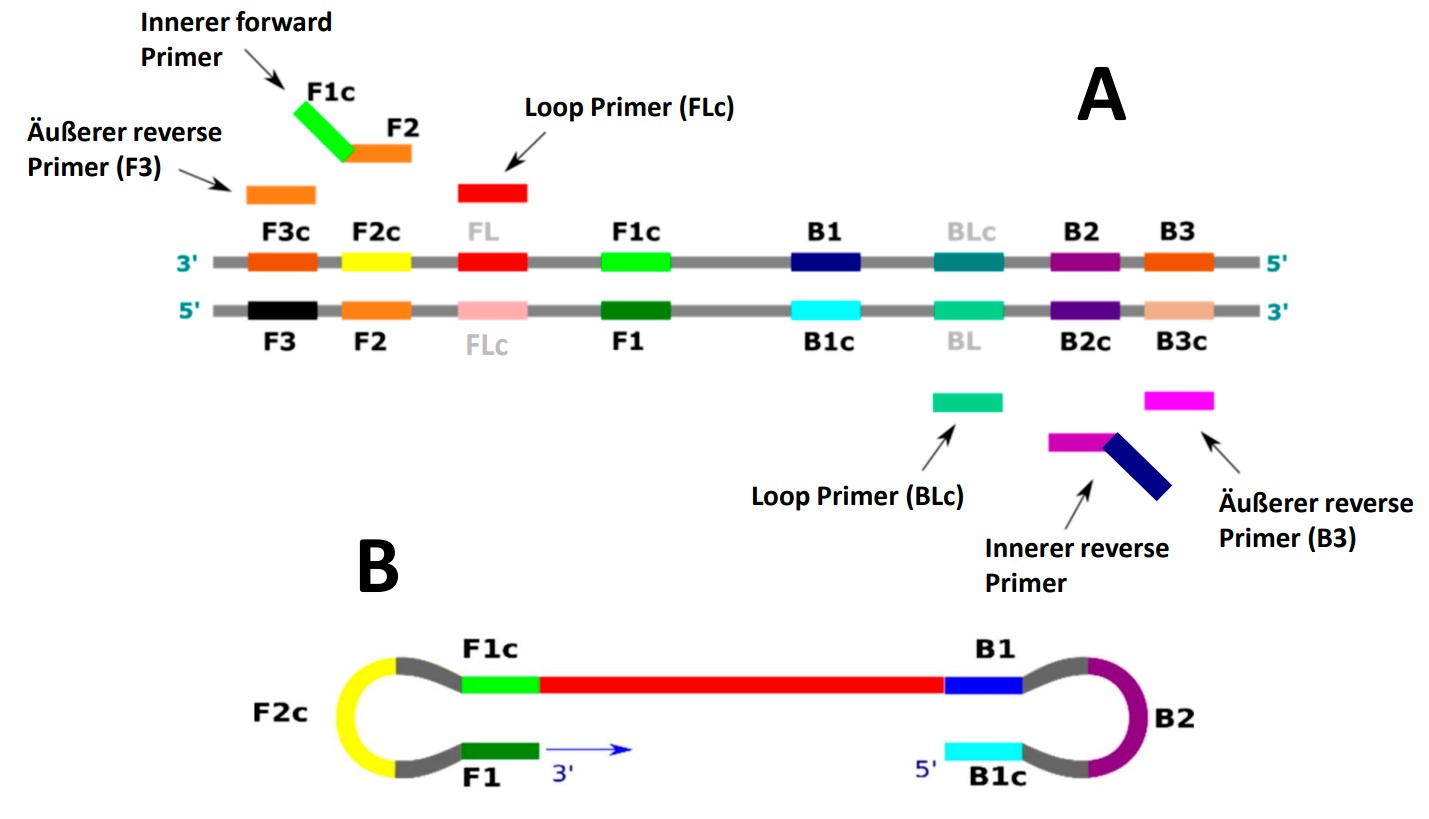


Abbildung 2: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der Schleifenvermittelten, isothermen Amplifikation (LAMP)**: **A**: Primerbindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer (F1c, …) besitzen zwei Bindungsstellen (abc + xyz) auf den komplementären Strängen der DNA. Die Äußeren Primer (…) liegen “hinter” 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)

weiteren Schleifen (Soroka *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2019). Durch das zusätzliche Einbringen der Loop Primer kann die Anzahl der Startpunkte abermals erhöht werden, was zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit führt (Nagamine *et al.*, 2002).

Die LAMP zeichnet sich durch die eine hohe DNA-Endkonzentration von 10 - 20 µg am Ende der Reaktion aus, sodass eine Auswertung mit dem bloßen Auge erfolgen kann (Parida *et al.*, 2008). Die Quantifizierbarkeit der LAMP wird gewährleistet durch die indirekte Messung der Trübung große Mengen an frei werdenden Pyrophosphat, welches Magnesium-Ionen bindet und bei hohen Konzentrationen ausfällt, zur Trübung der Reaktionsmixtur führt. (Mori *et al.*, 2001).

### Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation

Corona und Influenza RNA Viren hier NASBA ideal, da hier RNA als Anfangstemplate genutzt wird (Kia et al. 2022 Moore et al 2004 Evaluation of real-time NASBA assay for the detection of SARS-CoV-2 compared with real-time PCR Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza A

Die Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA) ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode, welche RNA als Target zum Nachweis von Nukleinsäuren nutzt (Deiman *et al.*, 2002). Deshalb eignet sich diese Methode besonders zum Nachweis von z.B. viralen Erregern mit RNA-Genomen oder findet Anwendung bei Transkriptom-Analysen. Die erstmals von Guatelli *et al.* (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzymmix bestehend aus einer reversen Transkriptase (RT) des avian myeloblastosis Virus, der RNAse H und der T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (DdRp) (Deiman *et al.*, 2002). Die NASBA unterscheidet sich von anderen Amplifikationsmethoden, bei denen ein zusätzlicher RT-Schritt vorgeschaltet werden muss, um RNA als Target nutzen zu können (Compton, 1991; Bachman, 2013; Zhang *et al.*, 2021). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer Primer an das 3´-Ende der einzelsträngigen RNA. Es hybridisieren nur 20 bp am 3´-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5´-Ende hingegen besitzt eine DdRp Promotor-Sequenz Bei konstanten 41 °Cwird dann eine cDNA 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 übrig bleibt. Ein zweiter 20 bp langer Primer, (komplementär zur DNA)hybridisiert und vervollständigt mittels RT den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche RNA-Kopien des dsDNA-Template erzeugt. Die neu entstandenen RNA-Moleküle reihen sich in den eben beschriebenen Zyklus ein, es kommt zur exponentiellen Amplifikation.

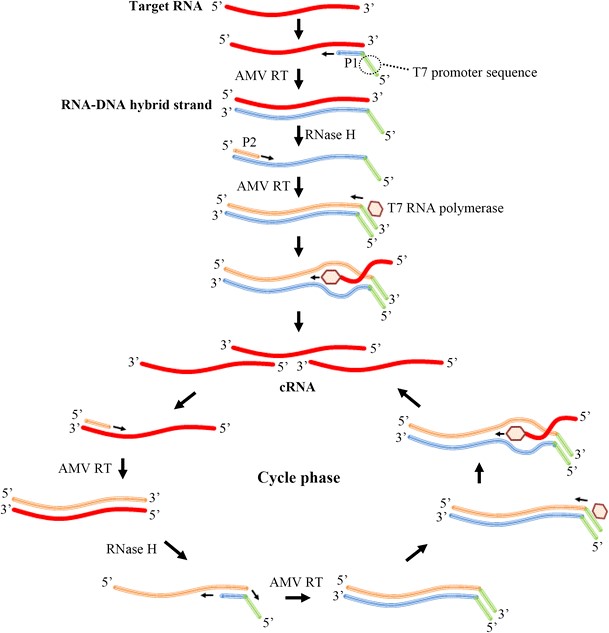


Abbildung 3: **Schematischer Reaktionsmechanismus der** Nukleinsäuresequenz-basierten Amplifikation (**NASBA)**: Die NASBA lässt sich einteilen in die 1) initialePhase und die 2) zyklische Phase. Die Template-RNA bildet durch die Hybridisation von Primern ein DNA/RNA Hybrid und weiter mittels RNAse H Verdau eine ssDNA 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.

Zur Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle HybridisierungsSonden sogenannte “Molecular-Beacon” verwendet werden (Deiman *et al.*, 2002).

### Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die von (Piepenburg *et al.*, 2006) entwickelte Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) ist ein von demReplikationszyklus der T4 Bakteriophagen angepasstes isothermes Amplifikationssystem (Li *et al.*, 2019). Der Mechanismus beruht dabei auf einem Zusammenspiel mehrerer Enzyme (recombinase, recombinase loading factor, single-stranded binding protein und DNA-Polymerase), welche die Vervielfältigung von DNA koordinieren (Li *et al.*, 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 & OSullivan, 2018). Der entstandene Recombinase-Primer-Komplex migriert entlang doppelsträngiger DNA und sucht zu den gebundenen Primern homologe Sequenzen.

8tel ansatz erwähnen

## 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 fungieren. Dafür sollte auf das Design der Primer-Sonden-Sets ein besonderes Augenmerk gelegt werden. Die Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Systeme sollte mittels *in vitro* generierter artifizieller RNA Standards auf Eignung geprüft werden und hinsichtlich der selben Parameter direkt mit dem Goldstandard (PCR-Systemen) verglichen werden. Im Detail sollen Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt der Reaktion sowie Ansatzvolumen für die RPA Assays optimiert werden. Hinsichtlich der Variation der eingesetzten Oligonukleotidkonzentration ist der Einfluss einer Primer-Asymmetrie zu analysieren. Abschließend sollte die Eignung der RT-RPAs in einem klinischen Probenhintergrund getestet werden.

Ableitner, O. (2018). [Einführung in die molekularbiologie](https://doi.org/10.1007/978-3-658-20624-6) Springer Fachmedien Wiesbaden.

[Arranz, R., Coloma, R., Chichón, F. J., Conesa, J. J., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Ortı́n, J.](https://doi.org/10.1126/science.1228172) [& Martı́n-Benito, J. (2012).](https://doi.org/10.1126/science.1228172) *[Science](https://doi.org/10.1126/science.1228172)* **[338](https://doi.org/10.1126/science.1228172)**[, 1634–1637](https://doi.org/10.1126/science.1228172).

[Bachman, J. (2013).](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6) *[Laboratory Methods in Enzymology: RNA](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6)*[. pp. 67–74. Elsevier.](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6)

[Bai, C., Zhong, Q. & Gao, G. F. (2021).](https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4) *[Science China Life Sciences](https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4)* **[65](https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4)**[, 280–294](https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4).

Biggerstaff, M., Cauchemez, S., Reed, C., Gambhir, M. & Finelli, L. (2014). *BMC Infectious Diseases* **14**, [https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-480.](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-480)

[Brendish, N. J., Schiff, H. F. & Clark, T. W. (2015).](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008) *[Journal of Infection](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008)* **[71](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008)**[, 501–510](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008).

[Bustin, S. (2000).](https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169) *[Journal of Molecular Endocrinology](https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169)* **[25](https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169)**[, 169–193](https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169).

[Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W. (2005).](https://doi.org/10.1677/jme.1.01755) *[Journal of Molecular Endocrinology](https://doi.org/10.1677/jme.1.01755)* **[34](https://doi.org/10.1677/jme.1.01755)**[, 597–601](https://doi.org/10.1677/jme.1.01755).

Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M. J., Klingele, A. J., Liles, M. R., Carrias, A., Mead, D. A. & Schoenfeld, T. W. (2014). *Frontiers in Microbiology* **5**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>.

[Charrel, R. N., Lamballerie, X. de & Raoult, D. (2007).](https://doi.org/10.1056/nejmp078013) *[New England Journal of Medicine](https://doi.org/10.1056/nejmp078013)* **[356](https://doi.org/10.1056/nejmp078013)**[, 769–771.](https://doi.org/10.1056/nejmp078013)

Chen, X., Liu, S., Goraya, M. U., Maarouf, M., Huang, S. & Chen, J.-L. (2018). *Frontiers in Immunology* **9**, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>.

[Chlanda, P. & Zimmerberg, J. (2016).](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118) *[FEBS Letters](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118)* **[590](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118)**[, 1940–1954](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118).

[Compton, J. (1991).](https://doi.org/10.1038/350091a0) *[Nature](https://doi.org/10.1038/350091a0)* **[350](https://doi.org/10.1038/350091a0)**[, 91–92](https://doi.org/10.1038/350091a0).

[Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M. & Bergeron, M. G. (2016).](https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829) *[Clinical Chemistry](https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829)* **[62](https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829)**[, 947–958](https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829).

[Deiman, B., Aarle, P. van & Sillekens, P. (2002).](https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163) *[Molecular Biotechnology](https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163)* **[20](https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163)**[, 163–180](https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163).

[Dharmapalan, D. (2020).](https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1) *[The Indian Journal of Pediatrics](https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1)* **[87](https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1)**[, 828–832](https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1).

[Firth, A. E. & Brierley, I. (2012).](https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0) *[Journal of General Virology](https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0)* **[93](https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0)**[, 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). *Scientific Reports* **7**, [https://doi.org/ 10.1038/s41598-017-12012-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12012-3).

[Gaňová, M., Zhang, H., Zhu, H., Korabečná, M. & Neužil, P. (2021).](https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155) *[Biosensors and Bioelectronics](https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155)* **[181](https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155)**[, 113155](https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155).

[Goble, J. A. & Rocafort, P. T. (2016).](https://doi.org/10.1177/0897190015587696) *[Journal of Pharmacy Practice](https://doi.org/10.1177/0897190015587696)* **[30](https://doi.org/10.1177/0897190015587696)**[, 229–237](https://doi.org/10.1177/0897190015587696).

[Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D. & Gingeras, T. R. (1990).](https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874)

*[Proceedings of the National Academy of Sciences](https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874)* **[87](https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874)**[, 1874–1878](https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874).

[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).](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176) *[PLoS Pathogens](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176)* **[9](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176)**[, e1003176](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176).

[Huang, T., Li, L., Liu, X., Chen, Q., Fang, X., Kong, J., Draz, M. S. & Cao, H. (2020).](https://doi.org/10.1039/d0ay01768j) *[Analytical Methods](https://doi.org/10.1039/d0ay01768j)* **[12](https://doi.org/10.1039/d0ay01768j)**[, 5551–5561](https://doi.org/10.1039/d0ay01768j).

[Islam, M. M. & Koirala, D. (2022).](https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338) *[Analytica Chimica Acta](https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338)* **[1209](https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338)**[, 339338](https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338).

[Iwamoto, T., Sonobe, T. & Hayashi, K. (2003).](https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003) *[Journal of Clinical Microbiology](https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003)* **[41](https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003)**[, 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.,](https://doi.org/10.1126/science.1222213)

[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).](https://doi.org/10.1126/science.1222213) *[Science](https://doi.org/10.1126/science.1222213)* **[337](https://doi.org/10.1126/science.1222213)**[, 199–204](https://doi.org/10.1126/science.1222213).

[Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V. & Ebrahimpour, S. (2021).](https://doi.org/10.1002/jmv.26990) *[Journal of Medical Virology](https://doi.org/10.1002/jmv.26990)* **[93](https://doi.org/10.1002/jmv.26990)**[, 4638–4646](https://doi.org/10.1002/jmv.26990).

[Kang, T., Lu, J., Yu, T., Long, Y. & Liu, G. (2022).](https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109) *[Biosensors and Bioelectronics](https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109)* **[206](https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109)**[, 114109](https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109).

[Kordyukova, L. V., Shtykova, E. V., Baratova, L. A., Svergun, D. I. & Batishchev, O. V. (2018).](https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089) *[Journal of Biomolecular Structure and Dynamics](https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089)* **[37](https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089)**[, 671–690.](https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089)

[Koutsakos, M., Nguyen, T. H., Barclay, W. S. & Kedzierska, K. (2016).](https://doi.org/10.2217/fmb.15.120) *[Future Microbiology](https://doi.org/10.2217/fmb.15.120)* **[11](https://doi.org/10.2217/fmb.15.120)**[, 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. & Garcı́a-Sastre, A. (2018). *Nature Reviews Disease Primers* **4**, <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>.

[Li, J., Macdonald, J. & Stetten, F. von (2019).](https://doi.org/10.1039/c8an01621f) *[The Analyst](https://doi.org/10.1039/c8an01621f)* **[144](https://doi.org/10.1039/c8an01621f)**[, 31–67](https://doi.org/10.1039/c8an01621f).

[Lobato, I. M. & OSullivan, C. K. (2018).](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015) *[TrAC Trends in Analytical Chemistry](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015)* **[98](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015)**[, 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).](https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4) *[Disaster Medicine and Public Health Preparedness](https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4)* **[3](https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4)**[, S193–S202](https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4).

[Luo, M. (2011).](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9) *[Viral Molecular Machines](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9)*[. pp. 201–221. Springer US.](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9)

[Ma, H., Bell, K. N. & Loker, R. N. (2021).](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007) *[Molecular Therapy - Methods &Amp](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007)*[;](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007) *[Clinical Development](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007)* **[20](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007)**[, 152–168](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007).

[Malek, L., Sooknanan, R. & Compton, J. (1994).](https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253) *[Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes](https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253)*[. pp. 253–260. Humana Press.](https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253)

[McCauley, J. W. & Mahy, B. W. J. (1983).](https://doi.org/10.1042/bj2110281) *[Biochemical Journal](https://doi.org/10.1042/bj2110281)* **[211](https://doi.org/10.1042/bj2110281)**[, 281–294](https://doi.org/10.1042/bj2110281).

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. (2010). [Molekulare virologie](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5) Spektrum Akademischer Verlag.

[Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T. (2001).](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921) *[Biochemical and Biophysical Research Communications](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921)* **[289](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921)**[, 150–154](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921).

Mülhardt, C. (2009). [Der experimentator: Molekularbiologie/ genomics](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6) Spektrum Akademischer Verlag.

[Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).](https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032) *[Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology](https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032)* **[51](https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032)**[, 263–273](https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032).

[Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. (2013).](https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12) *[Journal of Virology](https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12)* **[87](https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12)**[, 2455– 2462.](https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12)

[Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. (2002).](https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415) *[Molecular and Cellular Probes](https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415)* **[16](https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415)**[, 223–229](https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415).

[Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H. & Barman, S. (2009).](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010) *[Virus Research](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010)* **[143](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010)**[, 147–161](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010).

[Njouom, R., Monamele, G. C., Ermetal, B., Tchatchouang, S., Moyo-Tetang, S., McCauley, J. W. & Daniels, R. S. (2019).](https://doi.org/10.3201/eid2503.181213) *[Emerging Infectious Diseases](https://doi.org/10.3201/eid2503.181213)* **[25](https://doi.org/10.3201/eid2503.181213)**[, 607–609](https://doi.org/10.3201/eid2503.181213).

[Notomi, T. (2000).](https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63) *[Nucleic Acids Research](https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63)* **[28](https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63)**[, 63e–63](https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63).

[Omran, Q. Q., Fedorova, O., Liu, T. & Pyle, A. M. (2022).](https://doi.org/10.1093/nar/gkac242) *[Nucleic Acids Research](https://doi.org/10.1093/nar/gkac242)* **[50](https://doi.org/10.1093/nar/gkac242)**[, e74–e74](https://doi.org/10.1093/nar/gkac242).

[Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L. & Morita, K. (2008).](https://doi.org/10.1002/rmv.593) *[Reviews in Medical Virology](https://doi.org/10.1002/rmv.593)* **[18](https://doi.org/10.1002/rmv.593)**[, 407–421](https://doi.org/10.1002/rmv.593).

[Park, J.-W. (2022).](https://doi.org/10.3390/bios12100857) *[Biosensors](https://doi.org/10.3390/bios12100857)* **[12](https://doi.org/10.3390/bios12100857)**[, 857](https://doi.org/10.3390/bios12100857).

[Paules, C. & Subbarao, K. (2017).](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30129-0) *[The Lancet](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30129-0)* **[390](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30129-0)**[, 697–708](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30129-0).

[Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. & Armes, N. A. (2006).](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204) *[PLoS Biology](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204)* **[4](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204)**[, e204](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204).

[Pumford, E. A., Lu, J., Spaczai, I., Prasetyo, M. E., Zheng, E. M., Zhang, H. & Kamei, D. T. (2020).](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674)

*[Biosensors and Bioelectronics](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674)* **[170](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674)**[, 112674](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674).

[Ranasinghe, R. T. & Brown, T. (2005).](https://doi.org/10.1039/b509522k) *[Chemical Communications](https://doi.org/10.1039/b509522k)* [5487](https://doi.org/10.1039/b509522k).

[RKI (2019).](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile) *[Robert-Koch-Institut](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile)*.

[Sanjuán, R. & Domingo-Calap, P. (2016).](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6) *[Cellular and Molecular Life Sciences](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6)* **[73](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6)**[, 4433–4448](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6).

[Selman, M., Dankar, S. K., Forbes, N. E., Jia, J.-J. & Brown, E. G. (2012).](https://doi.org/10.1038/emi.2012.38) *[Emerging Microbes &Amp](https://doi.org/10.1038/emi.2012.38)*[;](https://doi.org/10.1038/emi.2012.38) *[Infections](https://doi.org/10.1038/emi.2012.38)* **[1](https://doi.org/10.1038/emi.2012.38)**[, 1–10](https://doi.org/10.1038/emi.2012.38).

[Sharma, A., Balda, S., Apreja, M., Kataria, K., Capalash, N. & Sharma, P. (2021).](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016) *[International Journal of Biological Macromolecules](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016)* **[193](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016)**[, 1835–1844](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016).

[Silva, S. J. R. da, Pardee, K. & Pena, L. (2019).](https://doi.org/10.3390/v12010019) *[Viruses](https://doi.org/10.3390/v12010019)* **[12](https://doi.org/10.3390/v12010019)**[, 19](https://doi.org/10.3390/v12010019).

[Soroka, M., Wasowicz, B. & Rymaszewska, A. (2021).](https://doi.org/10.3390/cells10081931) *[Cells](https://doi.org/10.3390/cells10081931)* **[10](https://doi.org/10.3390/cells10081931)**[, 1931](https://doi.org/10.3390/cells10081931).

[Sreejith, K. R., Ooi, C. H., Jin, J., Dao, D. V. & Nguyen, N.-T. (2018).](https://doi.org/10.1039/c8lc00990b) *[Lab on a Chip](https://doi.org/10.1039/c8lc00990b)* **[18](https://doi.org/10.1039/c8lc00990b)**[, 3717–3732](https://doi.org/10.1039/c8lc00990b).

[Thornton, B. & Basu, C. (2011).](https://doi.org/10.1002/bmb.20461) *[Biochemistry and Molecular Biology Education](https://doi.org/10.1002/bmb.20461)* **[39](https://doi.org/10.1002/bmb.20461)**[, 145–154](https://doi.org/10.1002/bmb.20461).

[To, J. & Torres, J. (2019).](https://doi.org/10.3390/cells8070654) *[Cells](https://doi.org/10.3390/cells8070654)* **[8](https://doi.org/10.3390/cells8070654)**[, 654](https://doi.org/10.3390/cells8070654).

[Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. & Notomi, T. (2008).](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57) *[Nature Protocols](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57)* **[3](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57)**[, 877–882](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57).

[Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E. & Monto, A. S. (2022).](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5) *[The Lancet](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5)* **[400](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5)**[, 693–706](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5). [Valera, E., Jankelow, A., Lim, J., Kindratenko, V., Ganguli, A., White, K., Kumar, J. & Bashir, R. (2021).](https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981)

*[ACS Nano](https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981)* **[15](https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981)**[, 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).](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015)

*[Virus Research](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015)* **[185](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015)**[, 53–63](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015).

[Velthuis, A. J. W. te & Fodor, E. (2016).](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87) *[Nature Reviews Microbiology](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87)* **[14](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87)**[, 479–493](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87).

[Wise, H. M., Hutchinson, E. C., Jagger, B. W., Stuart, A. D., Kang, Z. H., Robb, N., Schwartzman, L. M., Kash, J. C., Fodor, E., Firth, A. E., Gog, J. R., Taubenberger, J. K. & Digard, P. (2012).](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998) *[PLoS Pathogens](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998)* **[8](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998)**[, e1002998](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998).

[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).](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114) *[Journal of Investigative Dermatology](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114)* **[103](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114)**[, 34–41](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114).

[Yoo, S. J., Kwon, T. & Lyoo, Y. S. (2018).](https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1) *[Clinical and Experimental Vaccine Research](https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1)* **[7](https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1)**[,](https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1) [1](https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1).

[Zhang, W. S., Pan, J., Li, F., Zhu, M., Xu, M., Zhu, H., Yu, Y. & Su, G. (2021).](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013) *[Analytical Chemistry](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013)* **[93](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013)**[, 4126–4133](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013).

[Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L. & Fan, C. (2015).](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428) *[Chemical Reviews](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428)* **[115](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428)**[, 12491–12545](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428).