

Inhaltsverzeichnis

1	Ergebnisse	2
1.1	Entwicklung und Optimierung der Influenza RT-RPA	2
1.1.1	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA	2
1.1.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer	2
1.1.3	Optimierung der InfB RPA	4
1.1.4	Einfluss der Primerassymetrie auf die RT-RPA	6
1.1.5	Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA	7
1.2	Influenza A	9
1.2.1	Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA	9
1.2.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer	9
1.2.3	Optimierung der Infb-RPA	11
1.2.4	Primerassymetrie	11
1.2.5	Sensitivitätsanalysen und Vergleich	11
1.2.6	Spezifität	11
1.3	Influenza A	11
1.3.1	Entwicklung der InfA-RPA Primer	11
1.3.2	Optimierung der InfbARPA	11
1.3.3	Sensitivitätsanalysen und Vergleich	11
1.3.4	Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA	11
1.3.5	Spezifitätstest	12

1 Ergebnisse

Ziel war es ein RT-RPA-System zur Detektion von Influenza A und B Viren zu Entwickeln und Optimieren. Dazu wurden Primer- und Sonden-Kombinationen designt und diese in einem Screeningverfahren getestet. Anhand eines Primer-Sonden-Sets erfolgte die Optimierung in den Parametern: Reaktionsvolumen, Reaktionstemperatur und Mischzeitpunkt. Zusätzlich wurde der Effekt einer Primerassymetrie Anhand der Influenza B RT-RPA untersucht und für beide RT-RPA-Systeme optimiert. Die optimierten RT-RPA-Systeme wurden anschließend auf Sensitivität und Spezifität getestet sowie mit einem entsprechenden RT-PCR verglichen.

1.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza RT-RPA

1.1.1 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA

Für den Vergleich zwischen der RT-PCR und der RT-RPA sowie der variierenden Parameter ist es nötig, standardisierte Virus-RNA mit einer definierten Konzentration herzustellen. Dabei diente ein artifizielles DNA-Plasmid mit der inserierten Virus-Sequenz als Ausgangsmaterial. Dieses wurde in *E. coli* transformiert, durch Kultivierung vermehrt und anschließend mittels verschiedener Methoden zur Virus-RNA transkribiert.

zum Beginn der Arbeit war bereits ein mit dem Influenza B Plasmid (Plasmidkarte siehe Anhang ??) transformierter *e. coli* Stamm vorhanden. Dieser wurde kultiviert und anschließend das Influenza B Plasmid extrahiert (Kapitel ??). Durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung (Kapitel ??) der Influenza B Virussequenz auf dem extrahierten DNA-Plasmid konnten Sequenzfehler ausgeschlossen werden und die korrekte Virus-Sequenz bestätigt werden. In Vorbereitung für die *in Vitro* Transkription wurde das Plasmid durch einen Restriktionsverdau linearisiert und über ein Agarose-Gel überprüft (Kapitel ??). Das Kontrollgel (siehe Abbildung 1A) weist zwei unterschiedlich große DNA-Banden auf. Das linearisierte Plasmid in Spur 2 zeigt wie erwartet eine Bande bei ~3400 bp und das unverdaute Kontrollplasmid in Spur 3 eine Bande bei weit über 4000 bp. Daraus lässt sich schließen, dass die Linearisierung durch den Restriktionsverdau erfolgreich war. Das linearisierte Plasmid wurde von Puffer und Enzymrückständen befreit (Kapitel ??) und über eine *in vitro* Transkription mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7-Promotors (Kapitel ??) in RNA überführt. Die synthetisierte virale RNA wurde im letzten Schritt mit dem RiboGreen Assay (Kapitel ??) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 1B gezeigt. Es ergab sich eine Geradengleichung von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Korrelationskoeffizient R von 0,99. Mithilfe der Geradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von $476,0 \pm 7,8$ ng/ml und somit eine Kopienanzahl von $2,2 \cdot 10^8$ RNA-Kopien/μl berechnet werden.

1.1.2 Entwicklung der InfB-RPA Primer

Für die Influenza B RT-RPA wurden mithilfe der Software Primer3 insgesamt 9 verschiedene Primer und 2 Sonden gefunden. Die Sequenzen sind in Tabelle 1 mit entsprechenden Modifikationen und 3'-Position auf der Virus-Sequenz gezeigt. Daraus ergeben sich insgesamt 10 Primer-Sonden-Kombinationen. Davon bestehen 2 Kombinationen aus Sonde 1.1 mit Forward 1 und Reverse 1.1 und Reverse 1.2. Die restlichen 8 Kombinationen setzen sich aus Sonde 3.1, Forward 1 oder Forward 2 und Reverse 3.3 - 3.15 zusammen.

Die entwickelten Primer-Sonden-Kombinationen wurden in einem Screening Verfahren mittels RT-RPA in einer Dreifachbestimmung auf Amplifikation getestet (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich durch einen steileren Anstieg und höhere Fluoreszenzwerte im Vergleich zu den Kombinationen mit Sonde 3.1 (grau) aus. Des Weiteren lässt sich bei

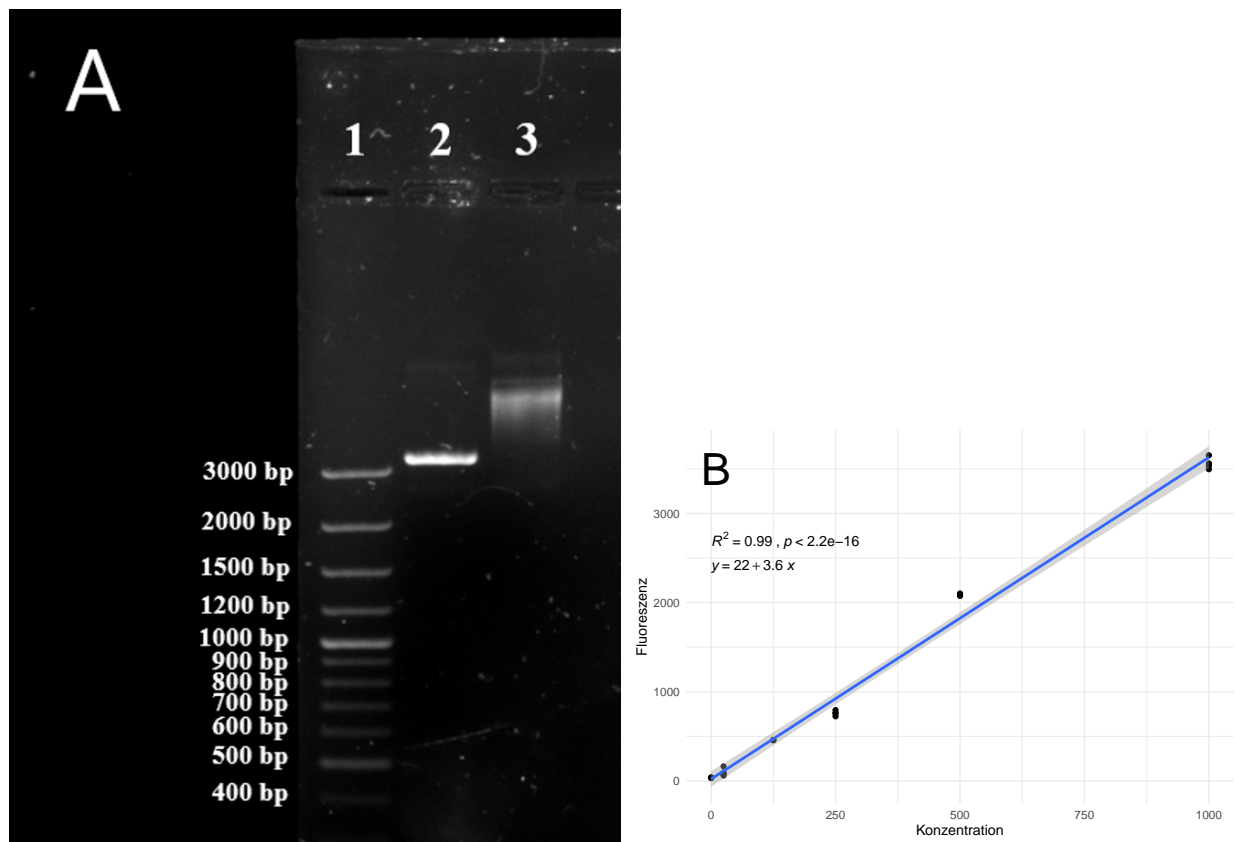


Abbildung 1: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdaulichem Plasmid (2), unverdaulichem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei ca. 3400 bp und somit unter dem mitgeführten ungeschnittenem Kontrollplasmid. Bild ist digital bearbeitet. **B:** Kalibrationsgerade des Ribogreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit n=4 durchgeführt.

Tabelle 1: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA

Name	Sequenz (5'->3')	3'-Position	Modifikation
Sonde 3.1	GTTCCGTTTGACAATAAAAAGGGATATGCG 12 A 3 TGTATTGTCCYTGAGAG	559 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 1.1	GCTAAACTTGTGCTACTGATGATCTTACAG 12 G 3 AGGATGAAGAAGATGG	707 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGAAGGCTT	654 bp	/
forward 3	GGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGGGAA	509 bp	/
forward 4	GAGACATGAACAACAGAGATGCAAGGCAAA	472 bp	/
reverse 1.1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGARTTG	720 bp	/
reverse 1.2	TGAATGTCCTTCATTAAGACGCTCGAAGAG	727 bp	/
reverse 3.3	ATTGGGGTGTGTTGAGGAATGTTCCGTTTAC	565 bp	/
reverse 3.6	ATCCATTGGGGTGTGTTGAGGAATGTTCCGT	569 bp	/
reverse 3.10	CTTGATCCATTGGGGTGTGTTGAGGAATGT	574 bp	/
reverse 3.15	AGTTGATAAGGACTTGTATCCATTGGGGTG	586 bp	/

* Y=C oder T; 1: Repoterfluorophor; 2: a-basische Seite; 3: Quencher ** Modifiziert wie in Kapitel ?? beschrieben.

der Kombination mit Reverse 1.1 (schwarz, durchgängig) ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei der Kombination mit Reverse 1.2 (schwarz, gestrichelt) beobachten. Die Mittelwerte der TT-Werte für die jeweiligen Kombinationen liegen bei $3,33 \pm 0,07$ (Reverse 1.1) und $4,27 \pm 0,07$ (Reverse 1.2). Die Kombination mit Reverse 1.2 erreicht im Verlauf höhere Fluoreszenzintensitäten, jedoch deutet ein zeitigerer Anstieg, sprich niedrigere TT-Werte, auf eine schnellere Amplifikation. Aus diesem Grund wurde die Kombination mit Reverse 1.1 zusammen und Forward 1 und Sonde 1.1 (schwarz,durchgezogen) als bestmöglich eingestuft und für alle nachfolgenden Versuche **Ergebnisse** in diesem Kapitel verwendet.

1.1.3 Optimierung der InfB RPA

Verringerung des Reaktionsvolumen (8tel Ansatz)

Für die Verringerung des Reaktionsvolmens, wurden das in 1.1.2 entwickelte Primer-Sonden-Set auf den 8-tel Ansatz überführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Messung zusammen mit einer Referenz (50 µl Ansatz) sind in Abbildung 3 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die 8tel RPA (schwarz) im Vergleich zu der 50 µl RPA (grau) im Verlauf der Reaktion wie erwartet, an maximaler Intensität verliert. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Anstiegszeit zwischen den beiden Reaktionsvolumen festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte liegen bei $3,36 \pm 0,01$ (50 µl RPA) und $3,47 \pm 0,14$ (8-tel RPA). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

Optimierung der Reaktionstemperatur

Die optimierung der Reaktionstemperatur wurde wie in ?? beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten der Messungen bei verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 4A gezeigt. Die entwickelte Influenza B RPA zeigt bei 38 °C (hellgrau) einen signifikant späteren Anstieg und somit höhere TT-Werte, als bei 40 °C (schwarz) oder 42 °C (grau). Zwischen den Messungen bei 40 °C und 42 °C konnte hingegen keine signifikante Änderung des TT-Wertes festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte für die jeweiligen Temperaturen liegen bei $5,26 \pm 0,06$ (38 °C), $3,57 \pm 0,20$ (40 °C) und $3,63 \pm 0,13$ (42 °C). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt. Zusätzlich besitzt die Reaktion bei 40 °C im Durchschnitt die höchste maximale Fluoreszenzintensity am Ende der Messung. Aus diesen Gründen wurde eine Reaktionstemperatur von 40 °C als Optimal festgelegt. Des Weiteren ist eine Abnahme der Fluoreszenz im späteren Verlauf der Reaktion (~13 min) bei 42 °C zu beobachten. Bei 40 °C ist ebenfalls bei 4/7 Reaktionen

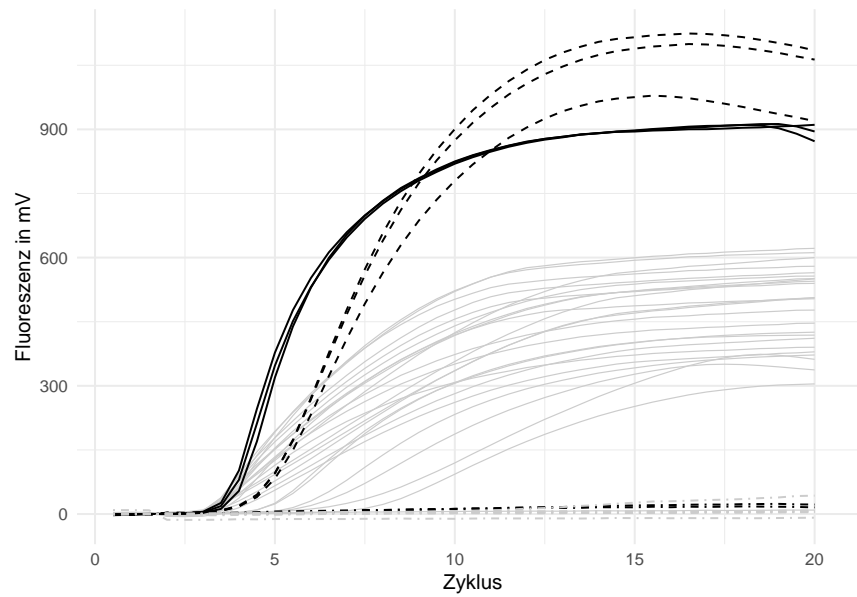


Abbildung 2: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings (n=3) für die in Tabelle 1 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.2 ist in **schwarz** (- - -) und die Kombination mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.1 in **schwarz** (—) dargestellt. Alle Negativkontrollen sind mit (· - ·) gekennzeichnet.

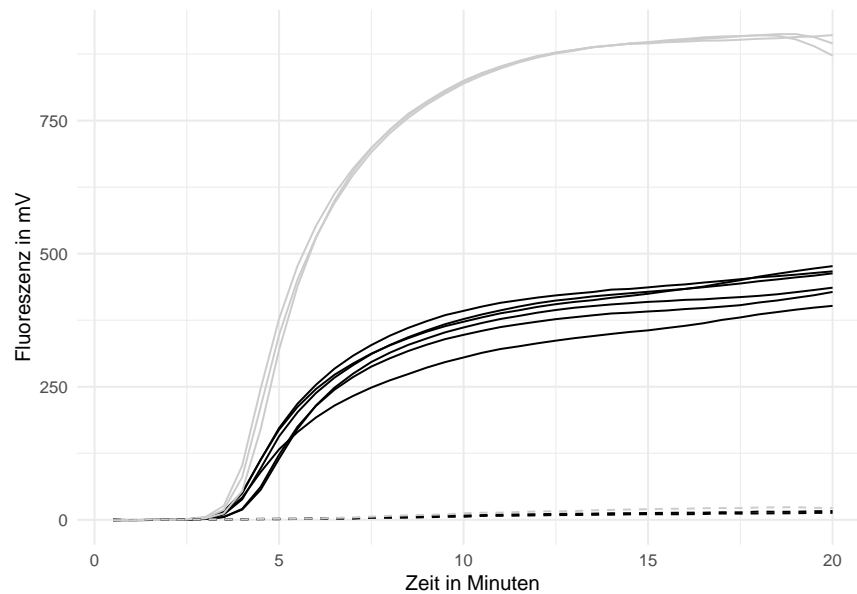


Abbildung 3: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 8tel-Ansatz (**schwarz**) in n=6 mit dem in 1.1.2 entwickeltem Primer-Sonden-Set. Als Referenz wurde der 50 µl Ansatz (**grau**) mit dem gleichem Primer-Sonden-Set in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

eine Fluoreszenzabnahme zu sehen, jedoch später bei ~16 min. Dieses Phänomen wird in der weiteren Arbeit als “Ditching” bezeichnet.

Einführen einer Reverse-Primer Assymetrie

Das Einführen einer Primer-Assymetrie sowie die Optimierung dieser wurde anhand des Reverse Primers wie in ?? beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten der variierenden Primerkonzentrationen sind in Abbildung 4B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine erhöhte reverse Primer-Konzentration mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der Referenz (keine Veränderte Reverse Primer-Konzentration, hellgrau) einhergeht. Eine signifikante Veränderung des TT-Wertes konnte nicht beobachtet werden. Die rechnerischen Daten des TT-Wert vergleichs (siehe ??) sowie die Mittelwerte der TT-Werte sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt. Weiterhin lässt sich erkennen, dass bei einer doppelten Reverse Primer-Konzentration (grau) der Ditching-Effekt nach ~12 min bei 4/6 Reaktionen einsetzt. Um diesen Effekt während der Messung zu vermeiden wurde eine reverse Primer-Konzentration von 1,5X (schwarz) als optimal festgelegt.

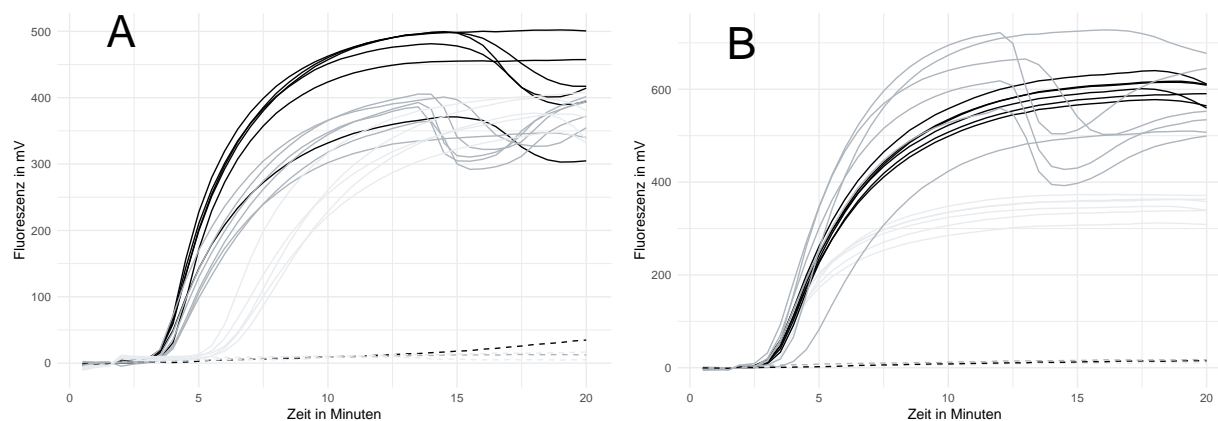


Abbildung 4: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 8tel-Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (schwarz) und 42 °C (grau). Messung in n=6 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerassymetrie mit 1,5x erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2X erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=6 pro Konzentration. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Mischzeit

1.1.4 Einfluss der Primerassymetrie auf die RT-RPA

Wie in 1.1.3 gezeigt wurde, führt eine asymmetrische Erhöhung des Reverse Primers zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Um den Einfluss der generellen Primer-Konzentration auf die RPA zu untersuchen wurde eine RT-RPA mit doppelter forward und reverse Primer-Konzentration (siehe ??) durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 5A gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine generelle Erhöhung von Forward und Reverse Primer (grau) wieder zu einer niedrigeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer asymmetrischen Reverse Primer-Konzentration (schwarz) führt. Eine signifikante Veränderung der TT-Werte konnte nicht ermittelt werden. So liegen die TT-Werte für die Messung mit 2X-Reverse Primer bei $3,40 \pm 0,14$ und bei der Messung mit doppelter Primer-Konzentration bei $3,48 \pm 0,21$. Die markierte Amplifikationskurve (roter Pfeil) konnte als Ausreißer identifiziert werden und wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt. Die

rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

Eine Vermutung war, dass die Hybridisation der Sonde an den Sense oder Anti-Sense Strang der DNA in Verbindung mit der Primer-Assymetrie und der daraus resultierenden erhöhten Fluoreszenzintensität steht. Um dies zu überprüfen wurde eine erneute Messreihe mit einer am entgegengesetzten Strang hybridisierenden Sonde durchgeführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Messungen sind in Abbildung 5B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass hier die erhöhte Reverse Primer-Konzentration (hellgrau) die niedrigste Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (grau) und der erhöhten Forward Primer-Konzentration (schwarz) zeigt. Die assymetrisch erhöhte Forward Primer-Konzentration zeigt hingegen die höchsten Fluoreszenzwerte und dementsprechend die beste Signalgenerierung. Des Weiteren besitzt die erhöhte Forward Primer-Konzentration signifikant niedrigere TT-Werte mit $3,25 \pm 0,05$ als die Referenz ($3,63 \pm 0,19$) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration ($3,76 \pm 0,34$).

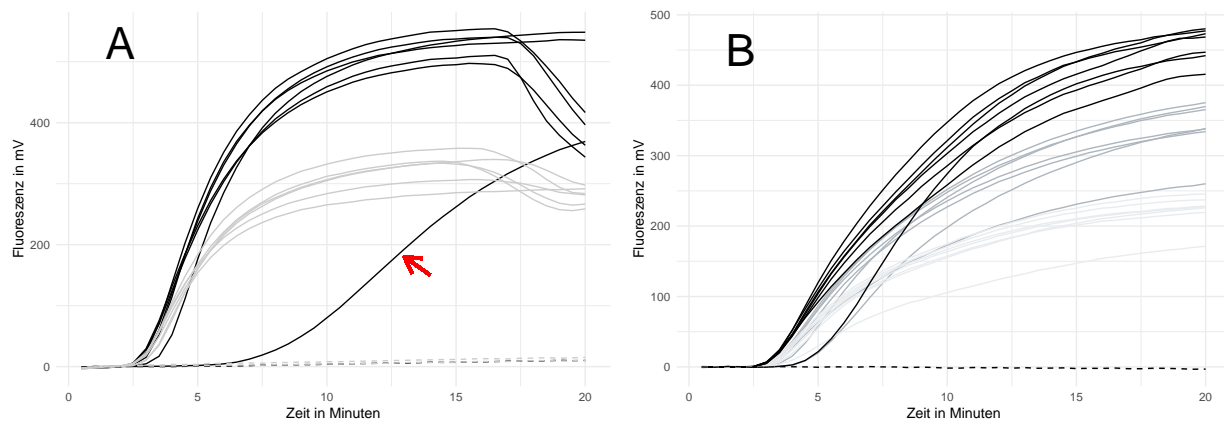


Abbildung 5: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 1 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in grau dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.2 ist in schwarz (---) und die Kombination mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.1 in schwarz (—) dargestellt. Alle Negativkontrollen sind mit (· - ·) gekennzeichnet.

1.1.5 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA

Die Ermittlung der Sensitivität für die Influenza B RT-RPA erfolgte mit den im Kapitel 1.1.3 ermittelten optimalen Reaktionsparametern nach beschriebener Methode (siehe @ref(sensitivität)). Die Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung sowie das mithilfe der Probit-Analyse (siehe ??) ermittelte Detektionslimit sind in Abbildung 6 gezeigt. Für die Influenza B RT-RPA konnte berechnet werden, dass das System mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit 14,6 Virus RNA-Kopien detektieren kann. Des Weiteren konnte eine Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit mit einem $R^2 = 0,92$ und einer Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$ ermittelt werden. Die über den Boxplot-Test (siehe ??) ermittelten Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 6A) wurden innerhalb der Kalibriergerade nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert ist »0,05 was einen signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Zusätzlich wurde die Sensitivität für den 50 µl Ansatz der Influenza B RT-RPA mit den gleichen Reaktionsparametern ermittelt und ein Vergleich zu dem 8tel-Ansatz gezogen. Die Messung erfolgte nach der beschriebenen Methode (siehe @ref(sensitivität)). Es konnte ein Detektionslimit von 31,6 Kopien ermittelt werden. Dementsprechend konnte für die RT-RPA im 8tel-Ansatz eine Verbesserung des Detektionslimits um 46 % nachgewiesen wer-

den. Die Fluoreszenzdaten sowie die Probit-Analyse des 50 µl Ansatzes sind im Anhang unter Abbildung @ref(fig:...) gezeigt.

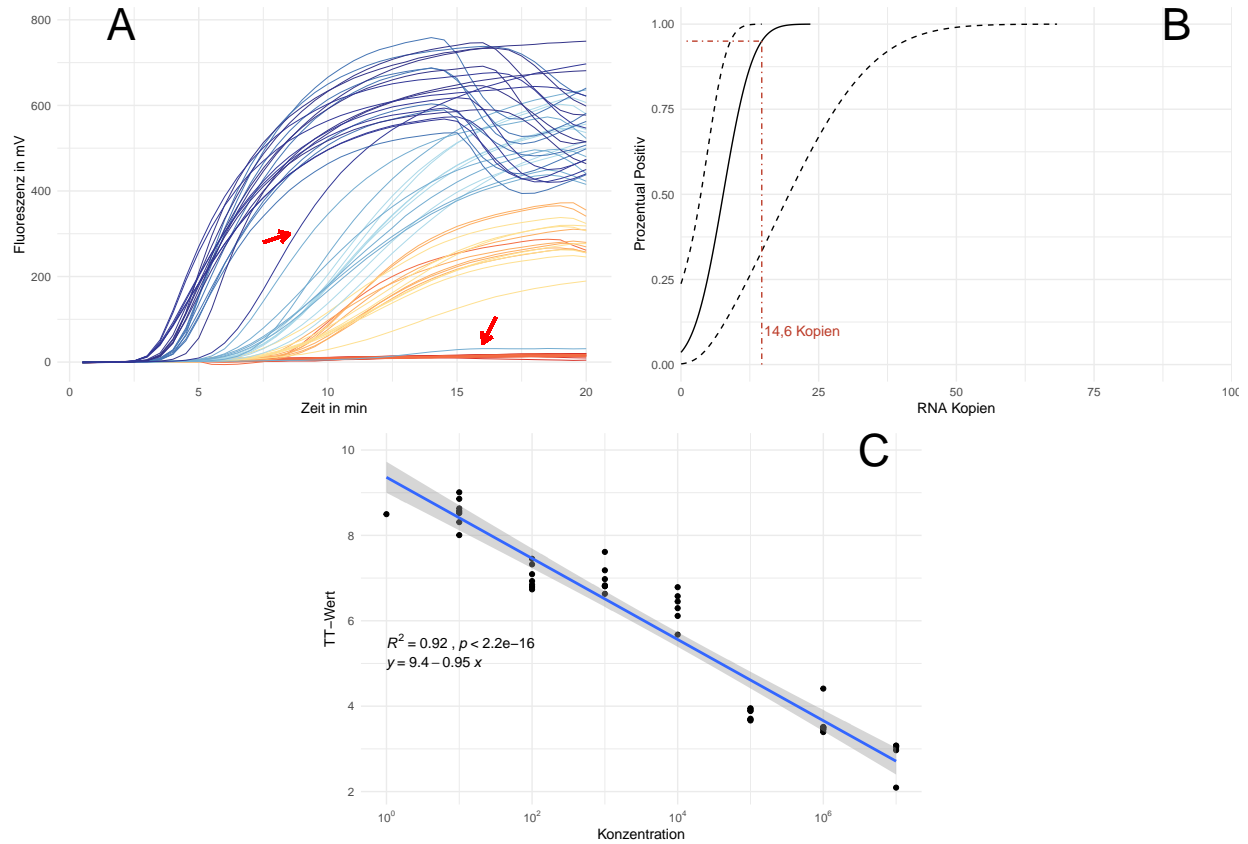


Abbildung 6: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA:** **A:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ und 10⁰ RNA-Kopien pro Messung sowie **Negativkontrollen**. Jede Verdünnung wurde mit n=7 gemessen. Ausreißer bei 10⁷ und 10⁴ (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. **B:** Probit-Analyse der Amplifikationsdaten. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, die Probit-Regression der RT-RPA. Die schwarzen gestrichelten Linien beschreiben das obere und untere Konfidenzintervall der Probit-Regression. Die rot gestrichelte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind. **C:** Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte der Ausreißer sowie von negativen Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht gezeigt.

1.2 Influenza A

1.2.1 Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA

Für die Durchführung und den Vergleich von verschiedenen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, ist es nötig, standardisierte Virus-RNA mit einer definierten Konzentration herzustellen. Dabei dient ein DNA-Plasmid mit der entsprechenden Virus-Sequenz als Ausgangsmaterial. Dieses wurde in *E. coli* transformiert, durch Kultivierung vermehrt und anschließend mittels verschiedener Methoden zur gewünschten Virus-RNA transkribiert.

Um die Gruppe der Influenza A Viren ausreichend abdecken zu können wurden RNA-Standards von den aktuell vorherrschenden Subtypen H1N1 und H3N2 erstellt. Alle nachfolgenden Schritte dieses Kapitels wurden für beide RNA-Standards gleich durchgeführt.

Für die Erstellung der Standard-RNA's wurden im ersten Schritt die entsprechenden Virus DNA-Sequenzen als Teil eines DNA-Plasmids nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) in *E. coli* transformiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien, wie in Kapitel ?? angegeben kultiviert und die Plasmid-DNA extrahiert. Durch eine anschließende Sequenzierung konnten Sequenzfehler durch Mutationen ausgeschlossen und die Integrität der Sequenz bestätigt werden. Im nächsten Schritt wurden die extrahierte Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau linearisiert und somit für die *in vitro* Transkription vorbereitet. Der Restriktionsverdau wurde wie in Kapitel ?? angegeben durchgeführt. Die zur Überprüfung der erfolgreichen Linearisierung durchgeführten Agarose-Gele sind in Abbildung 7 gezeigt. Alle verdauten Plasmide zeigen eine DNA-Bande bei ~ 3300 bp. Die ungeschnittenen mitgeführten Kontrollplasmide aus der vorherigen Plasmid-DNA Isolation weisen hingegen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf. Eine Ausnahme bildet hierbei das Kontrollplasmid auf der Gelspur 5, da keine DNA-Bande sichtbar ist.

Zur weiteren Vorbereitung der linearisierten Plasmid-DNA für die *in vitro* Transkription und als Nachbehandlung von den Restriktionsverdau wurden die verdauten Plasmide nach der in Kapitel ?? beschriebenen Methode von Enzym- und Pufferrückständen entfernt. Die gereinigte DNA wurde im nächsten Schritt mithilfe der in Kapitel ?? angegebenen Methode zu RNA reverse Transkribiert und die Ausgangs-DNA beseitigt. In der nachfolgenden Aufreinigung wurde die Nukleinsäure abermals von störenden Puffer und Enzymrückständen befreit. Die reine, artifiziell erstellte virale RNA wurde im letzten Schritt nach mithilfe des Ribogreen-Assays quantifiziert (siehe Methode unter Kapitel ??). Dabei wurden jeweils die RNA-Standards H3N2 (2005) und H1N1 (2020) innerhalb einer Messung und die Standards H1N1 (2004) und H3N2 (2020) in einem separaten Assay quantifiziert. Die Kalibriergeraden der Assays sind in Abbildung reffig:infAverdau gezeigt. Beide Kalibriergeraden besitzen einen Korrelationskoeffizienten (R) von 1 und einen p-Wert von » 0,05. Daraus lässt sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenz erkennen. Mithilfe der angegebenen Geradengleichungen von $y = -190 + 3,8x$ und $y = -190 + 3,8x$ für die jeweiligen Messungen konnten die Konzentrationen der gemessenen viralen RNA-Standards berechnet werden. Die Mittelwerte von jeweils 5 Messungen pro Standard sind zusammen mit den daraus resultierenden Kopie-Zahlen der einzelnen RNA-Moleküle/µl in Tabelle ?? angegeben.

1.2.2 Entwicklung der InfB-RPA Primer

- Tabelle mit allen getesteten Primern und Sonden + auf die Primer und Sonden in Methoden verweisen?
 - oder die Sonden aus dem Methoden Teil mir rein zu nehmen und da raus nehmen
- Graphen der Tests (grau und die guten farbig)

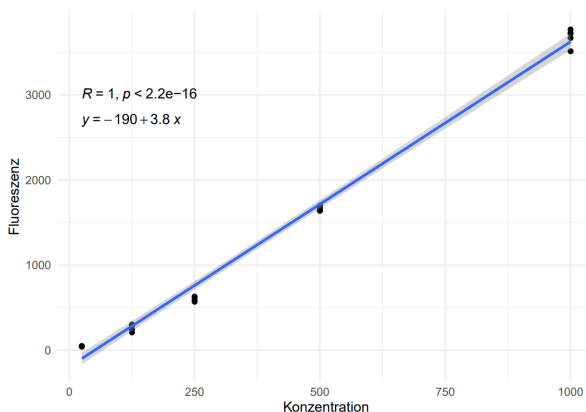
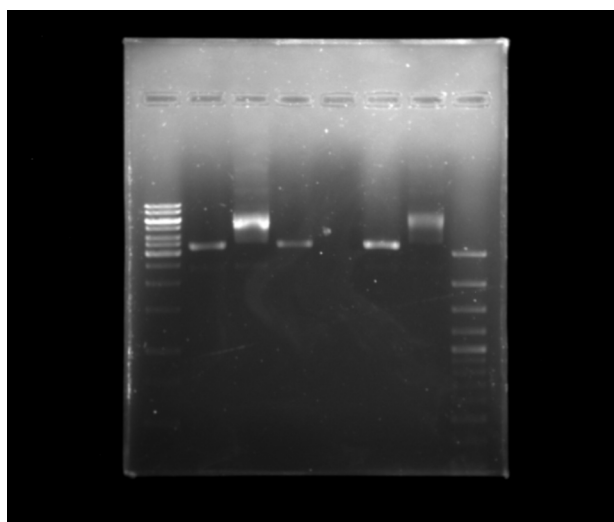


Abbildung 7: **Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdaus der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdautes Plasmid des 2005 H3N2 Standards (2) mit unverdaute Kontrolle (3), verdautes Plasmid des aktuellem H1N1 Standards (4) mit unverdaute Kontrolle (5) sowie verdautes Plasmid des aktuellem H3N2 Standard (6) mit unverdautes Kontrollplasmid (7), sowie mitgeführte 100 bp plus DNA-Leiter (8) und 1000 bp DNA-Leiter (1). DNA-Banden des verdautes Plasmid des 2004 H1N1 Standards (2) mit unverdautes Kontrollplasmid (3) und mitgeführter 100 bp plus DNA-Leiter (1). Bilder digital bearbeitet. **B, C** Kalibrationsgeraden des Ribogreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit n=5 durchgeführt.

- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
 - wenn sensitivität dann auch Spezifität

1.2.3 Optimierung der Infb-RPA

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt

1.2.4 Primerassymetrie

- soll ich hier dann noch das Experiment zum bestätigen der Assymetrie mit rein nehmen? oder extra Punkt

1.2.5 Sensitisanalysen und Verlgeich

- Sensitivität mit allen Optimirungsparametern 8tel Ansatz gegenüberstellen
 - weil literatur sagt, dass dadurch eine Erhöhung der Sensitivität erhalten werden kann
- Sensitivität PCR und RPA gegenüberstellen

1.2.6 Spezifität

- Spezifität

1.3 Influenza A

1.3.1 Entwicklung der InfA-RPA Primer

- Tabelle mit allen getesteten Primern und Sonden + auf die Primer und sonden in Methoden verweisen?
 - oder die Sonden aus dem Methoden teil mir rein zu nehmen und da raus nehmen
- Graphen der Tests (grau und die guten farbig)
- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
 - wenn sensitivität dann auch Spezifität

1.3.2 Optimierung der InfbARPA

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt
- Primerassymetrie

1.3.3 Sensitivitätsanalysen und Vergleich

- Sensitivitätstest und vergleich mit PCR

1.3.4 Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA

- Test mit neuer Sonde
- Sensitivitätsvergleich

1.3.5 Spezifitätstest