

Inhaltsverzeichnis

1	Diskussion	2
1.1	Einfluss von Basenfehlpaarung in Primern und Sonden auf die RT-RPA	2
1.2	Mischzeitpunkt und Sensitivität in der RT-RPA mit reduzierten Reaktionsvolumen	5
1.3	Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays	6
1.3.1	Influenza B RT-RPA	6
1.4	Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA	8
1.5	Einfluss der Exo-Sondenmodifikation auf die RT-RPA	10
1.6	Das Ditching innerhalb der RT-RPA	12
1.7	Automatische Auswertung der Amplifikationen mittels Statistik	13
2	Zusammenfassung und Ausblick	13

1 Diskussion

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

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

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

1.1 Einfluss von Basenfehlpaarung in Primern und Sonden auf die RT-RPA

Zur Differenzierung zwischen verschiedenen Influenza B Virus-Linien wurde bereits das Gen für das HA-Protein auf dem Genomsegment 4 beschrieben (Nakauchi *et al.* 2014). Bei der Wahl eines Amplifikationsbereiches, welcher zur Verwendung als Influenza B pan RT-RPA geeignet ist, wurde sich aufgrund der hohen Homologie von 97,7 % für das Genomsegment 8 entschieden. Dabei ist die Verwendung des gleichen Genomsegmentes in der Literatur für andere Amplifikationssysteme wie die RT-PCR beschrieben (Goffard *et al.* 2008; NCIRD 2021). Bei Influenza B liegt im Vergleich zu Influenza A eine geringere Mutationsrate vor und es wurden keine größeren Antigenenveränderungen der Oberflächenproteine beobachtet wurden (Paterson *et al.* 2003; Chen & Holmes 2008). konnten wie in Kapitel ?? angegeben keine Differenzen zwischen verschiedenen Stämmen in dem entsprechenden Genomsegment festgestellt werden. Im ausgewählten Genomsegment 8 wurden über den selektierten Detektionsbereich starke Homologien (98,5 %) gefunden werden. Dementsprechend ist der gewählte Amplifikationsbereich geeignet alle Viruslinien zu detektieren und kann dadurch als Pan-Influenza-B Virusdetektionssystem fungieren.

Da das M1-Gen auf dem Genomsegment 7 durch seine Funktion das am stärksten konservierte Gen ist (McCauley & Mahy 1983), wurde dieser Bereich für die Influenza A RT-RPA ausgewählt um die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 zu detektieren. Dieser Genomabschnitt wird ebenfalls von RT-PCR-Systemen zur Detektion verwendet (Daum *et al.* 2007; Suwannakarn *et al.* 2008; NCIRD 2021). Trotz der hohen Konservierung des Gens besitzt das Gensequenz-Alignment (Abbildung 1) der beiden Subtypen H1N1 und H3N2 etliche Basenfehlpaarungen. Diese Fehlpaarungen sind schematisch in Abbildung 1 als rote Linien dargestellt. Die größte Homologie (90,4 %) ist im Bereich zwischen 10 bp und 250 bp zu beobachten. Aus diesem Grund wurden auch alle mittels PrimedRPA designten und von Ehnts (2013) entwickelten Primer in diesen Bereich gelegt.

Eine Strategie, um Basenfehlpaarungen auszugleichen kann die Verwendung von degenerierten Basen, d.h. einem Gemisch ähnlicher Primersequenzen in den entsprechenden Primern und Sonden sein. Dieses erleichtert die Hybridisierung und verbessert somit die Amplifikation (Linhart & Shamir 2005). Einen anderen Ansatz verfolgten Liang *et al.* (2022), die zur Detektion der beiden Subtypen innerhalb einer RT-RPA zwei verschie-

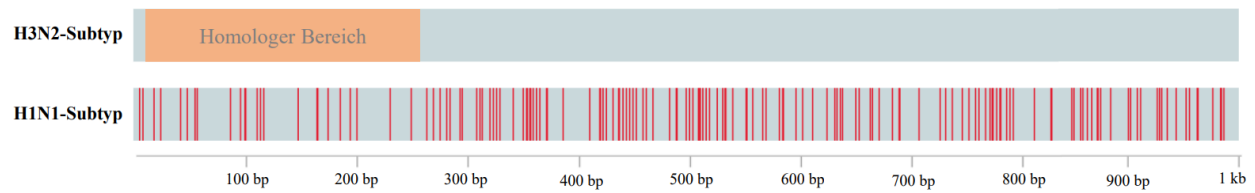


Abbildung 1: **Alignment des Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyps:** Alignement des Genomsegmentes 7 zwischen dem H1N1-Subtyp (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2-Subtyp (GenBank Nr.: MT244214). Die Skala gibt die Sequenzlänge in bp an. Die roten Striche stehen für Basenfehlpaarungen im H1N1 Subtyp im Vergleich zum H3N2 Subtyp. Der orange markierte Bereich gibt den Sequenzabschnitt mit der größten Homologie an.

dene Genomsegmente wählten (Liang *et al.* 2022). Jedoch verwendeten Liang *et al.* (2022) zwei getrennte Reaktionen zum Nachweis der Influenza A Viren und ein Multiplex-Ansatz wäre nötig um eine Detektion innerhalb einer Reaktion durchzuführen. Im Gegensatz dazu benötigt die in dieser Arbeit entwickelte Influenza A RT-RPA nur eine Reaktion ohne Multiplex-Ansatz zur Detektion und kann so einfacher mit anderen Systemen als Multiplex kombiniert werden.

Wie in Abbildung ?? zu erkennen ist, sind die ausgewählten Primer-Sonden-Kombinationen des PrimedRPA Programms unbrauchbar. Bei der Influenza B RT-RPA (Abbildung ??) konnten hingegen alle ausgewählten zumindest klar positive Amplifikationen zeigen. Somit ist eine deutliche Differenz hinsichtlich der Funktionalität des PrimedRPA Programms für die Entwicklung von Primer-Sonden-Kombinationen zu beobachten. Dies könnte an den verwendeten Sequenzvorlagen liegen, da bei Influenza A im Gegensatz zu Influenza B etliche Basenfehlpaarungen in Sequenz vorhanden waren. Die entwickelten Primer wiesen jeweils bis zu 3 Basenfehlpaarungen über den Primer verteilt je nach Subtyp auf. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass bis zu 6 Fehlpaarungen in RPA-Primern eine RPA nicht vollständig inhibieren (Boyle *et al.* 2013). Somit kann die unfunktionalität der Primer nicht durch die Anzahl der Basenfehlpaarungen erklärt werden. Des Weiteren konnten Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015) zeigen, dass vor allem Mismatches am 3' und 5'-Ende des Primers die RPA entscheidend inhibieren (Boyle *et al.* 2013; Higgins *et al.* 2022). Der Forward 1 Primer der Influenza A RT-RPA weist eine solche Fehlpaarung auf, welche durch die Einführung einer degenerierten Base vermieden wurde. Ebenfalls besitzt der von Ehnts (2013) entwickelte Forward Primer (Forward E) eine Fehlpaarung am 3'-Ende welche einerseits durch

Dies spricht gegen die Beobachtungen Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015), welche beschreiben, dass gerade Fehlpaarungen am 3'-Ende großen negativen Einfluss auf die RPA nehmen und somit die Primer ohne Fehlpaarung bessere Amplifikationen zeigen müssten. Jedoch bezogen sich beide Studien nur auf die Primer und ließen die Sonde außer Acht, welche jedoch ebenfalls Fehlpaarungen bei der Influenza A RT-RPA aufwies (Boyle *et al.* 2013; Higgins *et al.* 2022). Liu *et al.* (2019) konnte zeigen, dass Fehlpaarungen in der Sonde bis hin zu einer vollständigen Inhibierung und sogar zu falsch positiven Amplifikationen der RPA führen können (Liu *et al.* 2019). Das könnte eine Erklärung zur großen Diskrepanz, zwischen dem von Ehnts (2013) entwickelten RPA-System und dem mit PrimedRPA designten Primer-Sonden-Kombinationen innerhalb der Influenza A RT-RPA sein. Zwar besitzt die von Ehnts (2013) entwickelte Sonde (Sonde E) ebenfalls Basenfehlpaarungen diese könnten jedoch die RT-RPA nur teilweise inhibieren, während die Fehlpaarungen der PrimedRPA-Sonden (Sonde 3.1 und Sonde 1.1) zu einer nichtunfunktionellen RT-RPA führen.

Des Weiteren ist bei der Primerauswahl der Influenza B RT-RPA (Abbildung ??) am Beispiel der beiden getesteten Sonden zu erkennen, dass nicht nur Basenfehlpaarungen sondern auch andere Einflüsse zu unterschiedlicher RPA-Performance führen. So kann einerseits einerseits die Hybridisierungsposition der Sonde im gleichen Amplifikationsbereich zu einer signifikanten Veränderung der Amplifikation führen (Liu *et al.* 2019). Andererseits kann die zu detektierende RNA, durch Bildung von Sekundärstrukturen und somit durch eine sterische Hinderung die Amplifikation behindern (Saisuk *et al.* 2019). So konnte beispielsweise Wei & To (2003) innerhalb einer PCR zeigen, dass eine RNA-Sekundärstruktur trotz der hohen Temperaturen in der RT-PCR die Amplifikation inhibierte (Wei & To 2003). Wie in Kapitel ?? erwähnt sind die jeweiligen Enden eines Genomsegmentes komplementär zueinander und bilden im Virion eine Loop-Struktur aus (Modrow *et al.* 2010). Betrachtet man die Hybridisierungspositionen, der für die Influenza A RT-RPA entwickelten Primer und Sonden liegen diese am Anfang der Genomsequenz bei ≈ 50 bp bis ≈ 200 bp (Abbildung 1), während die Influenza B RT-RPA Primer und Sonden mittig in der Sequenz bei ≈ 650 bp und ≈ 730 bp liegen. Somit könnte diese Loop-Struktur in vitro durch die sterische Hinderung eventuell die Amplifikation der Influenza A RT-RPA inhibieren, während Amplifikation der Influenza B RT-RPA durch seine Lage nicht beeinflusst wird. Damit könnte sich der Unterschied zwischen der Influenza A RT-RPA und der Influenza B RT-RPA erklären lassen, jedoch müssten RNA-Strukturanalysen durchgeführt werden um dies zu bestätigen.

Ausblick Primerdesign

- > mismatches durch H1N1 und H3N2 (evtl. anderes Target diskutieren, polymerase oder so)
- > alternativen diskutieren (gleiche sonde aber 2 Primer paare, wie die PCR das gemacht hat)

1.2 Mischzeitpunkt und Sensitivität in der RT-RPA mit reduzierten Reaktionsvolumen

Durch geringe thermische Konfektion und durch den „*crowding agent*“ wird die Diffusion der Reagenzien während der RT-RPA erschwert und es kommt zu lokaler Reagenzien-Knappheit (Lillis *et al.* 2016). Deshalb wird ein zusätzlicher Mischschritt vor allem bei niedriger Konzentration empfohlen, welcher zu einer erneuten Homogenisierung der Reaktion führt (Piepenburg *et al.* 2006; Lillis *et al.* 2016). Lillis *et al.* (2016) konnten jedoch zeigen, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens auf 5 µl die Notwendigkeit des zusätzlichen Mischschrittes eliminiert (Lillis *et al.* 2016). Wie in Kapitel ?? gezeigt wurde, das klassische Reaktionsvolumen von 50 µl auf 6,5 µl reduziert, was einem leicht höheren Volumen als dem von Lillis *et al.* (2016) entspricht. Beim Vergleich der Mischzeit in Bezug auf das unterschiedliche Volumen stellt sich heraus, dass der Mischschritt bei der low-volume RPA einen deutlichen Einfluss bei erst 10^1 RNA-Kopien ausübt (siehe Abbildung ??) und die maximale Fluoreszenz und die Anzahl der positiven Amplifikationen von 3/7 auf 7/7 verbessert. Im 50 µl Ansatz hingegen kann schon eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenz und eine signifikante Verbesserung des TT-Wertes bei 10^4 RNA-Kopien beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Volumenreduzierung, den Einfluss des Mischschrittes minimiert, dieser jedoch entgegen der Beobachtungen von Lillis *et al.* (2016) bei niedrigen Konzentrationen (10^1 und 10^0) immernoch essentiell ist und zu deutlichen Verbesserungen der RPA führt. Lillis *et al.* (2016) arbeiteten allerdings mit einem geringeren Volumen (5 µl zu 6,5 µl) und ohne Mineralöl überschichtung, welches die Vergleichbarkeit schwierig macht. Es kann jedoch anhand der Daten in der vorliegenden Arbeit und den von Lillis *et al.* (2016) festgestellt werden, dass eine Verringerung des Reaktionsvolumens die Notwendigkeit des Mischschrittes bei höheren Konzentrationen (10^4 und 10^3) eliminiert (Lillis *et al.* 2016). Eine mögliche Begründung liegt darin, dass einerseits durch das verringerte Volumen ein größeres Verhältnis zwischen hinzugefügter Probe und Reaktionsmix besteht und dadurch eine bessere Diffusion zwischen Probe und Reaktionsmix stattfindet. Andererseits führt das geringere Volumen zu einem größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis, welches zu einer besseren Wärmeübertragung und dementsprechend einer stärkeren Konvektion führt (Böckh & Wetzel 2017). Des Weiteren zeigt die low-volume Influenza B RT-RPA, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens zu einer Sensitivitätserhöhung von über 50 % führt. Der ähnliche Effekt konnte, wenn auch nicht in dieser Ausprägung, ebenfalls durch Lillis *et al.* (2016) nachgewiesen werden (Lillis *et al.* 2016). Die Sensitivitätsverbesserung lässt sich eventuell durch das erhöhte Verhältnis zwischen eingesetzter Probe und RPA-Reaktion und der erhöhten Konvektion erklären, welche zu einer besseren Diffusion in der Reaktion führen und somit Amplifikation positiv beeinflussen. Der low-volume RT-RPA Ansatz bietet den Vorteil einer stärkeren Kostenreduzierung, da mit einer kommerziell erhältlichen RT-RPA-Reaktion acht Tests durchgeführt werden können. Dies macht die low-volume RPA gerade für ressourcen limitierte Umgebungen attraktiv, da sie geringe Kosten pro Test zusammen mit einer möglichen Sensitivitätserhöhung kombiniert (Lillis *et al.* 2016; Jiang *et al.* 2021). Zusätzlich eignet sich das verringerte Reaktionsvolumen von 6,5 µl für den Einsatz in mikrofluidischen Lab-on-a-chip Systemen, die mit 3D-gedruckten Detektionschips kombiniert werden könnten (Behrmann, Hügler, *et al.* 2020). Dadurch erweitern sich ihre Applikationsmöglichkeiten in der POCT und Testsysteme können vereinfacht und verbessert werden (Behrmann, Bachmann, *et al.* 2020). Jedoch könnte das reduzierte

Volumen auch nachteilig in Bezug auf einen unspezifische Nukleinsäure-Hintergrund für die RPA sein. In der Literatur wird beschrieben, dass 400-500 ng DNA-Gehalt die RPA inhibieren (Rohrman & Richards-Kortum 2015; Li *et al.* 2019) wobei diese Inhibierung abhängig von der Template-Konzentration ist (Clancy *et al.* 2015). Dies könnte die low-volume RPA gerade bei niedrigen Konzentrationen einschränken, da durch das erhöhte Proben/RPA-Verhältnis auch das Verhältnis von in der Probe enthaltener Hintergrund-DNA steigt, somit eine höhere hintergrund DNA-Konzentration in der Reaktion herrscht und die low-volume RPA inhibiert werden könnte.

Bisher konnten der low-Volume Ansatz nur bei der Influenza B RT-RPA im Zusammenhang mit der eingeführten Primer-asymmetrie optimiert werden. Ein Transfer des low-volume RPA-Ansatzes auf die Influenza A RT-RPA konnte im ersten Herangehen nicht erreicht werden, da höhere TT-Werte und einen linear erscheinenden Amplifikationsverlauf, welcher auf eine schlechte Kinetik deutet, als nachteilig eingestuft wurden.

Dementsprechend lässt sich sagen, dass die low-volume RPA nicht für alle RPA-Assays adaptierbar ist und somit die Applikation eingeschränkt wird. Des Weiteren wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens nur bei RNA-Viren beschrieben (Lillis *et al.* 2016; Behrmann, Bachmann, *et al.* 2020), wodurch eine Adaption auf DNA basierte RPA's noch unklar ist.

1.3 Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays

1.3.1 Influenza B RT-RPA

Wie in Kapitel ?? beschrieben liegt das Detektionslimit der optimierten low-Volume RT-RPA für den Influenza B Virus bei 14,6 RNA-Kopien. Im Vergleich zu der getesteten RT-PCR vom NCIRD (2021) konnte eine Differenz von nur 3 Kopien festgestellt werden, wobei die Unterschiede im Konzentrations-Bereich von $2 \cdot 10^0$ RNA-Kopien liegen. In diesen Sensitivitätsbereich spielt einerseits die zufällige Diffusion eine Rolle, welche bestimmt ob die einzelnen Reaktionskomponenten miteinander Interagieren sowie minimale Ungenauigkeiten bei der Verdünnung der RNA-standards, welche dazu führen, dass keine Nachweisbaren RNA-Kopien in dem eingesetzten Probenvolumen enthalten sind. Andererseits zeigen Nukleinsäuren eine Adsorption an die verwendeten Polypropylen-Tubes (Zandieh *et al.* 2022), welches sie für die RPA-Reaktion unzugänglich machen und gerade bei geringen Kopienzahlen einen Einfluss haben. Veranschaulicht werden diese Effekte in Abbildung ??D. Hier zeigt eine Messung, bei welcher durch zufällige Diffusion die Reaktionskomponenten miteinander interagieren konnten, einen deutlichen Anstieg, während alle anderen Messungen keine Signalveränderung aufweisen. Dementsprechend lässt sich sagen, dass die entwickelte RT-RPA für das Influenza B Virus der PCR als Goldstandard ebenbürtig ist. Bei dem Sensitivitätsvergleich mit der Literatur liegt das Detektionslimit der RT-RPA ebenfalls leicht unter dem von vergleichbaren PCR-Systemen (Wu *et al.* 2008; Shu *et al.* 2020; Ni *et al.* 2021) und ähnlich wie ein RPA-Vergleichssystem (Liang *et al.* 2022).

Das Detektionslimit der optimierten Influenza A RT-RPA liegt im Gegensatz zur Influenza B RT-RPA weit hinter der Sensitivität der getesteten RT-PCR (siehe Tabelle ??) und rund 10-100 mal über den Detektionslimits von PCR- und RPA-Assays in der Literatur (Wu *et al.* 2008; Ni *et al.* 2021; Liang *et al.* 2022). Das vergleichsweise hohe Detektionslimit der Influenza A RT-RPA lässt sich wie in 1.1 diskutiert durch die erhöhte Anzahl an Basenfehlpaarungen in Primern und Sonde sowie eventuelle Bildung von Sekundärstrukturen erklären.

Wird das Detektionslimit in simulierten Kontrollproben für die Influenza A und B RT-RPA betrachtet fällt auf, dass es in Influenza B zu einer deutlichen Verschlechterung des Detektionslimits kommt (siehe Tabelle ??), während Influenza A scheinbar keine Beeinflussung erfährt (siehe Tabelle ??). Dieses Phänomen

könnte an den unterschiedlichen Reaktionsvolumen der verschiedenen RPA-Assays zusammen mit dem eingeführten humanen Hintergrund liegen. Wie in 1.2 erwähnt, können große Mengen an genomischer DNA die RPA inhibieren. Dabei hänge die Inhibierung neben der Konzentration der genomischen DNA auch von der Konzentration des eingesetzten zu amplifizierenden Materials ab (Rohrman & Richards-Kortum 2015). Da das verwendete QiAamp Viral RNA Mini Kits zum Erhalt des humanen Probenhintergrunds keinen DNase-Verdau Schritt durchführt (siehe unten ??) bleibt die genomische DNA in den Extrakten erhalten. Dementsprechend könnte durch das höhere Proben-Reaktion-Verhältnis im low-volume Ansatz schon geringere Mengen an genomischer DNA bei niedrigen Konzentrationen die beobachtete Inhibierung zur Folge haben, während der 50 µl Ansatz durch sein höheres Volumen keine Inhibierung aufweist. Der Arbeit von Rohrman & Richards-Kortum (2015) zufolge sorgt eine DNA-konzentration von 500 ng bei Template-Konzentrationen von 10^2 Kopien für eine komplette Inhibierung der RPA. Rechnet man die Konzentration der genomischen DNA auf den low-volume Ansatz runter, würden 62,5 ng ausreichen, um eine vollständige Inhibierung auszulösen. Die ermittelte Konzentration der Kontrollproben liegt bei rund 45 ng/µl (siehe Kapitel ??) und somit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Zusätzlich sorgt das erhöhte Proben-Reaktion-Verhältnis zu einem höheren genomischen DNA-Verhältnis im Vergleich zur RPA-Reaktion was die benötigte Konzentration zur Inhibierung abermals Senkt. Dementsprechend ist eine Inhibierung der RPA im low-volume Ansatz bei niedrigen Kopien-Anzahlen plausibel.

Eine mögliche Erklärung für die Inhibierung der RPA bei hohen DNA-Konzentrationen könnten dabei bei illegitimen Primer- oder Sonden-Hybridisierungen liegen. Durch die vergleichsweise niedrige Temperatur der RPA können Fehlbildungen der Primer und Sonden an die genomische DNA vorkommen, wodurch sie für die eigentliche Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Dieser Effekt würde dabei stark von der Konzentration der Ziel-DNA abhängig sein, da höhere Template-Konzentrationen bei gleichbleibenden genomischen Hintergrund zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine spezifische Primer-Bindung führen. Um dem entgegenzuwirken, müsste die genomische Hintergrund-DNA Verhältnismäßig erhöhte werden um die Wahrscheinlichkeit für spezifische Bindungen zu reduzieren. Diese Verhältnismäßigkeit wurde von Rohrman & Richards-Kortum (2015) beobachtet, welches die Hypothese bekräftigt. Jedoch konnte zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit keine Bestätigung der Hypothese in der Literatur gefunden werden. Eine Erhöhung der Primer- bzw. Sonden-Konzentration könnte für spezifischere Bindungen und somit bessere Amplifikation auch in hohen genomischen DNA-Konzentration sorgen, jedoch müsste dies in einer weiteren Versuchsreihe untersucht werden und war nicht Teil dieser Arbeit.

Die in der Literatur beschriebenen Viruslasten für die Influenza A Subtypen liegen bei allen Altersgruppen im Mittelwert bei rund $10^{3,5}$ Virus Kopien/µl (H1N1) und $10^{3,3}$ Virus Kopien/µl (H3N2) (Ngaosuwankul *et al.* 2010; Alves *et al.* 2020) wobei eine Ausnahme die Patientengruppe unter zwei Jahren mit $10^{2,67}$ Virus Kopien/µl (H1N1) bildet (Alves *et al.* 2020). Die beste Entnahmemethode sind dabei Nasopharyngeal-Abstriche, welche im Durchschnitt $10^{5,0}$ Virus Kopien/µl Enthalten, während Nasal-Abstriche mit $10^{3,8}$ Virus Kopien/µl und Rachen-Abstriche mit $10^{3,4}$ Virus Kopien/µl deutlich geringere Viruslasten aufweisen (Ngaosuwankul *et al.* 2010). Die für die Influenza A ermittelte Sensitivität in den simulierten Kontrollproben kann mit einem Detektionslimit von 147,5 RNA-Kopien für beide Subtypen (siehe Tabelle ??) im Durchschnitt alle Patientenproben nachweisen. Eventuelle Komplikationen könnten bei Patienten unter zwei Jahren aufkommen, da die Viruslast nahe an der Detektionsgrenze liegt. Für eine sichere Detektion ist generell ein Nasopharyngeal-Abstrich durchzuführen, da hier im Durchschnitt die größte Viruslast erlangt wird und somit ein eventuelle Annäherung an das Detektionslimit vermieden werden kann. Für Influenza B konnte in einer Studie von Alves *et al.* (2019) eine durchschnittliche Viruslast in allen Altersgruppen von rund $10^{3,5}$ Virus Kopien/µl

festgestellt werden. Ausnahme bildeten dabei Patienten über 59 Jahren, da hier nur ein Datensatz verfügbar war und somit keine einheitliche Aussage getätigt werden kann (Alves *et al.* 2019). Eine andere Studie von Tsou *et al.* (2012) untersuchte die Viruslast speziell bei Kindern und konnte im Durchschnitt sehr geringe Werte von Durchschnittlich 3,9 Virus Kopien/µl feststellen. Jedoch wurden innerhalb dieser Studie große Schwankungen innerhalb der Viruslast festgestellt (zwischen 45 und $2 \cdot 10^6$ Virus Kopien/ml) sowie eine negative Korrelation zwischen Viruslast und Zeitpunkt der Probenentnahme (Tsou *et al.* 2012). Das mit der reinen, artifiziellen Standard RNA ermittelte Detektionslimit für die Influenza B RT-RPA wäre mit 14,6 RNA-Kopien (siehe Tabelle ??) in der Lage die meisten Patientenproben zu detektieren. Betrachtet man jedoch den starken Verlust der Sensitivität bei den simulierten Kontrollproben können Komplikationen gerade bei Kinderpatienten auftreten. Hier liegt das ermittelte Detektionslimit von 1397 RNA-Kopien (siehe Tabelle ??) weit über der von Tsou *et al.* (2012) ermittelten Viruslast. Nach Alves *et al.* (2019) könnten zwar alle Patienten inklusive Patienten unter zwei Jahren im Durchschnitt detektiert werden, jedoch befindet sich hier die Viruslast nahe am Detektionslimit. Generell lässt sich sagen, dass die entwickelte Influenza B RT-RPA ein zu hohes Detektionslimit besitzt um zuverlässig Influenza B Detektieren zu können. Eine eventuelle Verbesserung des Detektionslimits in einem humanen DNA-Hintergrund könnte durch die Verwendung des 50 µl Ansatzes oder durch die Erhöhung der Primer- oder Sonden-Konzentration erreicht werden, jedoch müsste dies in weiteren Versuchen bestätigt werden. Zusätzlich sollte, um eine möglichst zuverlässige Detektion zu ermöglichen eine zeitnahe Proben Entnahme erfolgen, um möglichst hohe Viruslasten zu erreichen (Tsou *et al.* 2012).

1.4 Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA

Eine asymmetrische Erhöhung der reverse Primer-Konzentration bei einer gleichbleibenden Forward Primer-Konzentration führt zu einer erhöhten Fluoreszenz (Kapitel ??). Wie bereits beschrieben, sorgt die asymmetrische Verteilung der Primer vermutlich dazu, dass im Verlauf der Reaktion mehr einzelsträngige DNA in sense entsteht, wenn der forward-Primer (sense) in deutlich höheren Konzentration der Reaktion zur Verfügung steht. Der asymmetrische Ansatz innerhalb der RPA von Wang *et al.* (2019) zur Detektion von *Fusarium proliferatum* genutzt, um mittels eines enzymkatalysiertem Farbumschlags nachzuweisen (Wang *et al.* 2019). (Kersting2014?) kombinierte die asymmetrische RPA, um mit der entstandenen einzelsträngigen DNA ein Nachweis mittels Microarray durchzuführen (Kersting2014?). Derzeit ist die Verwendung einer asymmetrischen Primerverteilung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sonden in der Literatur nur innerhalb der qPCR bekannt. So konnte Poddar (2000) mithilfe von „*molecular beacon*“ nachweisen, dass durch eine 50-fache Primerasymmetrie, die zur Sonde komplementäre DNA-Sequenz zusätzlich als einzelsträngige DNA in höheren Mengen vorliegt. Dadurch konnten die „*molecular beacon*“ häufiger hybridisieren und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen (Poddar 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte vermutlich dass das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RPA mittels Exo-Sonden angewendet werden. Die Experimente mit der RT-RPA für Influenza B legen dies nahe (Kapitel ??). Die Erhöhung des Forward Primers (sense) (Abbildung ??A) führte wieder zu einer Äquimolaren aber im Vergleich zur Standard-RPA erhöhten Primerverteilung. Dadurch wurde vermutlich keine erhöhte Menge an einzelsträngiger antisense DNA in der Reaktion gebildet und die Hybridisierungskinetik der Sonde wurde nicht erhöht. Dementsprechend ist auch ein Rückgang an Fluoreszenzsignal zu beobachten, da die Sonde zur Spaltung durch die Exonuklease ein Hybridisierungs-Event benötigt, welches nur noch während der Amplifikations-Reaktion der RPA stattfindet (Lobato & OSullivan 2018). In diesem Versuchsansatz muss jedoch noch zusätzlich die Reaktion der reversen Transkriptase betrachtet werden, da diese mit einer

eigenen Enzymkinetik zur Bildung einer komplementäre DNA bei einer sense RNA den antisense Primer für seine Reaktion nutzt. Bei dem vice versa Versuch den sense Primer betreffend (Abbildung ??B) trifft dies jedoch nicht zu. In dem weiteren Versuch konnte durch die Verwendung der Sonde (.....), welche komplementär zum antisense Strang ist, gezeigt werden, dass nun eine Fluoreszenzsignalerhöhung stattfindet, wenn der Forward primer asymmetrisch Erhöht wird und ein schwächeres Fluoreszenzsignal vorliegt wenn eine reverse Primer-Asymmetrie vorhanden ist. Demensptrechend liegt vermutlich bei der erhöhung des forward primers der komplimentäe anti sense Strang vermehrt und einzelstränig vor, wodurch die Hybridisationskinetik der Sonde begünstigt wird und mehr Sonde bei erfolgreicher Hybridisation gespalten wird. Dabei sind die Ergebnisse (verlgeich der beiden Sonden umgekehrt)

, dass die Hybridisierungsposition der Sonde mit der Primer-Asymmetrie zusammenhängt. Durch die Verwendung der Sonde (.....), welche komplementär zum antisense Strang ist, konnte gezeigt werden, dass die assymetrische Erhöhung der forward primers zu einer Signal Erhöhung führt.

Dieses Prinzip konnte ebenfalls auf die Influenza A RT-RPA übertragen werden, was beweist, dass die Asymmetrie nicht nur speziell Anhand der Influenza B RT-RPA nachweisbar ist, sondern allgemeiner angewandt werden kann. Jedoch wurde dieses Prinzip in dieserArbeit nur anhand der RT-RPA nachgewiesen. Eine Adaption auf eine DNA basierte RPA müsste noch untersucht werden, um allgemeingültige Aussagen treffen zu können.

Im Umkehrschluss gilt dies für den antisense DNA Strang im zusammenhang mit dem reverse Primer (antisense). In diesem Versuchsansatz muss jedoch noch zusätzlich die Reaktion der reversen Transkriptase betrachtet werden, da diese mit einer eigenen Enzymkinetik zur Bildung einer komplementäre DNA bei einer sense RNA den antisense Primer für seine Reaktion nutzt. Bei einem vice versa Versuch den sense Primer betreffend trifft dies jedoch nicht zu.

Der asymmetrische Ansatz innerhalb der RPA von Wang *et al.* (2019) zur Detektion von Fusarium proliferatum genutzt, um mittels eines enzymkatalysiertem Farbumschlags nachzuweisen (Wang *et al.* 2019). (Kersting2014?) kombinierte die asymmetrische RPA, um mit der entstandenen einzelsträngigen DNA ein Nachweis mittels Microarray durchzuführen (Kersting2014?). Derzeit ist die Verwendung einer asymmetrischen Primerverteilung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sonden in der Literatur nur innerhalb der qPCR bekannt. So konnte Poddar (2000) mithilfe von „*molecular beacon*“ nachweisen, dass durch eine 50-fache Primerasymmetrie, die zur Sonde komplementäre DNA-Sequenz zusätzlich als einzelsträngige DNA in höheren Mengen vorliegt. Dadurch konnten die „*molecular beacon*“ häufiger hybridisieren und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen (Poddar 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte vermutlich dass das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RPA mittels Exo-Sonden angewendet werden. Die Experimente mit der RT-RPA für Influenza B legen dies nahe (Kapitel ??). Die Erhöhung des Forward Primers (sense) (Abbildung ??A) führte wieder zu einer Aequimolaren aber im vergleich zur Standard-RPA erhöhten Primerverteilung. Dadurch wurde vermutlich keine erhöhte Menge an einzelträger antisense DNA in der Reaktion gebildet und die Hybridisierungskinetik der Sonde wurde nicht erhöht. Dementsprechend ist auch ein Rückgang an Fluoreszenzsignal zu beobachten, da die Sonde zur Spaltung durch die Exonuklease ein Hybridisierungs-Event benötigt (Lobato & OSullivan 2018). Das zeigt, dass die A

Die höheren Mengen könnten wiederum in Konkurrenz zur Sonde um die Hybridisierungsstelle des antisense-Stranges treten,

wobei die Verteilung der Primer-Asymmetrie von der Hybridisierungsposition der Sonde (sense- oder antisense-Strang) abhängt.

Wie den Kapiteln ?? und ?? festgestellt, führt eine asymmetrische Erhöhung des reverse Primer zu einer erhöhten Fluoreszenz, wobei die Verteilung der Primer-Asymmetrie von der Hybridisierungsposition der Sonde (sense- oder antisense-Strang) abhängt. Wie in Kapitel ?? beschrieben sorgt die ungleiche Verteilung der Primer dazu, dass im Verlauf der Reaktion einzelsträngige DNA entsteht. Dabei wurde die asymmetrische Primerverteilung innerhalb der RPA von Wang *et al.* (2019) beschrieben um *Fusarium proliferatum* mittels eines enzymkatalysiertem Farbumschlags nachzuweisen (Wang *et al.* 2019). Sollweck *et al.* (2021) kombinierte die asymmetrische RPA um mit der entstandenen einzelsträngigen DNA ein Nachweis mittels Microarray durchzuführen (Sollweck *et al.* 2021). Derzeit ist die Verwendung einer asymmetrischen Primerverteilung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sonden in der Literatur nur innerhalb der qPCR bekannt. So konnte Poddar (2000) mithilfe von Molecular Beacons nachweisen, dass durch die Primerasymmetrie die zur Sonde komplementäre DNA-Sequenz zusätzlich als einzelsträngige DNA und somit vermehrt vorliegt. Dadurch konnten die Molecular Beacons häufiger hybridisieren und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen (Poddar 2000). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RPA mittels Exo-Sonden anwendbar ist. Dies wurde über die Experimente in Kapitel ?? bestätigt. Durch die Erhöhung des Forward Primer (siehe Abbildung ??A) wurde die Asymmetrie wieder angeglichen, wodurch ein Rückgang an Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Das beweist, dass die Asymmetrie mit der Fluoreszenzerhöhung zusammenhängt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierungsposition der Sonde mit der Primer-Asymmetrie zusammenhängt (siehe Abbildung ??B). Daraus lässt schließend, dass durch die Primerasymmetrie, die zur Exo-Sonde komplementäre DNA-Sequenz häufiger Amplifiziert wird, wodurch die Sonde an die entstandene einzelstränge DNA hybridisiert und von der Exonuclease gespalten wird. Dadurch wird mehr Sonde als bei einer Konventionellen RPA gespalten, wodurch mehr Fluoreszenzsignal detektierbar wird. Dieses Prinzip konnte ebenfalls auf die Influenza A RT-RPA übertragen werden, was beweist, dass die Asymmetrie nicht nur speziell Anhand der Influenza B RT-RPA nachweisbar ist, sondern allgemeiner angewandt werden kann. Jedoch wurde dieses Prinzip in dieser Arbeit nur anhand der RT-RPA nachgewiesen. Eine Adaption auf eine DNA basierte RPA müsste noch untersucht werden, um allgemeingültige Aussagen treffen zu können.

1.5 Einfluss der Exo-Sondenmodifikation auf die RT-RPA

Die Sondenmodifikation innerhalb der RPA hinsichtlich Fluorophor- und Quencher-Position unterliegt Sequenz-Limitationen. So ist eine Kopplung des Fluorophors beziehungsweise des Quenchers an die Purin-Basen (Adenin A, Guanin G) ungünstig, da die Kopplung an der 8'-Position erfolgt und so das Nukleosid in eine Synkonformation gezwungen wird. Dadurch kommt es zu einer Störung der Watson und Crick Basenpaarung, was die Hybridisation erschwert (Wagenknecht 2008). Eine Kopplung an die Purin-Basen (Cytosin C, Thymin T) ist vorzuziehen, da es hier zu einer geringeren Beeinträchtigung kommt. Hierbei erfolgt die Kopplung an die 5'-Position, wodurch die Konformation des Nukleosids weitestgehend nicht beeinträchtigt wird. Sterischen Behinderungen zwischen Fluorophor und DNA können jedoch bei beiden Kopplungspositionen nicht ausgeschlossen werden (Wagenknecht 2008). Der Stand der Technik beschränkt und sich dabei auf T-gekoppelte Quencher und Sonden (TwistDx 2018; Faye *et al.* 2021; Guo *et al.* 2022). Da der FRET-Mechanismus zur Detektion des Fluoreszenzsignales sehr stark von der Distanz zwischen Quencher und Fluorophor abhängig ist (Johansson & Cook 2003) benötigt die Sondensequenz

dementsprechend zwei dicht nebeneinander liegende T Basen. zusätzlich werden die Anforderungen an die Sondensequenz noch durch die a-basische Seite, welche von der Exonuklease gespalten wird und der Fluorophorposition, welche bei rund 30+ bp liegen sollte (Lobato & OSullivan 2018) erschwert. So benötigt die Sonde bei rund 30 bp eine T-X-T Sequenz (X = beliebiges Nukleotid), wodurch die Sondenposition in den meisten Fällen deutlich eingeschränkt wird. Um diesem Problem zu entgehen entwickelten Behrmann, Bachmann, *et al.* (2020) die *internally quenched* Sonde, bei welcher der Quencher an das Phosphat-Rückgrat der DNA gekoppelt wird (siehe Kapitel ??) und so die starke Abhängigkeit der T-X-T Sequenz umgangen wird. Somit können Exo-Sonden variabler an die Zielsequenz angepasst werden (Behrmann, Bachmann, *et al.* 2020). In dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Sondentypen ermittelt werden (siehe Abbildung ??) So führt die *dT-Quenched* Sonde zu einer höheren Sensitivität und zu einem niedrigeren Hintergrundsignal. Eine mögliche Hypothese für diese Beobachtung könnte im Zusammenhang mit der verwendeten Primer-Asymmetrie liegen. Durch die eingeführte Primer-Asymmetrie liegt der zur Sonde komplementäre DNA-Strang einzelsträngig vor. Dementsprechend kann die Sonde unabhängig von der Strangverdrängungsaktivität der Polymerase hybridisieren. Nach der Spaltung durch die Exonuklease findet keine Verdrängung durch die Polymerase statt und die Sonden-Fragmente müssen sich durch Diffusion voneinander trennen. Durch den dT gekoppelten Quencher besteht im hybridisierten Zustand der Sonde eine sterische Abstoßung zwischen Quencher, Fluorophor und gegenüberliegender A Base. Bei der Spaltung der Sonde sorgt diese sterische Abstoßung für eine bessere Diffusion des Quenchers von dem Fluorophor was zu einem erhöhtem Signal führt. Im Gegensatz dazu entsteht bei der von Behrmann, Bachmann, *et al.* (2020) entwickelten *internally quenched* Sonde keine solche Abstoßung, da der Quencher über das Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA gekoppelt ist und somit außerhalb der Doppelhelix ragt. Betrachtet man die mittlere Schmelztemperatur (Tm) des Sonden-Fragments mit dem Quencher liegt diese bei 53 °C (berechnet online¹). Dementsprechend würde nach der Spaltung der Sonde die Diffusion des Quencher-Fragments ohne weitere Abstoßungseffekte bei der gewählten Reaktionstemperatur von 42 °C deutlich erschwert werden. Das beobachtete geringere Signal-Rauschen der Negativkontrolle der *dT-Quenched* Sonde lässt sich auf den erhöhten Abstand zwischen Fluorophor und Quencher zurückführen. Wie in der von Förster (1948) entwickelten Formel zu sehen, ist die Energie-Übertragungsrate (F_{kl}) von der Fluoreszenzabklingzeit (τ_0), dem Förster-Radius (R_0) und dem Abstand zwischen Fluorophor und Quencher (R_{kl}) abhängig (siehe Formel (1)). R_0 ist dabei für verschiedene Fluorophorpaare unterschiedlich und wird zur Vereinfachung $R_0 = 1$ gesetzt (Förster 1948). Dadurch wird die sehr starke Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Fluorophor und Quencher deutlich. Dementsprechend können kleine Veränderungen des Abstandes zu einem deutlich schlechteren Energietransfer, also zu einem schlechteren Fluoreszenz-Quenching führen. Da die *dT-Quenched* Sonde durch die dT-Kopplung von Fluorophor und Quencher beide Moleküle näher zusammenbringt als es bei der *internally quenched* Sonde der Fall ist, findet demnach eine besseres Quenching des Fluoreszenzsignals statt. Dieses drückt sich in dem in Abbildung ?? beobachteten geringeren Hintergrund-Signal aus.

$$F_{kl} = \frac{R_0^6}{\tau_0 * R_{kl}^6} \quad \text{mit} \quad R_0 = 1 \quad F_{kl} = \frac{1}{\tau_0 * R_{kl}^6} \quad (1)$$

¹<https://www.promega.de/resources/tools/biomath/tm-calculator/>

1.6 Das Ditching innerhalb der RT-RPA

Die spontane Abnahme des Fluoreszenzsignals im späteren Verlauf der Messung konnte an mehreren Stellen dieser Arbeit beobachtet werden (siehe Abbildungen ??, ??B, ??A, ??B, ??B). Dabei scheint dieses Phänomen speziell innerhalb der RPA aufzutreten und wurde weder innerhalb der PCR, noch innerhalb anderen isothermen Amplifikationen (LAMP, NASBA etc.) beobachtet. Lutz *et al.* (2010) beschrieben dieses Phänomen innerhalb der RPA als Ditching, lieferten jedoch keine weiteren Erklärungen zu dem Sachverhalt (Lutz *et al.* 2010). Das Ditching widerspricht dabei dem theoretisch ablaufendem Reaktionsverlauf. Durch die exponentielle Spaltung der Fluoreszenzsonden werden immer mehr Quencher-Fragmente von den Fluorophor-Fragmenten getrennt und somit (exponentiell) mehr Fluoreszenz-Signal detektierbar. Nach einiger Zeit sind alle Fluoreszenzsonden gespalten und das Fluoreszenz-Signal erreicht ein Plateau. Beim Ditching hingegen wird das Fluoreszenz-Signal vermindert und steigt nach kurzer Zeit darauf wieder an. Eine mögliche Erklärung für die Verminderung des Fluoreszenz-Signals könnten die erneute Zusammenlagerung von Fluorophor und Quencher sein, welche das Fluoreszenzsignal erneut Quenched. Dies kann mithilfe in einer Dimer-Bildung zwischen und Fluorophor- und Quencher-Fragment erklärt werden. Jedoch besitzt dieses Dimer eine Bindungsenergie (ΔG) von nur -2,48 kcal/mol bei 37 °C und ist demnach bei 40 °C nicht sonderlich stabil (siehe Abbildung 2). Des Weiteren liegen Quencher und Fluorophor innerhalb des Dimers etliche Nukleotide voneinander entfernt, welches die Energie-Übertragungsrate durch die Entfernung immens verringert und somit das Quenching nahezu ausbleibt (siehe Kapitel 1.5).

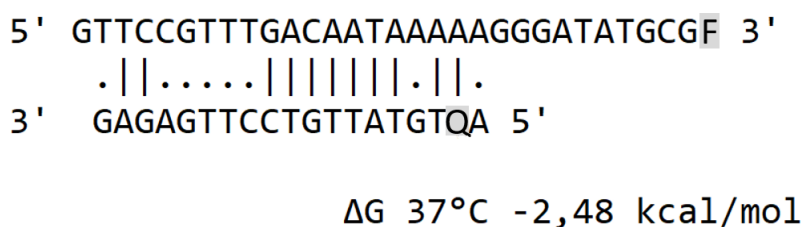


Abbildung 2: **Dimerbildung der Influenza B Sonden-Fragmente:** Dimer des Fluorophor-Fragmentes mit dem Quencher-Fragment der Influenza B Sonde. Die Bindungsenergie (ΔG) bei 37 °C wurde mit dem Programm PerlPrimer (Marshall 2004) berechnet. Fluorophor (F) und Quencher (Q) sind grau hinterlegt.

Ein weiteres Problem liegt in der erneuten Steigung der Fluoreszenz. Dies würde bedeuten, dass die Zusammenlagerung von Quencher und Fluorophor reversibel und zeitabhängig für einen kurzen Zeitraum stattfindet. Des Weiteren wurde das Ditching innerhalb der Optimierung bei der Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt und Primer-Konzentration beobachtet (siehe Kapitel ??). Interessant ist dabei, dass es nur bei den optimalen Parametern, sprich bei der besten Amplifikation, beobachtet wurde. Gerade die eingeführte Primerasymmetrie führt, wie in Kapitel 1.4 erklärt, dazu, dass mehr Sonde gespalten wird. Eine Erhöhung der Temperatur führt generell zu einer besseren Enzymkinetik (Jaeger *et al.* Anon. 2018), somit ebenfalls zu einer schnelleren Amplifikation und dementsprechend zu einer erhöhten Spaltung der Sonde. Der zusätzliche Mischschritt beschleunigt durch die Homogenisierung ebenfalls die Reaktion und führt wie die anderen Parameter zu einer schnelleren Sondenspaltung. Dementsprechend scheint es einen Zusammenhang zwischen der Menge der gespaltenen Sonde und Ditching zu geben. Jedoch müsste dies in weiteren Experimenten bestätigt werden und generell die Faktoren, welche das Ditching beeinflussen genauer untersucht werden. Ebenfalls stellt die Zusammenlagerung des Fluorophors und Quenchers nur eine Hypothese für das beobachtete Phänomen dar. Der genaue physikalische und molekulare Mechanismus bleibt weiterhin unbekannt und müsste weiter untersucht werden.

1.7 Automatische Auswertung der Amplifikationen mittels Statistik

Wie am Beispiel vom dem Influenza A Primer-Screening (siehe Abbildung ??) und der Influenza B Mischschritt-Optimierung (siehe Abbildung ??C) zu sehen, kann es schwierig werden Amplifikationen per Auge in positiv und negativ Einzuteilen. Aus diesem Grund ist eine automatisierte statistische Auswertung notwendig. Innerhalb der qPCR (und RPA (quelle)) wird dafür ein Schwellenwert verwendet, wobei Reaktionen als positiv gelten, wenn sie diesen Schwellenwert überschreiten (Bustin *et al.* 2009). Jedoch hängt diese Auswertungsmethode stark von der Wahl des Schwellenwerts ab, welcher je nach verwendetem Gerät und Hersteller anders berechnet wird (Waidi Folorusno Sule 2020). Zusätzlich unterliegt die Fluoreszenzkurve einer Amplifikation weiteren Zufallsfaktoren wie beispielsweise verschieden starke Fluorophore oder Sensorfehler (Spiess *et al.* 2015). Dies führt dazu, dass je nach Gerät und Test unterschiedliche Ergebnisse entstehen und keine Vergleichbarkeit der Daten gegeben ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die automatische Auswertung der Fluoreszenzdaten mit weiteren statistischen Tests, unabhängig vom Schwellenwert ergänzt um eine einheitliche, vergleichbare und nachvollziehbare Auswertung zu ermöglichen. Dazu wurde das chipPCR package von Rödiger *et al.* (2015) verwendet, welches Ursprünglich für die qPCR entwickelt wurde, jedoch auch für isotherme Amplifikationen beschrieben ist (Rödiger *et al.* 2015). Jedoch konnten Moody *et al.* (2016) feststellen, dass sich die Kinetik der RPA von der der PCR unterscheidet (Moody *et al.* 2016). Demnach ist Kinetik der Fluoreszenzgenerierung ebenfalls unterschiedlich zur PCR und mathematische Modelle, angepasst auf die PCR, lassen sich nur bedingt auf die RPA adaptieren. So konnte die Berechnung des Hintergrundrauschens nicht mit dem chipPCR package durchgeführt werden, da der zeitigere Anstieg der RPA bei hohen Template-Konzentrationen nicht in das mathematische Modell passte. Aus diesem Grund wurde die Methode von Ritz & Spiess (2008) als Alternative verwendet. Des Weiteren zeigte der im chipPCR package enthaltene *lineare Regressions Test*, welcher viele lineare Regressionen über die Amplifikationskurve spannt und diese Auswertet, fehlerhafte Ergebnisse und wurde nicht verwendet. Für die Berechnung eines geeigneten Schwellenwertes wurde auf eine Methode aus dem Immunassay-Bereich zurückgegriffen (Frey *et al.* 1998). Dadurch konnte das höhere Rauschen der *internally Quenched* Sonde mit einberechnet werden, da die Berechnung die gesamten Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle verwendet (Frey *et al.* 1998).

2 Zusammenfassung und Ausblick

- Alves V.R.G., Perosa A.H., Souza Luna L.K. de, Cruz J.S., Conte D.D. & Bellei N. 2020. Influenza a(H1N1)pdm09 infection and viral load analysis in patients with different clinical presentations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200009>
- Alves V.R.G., Souza Luna L.K. de, Cruz J.S., Perosa A.H. & Bellei N. 2019. Influenza b viral load analysis in patients with acute respiratory infection from a tertiary hospital in Brazil. *Journal of Medical Virology* 92 (8): 1350–1354. <https://doi.org/10.1002/jmv.25648>
- Behrmann O., Bachmann I., Spiegel M., Schramm M., Wahed A.A.E., Dobler G., Dame G. & Hufert F.T. 2020. Rapid detection of SARS-CoV-2 by low volume real-time single tube reverse transcription recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (exo-IQ). *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–1054. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>
- Behrmann O., Hügler M., Eckardt F., Bachmann I., Heller C., Schramm M., Turner C., Hufert F. & Dame G. 2020. 3D printed monolithic microreactors for real-time detection of *Klebsiella pneumoniae* and the resistance gene bla_{NDM-1} by recombinase polymerase amplification. *Micromachines* 11 (6): 595. <https://doi.org/10.3390/mi11060595>
- Böckh P. von & Wetzel T. 2017. *Freie Konvektion*. In: *Wärmeübertragung*: 141–154. Springer Berlin Heidelberg.
- Boyle D.S., Lehman D.A., Lillis L., Peterson D., Singhal M., Armes N., Parker M., Piepenburg O. & Overbaugh J. 2013. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. & Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chen R. & Holmes E.C. 2008. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *Journal of Molecular Evolution* 66 (6): 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>
- Clancy E., Higgins O., Forrest M.S., Boo T.W., Cormican M., Barry T., Piepenburg O. & Smith T.J. 2015. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood. *BMC Infectious Diseases* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1212-5>
- Daher R.K., Stewart G., Boissinot M., Boudreau D.K. & Bergeron M.G. 2015. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology. *Molecular and Cellular Probes* 29 (2): 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.11.005>
- Daum L.T., Canas L.C., Arulanandam B.P., Niemeyer D., Valdes J.J. & Chambers J.P. 2007. Real-time RT-PCR assays for type and subtype detection of influenza A and B viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1 (4): 167–175. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2007.00024.x>
- Ehnts K.I. 2013. Entwicklung von rekombinase-polymerase-amplifikations-nachweisverfahren für virale Erreger von Atemwegsinfektionen. *Dissertation der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen*. <https://doi.org/10.53846/goediss-3943>
- Faye M., Wahed A.A.E., Faye O., Kissenkötter J., Hoffmann B., Sall A.A. & Faye O. 2021. A recombinase

- polymerase amplification assay for rapid detection of rabies virus. *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82479-8>
- Förster Th. 1948. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437 (1-2): 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
- Frey A., Canzio J.D. & Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 221 (1-2): 35–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7)
- Goffard A., Beugin A.-S., Hober D., Ogiez J. & Dewilde A. 2008. Mise au point d’une technique de RT-PCR duplex en temps réel pour la détection des virus influenza a et b. *Pathologie Biologie* 56 (7-8): 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.07.030>
- Guo M., Feng P., Zhang L., Feng C., Fu J., Pu X. & Liu F. 2022. Rapid detection of *Clostridium tetani* by recombinase polymerase amplification using an exo probe. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (1): 91–98. <https://doi.org/10.4014/jmb.2109.09022>
- Higgins M., Stringer O.W., Ward D., Andrews J.M., Forrest M.S., Campino S. & Clark T.G. 2022. Characterizing the impact of primer-template mismatches on recombinase polymerase amplification. *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–1216. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005>
- Jaeger K.-E., Liese A. & Syldatk C. (eds) Anon. 2018. *Einführung in die enzymtechnologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Jiang N., Tansukawat N.D., Gonzalez-Macia L., Ates H.C., Dincer C., Güder F., Tasoglu S. & Yetisen A.K. 2021. Low-cost optical assays for point-of-care diagnosis in resource-limited settings. *ACS Sensors* 6 (6): 2108–2124. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00669>
- Johansson M.K. & Cook R.M. 2003. Intramolecular dimers: A new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry - A European Journal* 9 (15): 3466–3471. <https://doi.org/10.1002/chem.200304941>
- Li J., Macdonald J. & Stetten F. von 2019. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *The Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>
- Liang L.-G., Zhu M., He R., Shi D.-R., Luo R., Ji J., Cheng L.-F., Lu X.-Y., Lu W., Liu F.-M., Wu Z.-G., Wu N.-P., Chen H., Chen Z. & Yao H.-P. 2022. Development of a multi-recombinase polymerase amplification assay for rapid identification of COVID-19, influenza a and b. *Journal of Medical Virology* 95 (1). <https://doi.org/10.1002/jmv.28139>
- Lillis L., Siverson J., Lee A., Cantera J., Parker M., Piepenburg O., Lehman D.A. & Boyle D.S. 2016. Factors influencing recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>
- Linhart C. & Shamir R. 2005. The degenerate primer design problem: Theory and applications. *Journal of Computational Biology* 12 (4): 431–456. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>
- Liu X., Yan Q., Huang J., Chen J., Guo Z., Liu Z., Cai L., Li R., Wang Y., Yang G. & Lan Q. 2019. Influence of design probe and sequence mismatches on the efficiency of fluorescent RPA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (6). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2620-2>
- Lobato I.M. & OSullivan C.K. 2018. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent

- advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
- Lutz S., Weber P., Focke M., Faltin B., Hoffmann J., Müller C., Mark D., Roth G., Munday P., Armes N., Piepenburg O., Zengerle R. & Stetten F. von 2010. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab on a Chip* 10 (7): 887. <https://doi.org/10.1039/b921140c>
- Marshall O.J. 2004. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20 (15): 2471–2472. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
- McCauley J.W. & Mahy B.W.J. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochemical Journal* 211 (2): 281–294. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>
- Modrow S., Falke D., Truyen U. & Schätzl H. 2010. *Molekulare virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moody C., Newell H. & Viljoen H. 2016. A mathematical model of recombinase polymerase amplification under continuously stirred conditions. *Biochemical Engineering Journal* 112: 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.017>
- Nakauchi M., Takayama I., Takahashi H., Oba K., Kubo H., Kaida A., Tashiro M. & Kageyama T. 2014. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza b virus yamagata and victoria lineages. *Journal of Virological Methods* 205: 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.04.016>
- NCIRD 2021. [National center for immunization and respiratory diseases \(u.s.\)](#). *Research use only CDC flu SC2 multiplex assay primers and probes*.
- Ngaosuwankul N., Noisumdaeng P., Komolsiri P., Pooruk P., Chokephaibulkit K., Chotpitayasunondh T., Sangsajja C., Chuchottaworn C., Farrar J. & Puthavathana P. 2010. Influenza a viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virology Journal* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/1743-422x-7-75>
- Ni M., Xu H., Luo J., Liu W. & Zhou D. 2021. Simultaneous detection and differentiation of SARS-CoV-2, influenza a virus and influenza b virus by one-step quadruplex real-time RT-PCR in patients with clinical manifestations. *International Journal of Infectious Diseases* 103: 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.027>
- Paterson R.G., Takeda M., Ohigashi Y., Pinto L.H. & Lamb R.A. 2003. Influenza b virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology* 306 (1): 7–17. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00083-1)
- Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L. & Armes N.A. 2006. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology* 4 (7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Poddar S. 2000. Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus. *Molecular and Cellular Probes* 14 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0278>
- Ritz C. & Spiess A.-N. 2008. qpcR: An r package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* 24 (13): 1549–1551. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn227>
- Rödiger S., Burdukiewicz M. & Schierack P. 2015. chipPCR: An r package to pre-process raw data of amplification curves: Fig. 1. *Bioinformatics* 31 (17): 2900–2902. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics>

- Rohrman B. & Richards-Kortum R. 2015. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: A lateral flow-based method for enriching target DNA. *Analytical Chemistry* 87 (3): 1963–1967. <https://doi.org/10.1021/ac504365v>
- Saisuk W., Srisawat C., Yoksan S. & Dharakul T. 2019. Hybridization cascade plus strand-displacement isothermal amplification of RNA target with secondary structure motifs and its application for detecting dengue and zika viruses. *Analytical Chemistry* 91 (5): 3286–3293. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03736>
- Shu B., Kirby M.K., Warnes C., Sessions W.M., Davis W.G., Liu J., Wilson M.M., Lindstrom S., Wentworth D.E. & Barnes J.R. 2020. Detection and discrimination of influenza b victoria lineage deletion variant viruses by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 25 (41). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.41.1900652>
- Sollweck K., Schwaiger G. & Seidel M. 2021. A chemiluminescence-based heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification assay for the molecular detection of mycotoxin producers. *The Analyst* 146 (3): 1074–1083. <https://doi.org/10.1039/d0an02000a>
- Spieß A.-N., Deutschmann C., Burdukiewicz M., Himmelreich R., Klat K., Schierack P. & Rödiger S. 2015. Impact of smoothing on parameter estimation in quantitative DNA amplification experiments. *Clinical Chemistry* 61 (2): 379–388. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230656>
- Suwannakarn K., Payungporn S., Chieochansin T., Samransamruajkit R., Amonsin A., Songserm T., Chaisingh A., Chamnanpood P., Chutinimitkul S., Theamboonlers A. & Poovorawan Y. 2008. Typing (a/b) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza a viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods* 152 (1-2): 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.002>
- Tsou T.-P., Shao P.-L., Lu C.-Y., Chang L.-Y., Kao C.-L., Lee P.-I., Yang P.-C., Lee C.-Y. & Huang L.-M. 2012. Viral load and clinical features in children infected with seasonal influenza b in 2006/2007. *Journal of the Formosan Medical Association* 111 (2): 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2010.10.001>
- TwistDx 2018. TwistAmp assay desing manual. online Verfügbar unter: <https://www.twistdx.co.uk/support/manuals-and-software/twistamp/twistamp-assay-design-manual-v2-5/>.
- Wagenknecht H.-A. 2008. <I>fluorescent DNA base modifications and substitutes: Multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept</i>. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1130 (1): 122–130. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.001>
- Waidi Folorusno Sule D.O.O. 2020. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: Challenges and prospects. *The Pan African Medical Journal*. <https://doi.org/10.11604/pamj.suppl.2020.35.24258>
- Wang Y., Li X., Xi D. & Wang X. 2019. Visual detection of <i>fusarium proliferatum</i> based on asymmetric recombinase polymerase amplification and hemin/g-quadruplex DNAzyme. *RSC Advances* 9 (64): 37144–37147. <https://doi.org/10.1039/c9ra05709a>
- Wei S. & To S.S.T. 2003. Influence of RNA secondary structure on HEV gene amplification using reverse-transcription and nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology* 27 (2): 152–161. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00170-1](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00170-1)

- Wu C., Cheng X., He J., Lv X., Wang J., Deng R., Long Q. & Wang X. 2008. A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types a and b and subtypes H5 and N1. *Journal of Virological Methods* 148 (1-2): 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023>
- Zandieh M., Patel K. & Liu J. 2022. Adsorption of linear and spherical DNA oligonucleotides onto microplastics. *Langmuir* 38 (5): 1915–1922. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03190>