

Inhaltsverzeichnis

1	Ergebnisse	1
1.1	Entwicklung und Optimierung der Influenza B RT-RPA	2
1.1.1	Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der Influenza B Virus Standard-RNA . .	2
1.1.2	Untersuchung der Influenza B RT-RPA Primer und Sonden	3
1.1.3	Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA	3
1.1.4	Optimierung der Influenza B RT-RPA	5
1.1.5	Bestimmung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA	9
1.2	Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA	13
1.2.1	Überprüfung und Konzentrationsbestimmung Influenza A Virus Standard-RNA	13
1.2.2	Untersuchung der Influenza A RT-RPA Primer und Sonden	14
1.2.3	Optimierung der Influenza A RT-RPA	15
1.2.4	Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA	18
1.2.5	Einfluss des Sondendesigns auf die Influenza A RT-RPA	21
1.3	Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza A Virus	23
1.3.1	Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus	23
1.3.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer	23
1.3.3	Optimierung der Infb-RPA	23
1.3.4	Primerassymetrie	23
1.3.5	Sensitisanalysen und Vergleich	23
1.3.6	Spezifität	23
1.4	Influenza A	23
1.4.1	Entwicklung der InfA-RPA Primer	23
1.4.2	Optimierung der InfBARPA	24
1.4.3	Sensitivitätsanalysen und Vergleich	24
1.4.4	Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA	24
1.4.5	Spezifitätstest	24

1 Ergebnisse

Zur Detektion der Influenza A und B Viren sollte je ein isothermes Amplifikationssystem mit einem kombinierten reversen Transkriptionsschritt als RT-RPA-System entwickelt und für eine spätere POCT Anwendung optimiert werden. Zuerst wurden Primer und Sonden zur Detektion der H3N2 und H1N1 Influenza A Subtypen, sowie aller Influenza B entwickelt und diese in verschiedenen Kombinationen auf Eignung mit dem RPA-Standard Protokoll geprüft. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf den low-Volume Ansatz gelegt werden, da dieser für POCT Applikation besser geeignet ist. Zur Optimierung und Erhöhung der analytischen Sensitivität der erfolgreich getesteten Primer-Sonden-Sets wurden verschiedene Parameter wie Reaktionsvolumen, Reaktionstemperatur sowie verschiedene Mischzeitpunkt untersucht. Die ermittelten optimalen Parameter wurden in einer abschließenden Untersuchung der Sensitivität und Spezifität charakterisiert und mit entsprechenden RT-PCR-Referenzsystemen verglichen.

- Auf Eignung geprüft umschreiben

1.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza B RT-RPA

1.1.1 Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der Influenza B Virus Standard-RNA

Standardisierte Virus-RNA wurde für die Vergleichbarkeit zwischen beispielsweise der RT-PCR und der RT-RPA sowie der variierenden Parameter in einer definierten Konzentration hergestellt (Kapitel ?? - ??). Das artifizielle DNA-Plasmid mit der inserierten Influenza B-Sequenz wurde mittels Sanger-Sequenzierung überprüft (Kapitel ??, Daten nicht gezeigt). Dadurch konnten Sequenzfehler ausgeschlossen werden **und die Integrität der Virus-Sequenz bestätigt werden**. Für die *in vitro* Transkription wurde das Plasmid weiterhin durch einen Restriktionsverdau linearisiert und die Linearisierung in einem Agarose-Gel überprüft (Kapitel ??, Abbildung ??). Das linearisierte Plasmid (Spur 2) zeigt eine Bande bei ~3400 bp, was mit der Plasmidgröße von 3407 bp übereinstimmt (siehe Plasmidkarte ?? im Anhang). Das unverdaute Kontrollplasmid (Spur 3) weist eine Bande von mehr als 4000 bp auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Linearisierung durch den Restriktionsverdau erfolgreich war. Das linearisierte Plasmid wurde dann mithilfe des T7-Promotors auf dem Plasmid *in vitro* transkribiert und gereinigt (Kapitel ??). Die so synthetisierte virale RNA wurde schlussendlich mit dem RiboGreen Assay (Kapitel ??) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in ?? dargestellt. Es ergab sich eine Geradengleichung der Kalibriergerade von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99. Mithilfe der Gradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von $476.0 \pm 7,8 \text{ ng/ml}$ ermittelt und somit die Menge der synthetisierten Kopien auf $2,2 \times 10^8$ RNA-Kopien/ μl bestimmt werden.

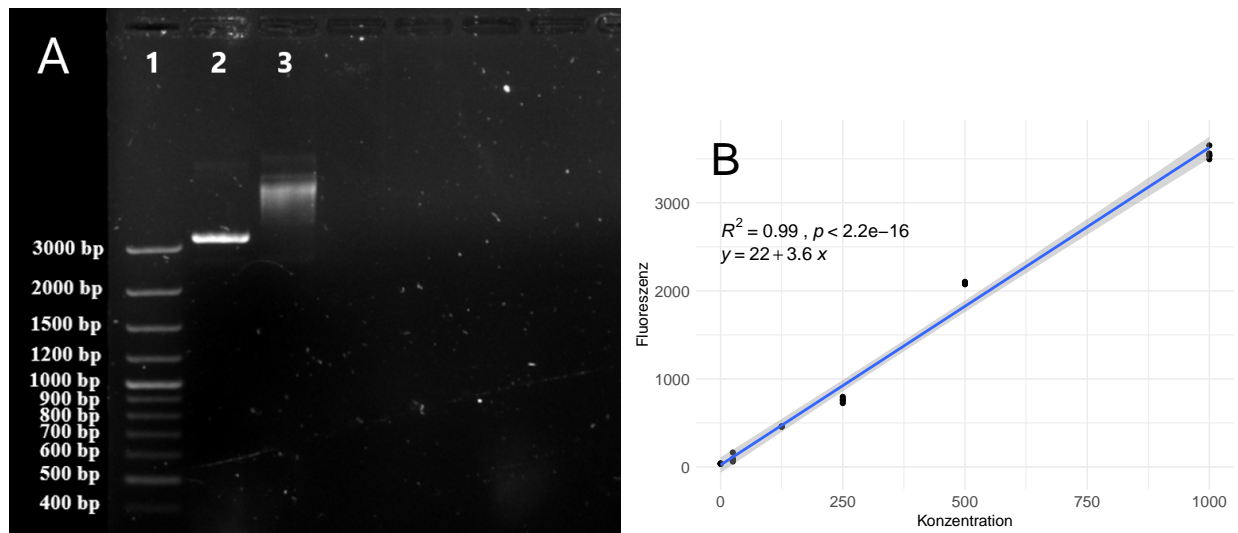


Abbildung 1: **Kontrollgel und RiboGreen Kalibrationsgerade des Influenza B Standards:**
A: DNA-Banden des Kontrollgels für die Linearisierung des Influenza B Plasmids mit verdaulichem Plasmid (2), unverdaulichem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei 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.

1.1.2 Untersuchung der Influenza B RT-RPA Primer und Sonden

Für die Pan-Influenza B RT-RPA wurden mithilfe der Software PrimedRPA insgesamt 9 verschiedene Primer und 2 Sonden ausgesucht (Kapitel ??, Tabelle ??). Aus den angegebenen Oligonukleotiden 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 anderen 8 Kombinationen setzten sich aus Sonde 3.1, Forward 3 bzw. Forward 4 und Reverse 3.3 - 3.15 zusammen.

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

Name	Sequenz (5' -> 3')	3'-Position	Modifikation
Sonde 3.1	GTTCCGTTTGGACAATAAAAAGGGATATGCG 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	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAAGGCTT	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	ATTGGGGTGTTTGAGGAATGTTCCGTTTAC	565 bp	/
reverse 3.6	ATCCATTGGGGTGTTTGAGGAATGTTCCGT	569 bp	/
reverse 3.10	CTTGTATCCATTGGGGTGTTTGAGGAATGT	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.

Zur Bestimmung einer geeigneten Primer-Sonden-Kombination wurden die 10 ausgewählten Kombinationen mittels des Standard-Protokolls der RT-RPA getestet (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten dazu sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 3.1 (grau) zeigen streuende Ansteigszeiten zwischen 3,3 min - 7,4 min und eine durchschnittliche Fluoreszenzauslenkung von rund 450 Einheiten. Die zwei Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich hingegen durch einen steileren Anstieg und höhere Fluoreszenzwerte von 900 bis über 1000 Einheiten im Vergleich zu den Kombinationen mit Sonde 3.1 aus. Bei der Kombination mit Reverse 1.1 (schwarz, durchgezogen) ist dabei ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei der Kombination mit Reverse 1.2 (schwarz, gestrichelt) beobachten. Die Mittelwerte der TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) für die jeweiligen Kombinationen liegen bei $3,33 \pm 0,07$ min (Reverse 1.1) und $4,27 \pm 0,07$ min (Reverse 1.2) und zeigen eine geringe Streuung um den Mittelwert. Alle Wasserkontrollen zeigen keine merkliche Fluoreszenzauslenkung und dementsprechend keine unspezifische Amplifikation. Durch die höhere Fluoreszenzauslenkung bei den Kombinationen mit Sonde 1.1 wurden diese den Kombinationen mit Sonde 3.1 vorgezogen. Dabei erreicht Die Kombination mit Reverse 1.2, Forward 1 und Sonde 1.1 im Verlauf der Messung eine höhere Fluoreszenzauslenkung, besitzt jedoch signifikant höhere Ansteigszeiten. Da ein zeitigerer Anstieg (d.h. niedrigere TT-Werte) auf eine schnellere Amplifikation deutet, wurde die Kombination mit Reverse 1.1, Forward 1 und Sonde 1.1 (schwarz, durchgezogen) ausgewählt und für die weiteren Influenza B RT-RPAs verwendet.

1.1.3 Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA

Wie von Kersting et al. (2014) gezeigt wurde, kann die Asymmetrie auf die RPA übertragen werden (Kersting et al. 2014). Poddar (2000) konnte zeigen, dass innerhalb der qPCR die Primerasymmetrie zu einer erhöhten Sondenhybridisierung und somit zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führt (Poddar 2000). Ziel war es den nachweis mittels Exo-Sonden in der low-volume RPA mit der Primerasymmetrie zu kombinieren und

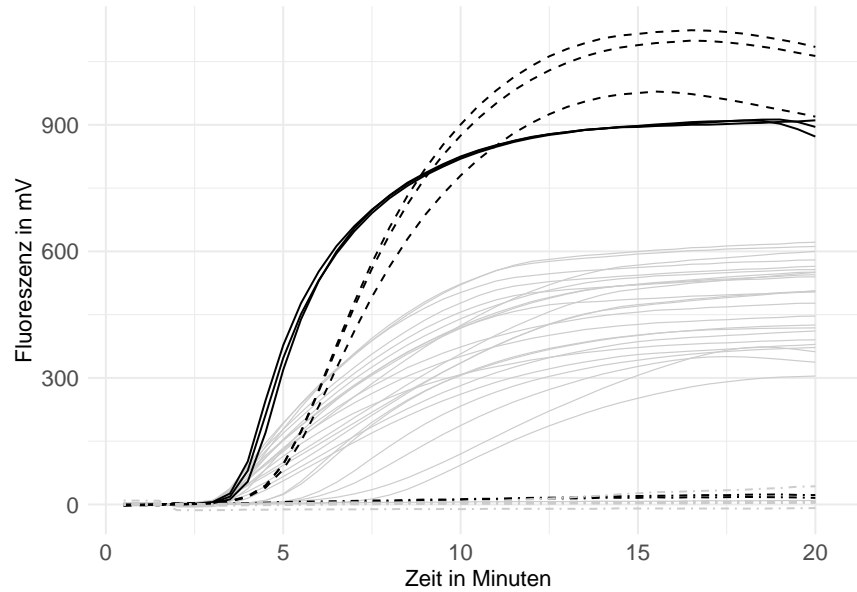


Abbildung 2: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 1 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 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.

so ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Dazu wurde eine reverse Primer-Asymmetrie (reverse Primer 2X-Konzentriert) eingeführt um den zur Sonde komplementäre Sense-Strang vermehrt zu Amplifizieren. Die Messung zusammen mit der Referenz (normale Primerkonzentration) und einer Kontrolle (aequimolare 2X Primer-Konzentration) ist in Abbildung ??A gezeigt. Durch die Einführung der reverse Primer-Asymmetrie (orange) lässt sich eine Erhöhung der Fluoreszenzauslenkung um rund 200 Einheiten im Vergleich zur Referenz (gelb, standard Primer-Konzentration) beobachten. Die Angleichung der Asymmetrie durch die Erhöhung des Forward Primers innerhalb der Kontrolle zeigt eine ähnliche Fluoreszenzauslenkung wie die Referenz. Dementsprechend weist eine generell Erhöhte Primerkonzentration keine Unterschiede in der Fluoreszenzauslenkung zur Referenz auf. Zwischen den untersuchten Primerkonzentrationen konnte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang). Die mittleren TT-Werte der einzelnen Primer-Konzentrationen liegen jeweils bei $3,40 \pm 0,14$ min (2X reverse Primer), $3,48 \pm 0,21$ min (Kontrolle)..... . Die markierte Amplifikationskurve (roter Pfeil) konnte als Ausreißer identifiziert werden und wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Eine Vermutung war, dass die Hybridisierung der Sonde an den Sense oder Anti-Sense Strang der zu amplifizierenden DNA in Verbindung mit der Primer-Asymmetrie und der daraus resultierenden erhöhten Fluoreszenzintensität steht. Um dies zu überprüfen wurde eine erneute Messreihe mit einer am entgegengesetzten (antisense) Strang hybridisierenden Sonde durchgeführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Messungen sind in Abbildung 3B 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 asymmetrisch 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 (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) mit

3,25±0,05 min als die Referenz (3,63±0,19 min) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration (3,76±0,34). Im Vergleich zum vorherigen Experiment (Abbildung ??A) wird durch die neue am antisense Strang hybridisierende Sonde die zur Fluoreszenzerhöhung führende Primer-asymmetrie umgekehrt. Somit sorgt eine erhöhte forward Primer-Konzentration zusammen mit der antisense Sonde für stärkere Fluoreszenzsignale, während die sense-Sonde zusammen mit einer erhöhten reverse Primer-Konzentration zu einer besseren Fluoreszenz führt.

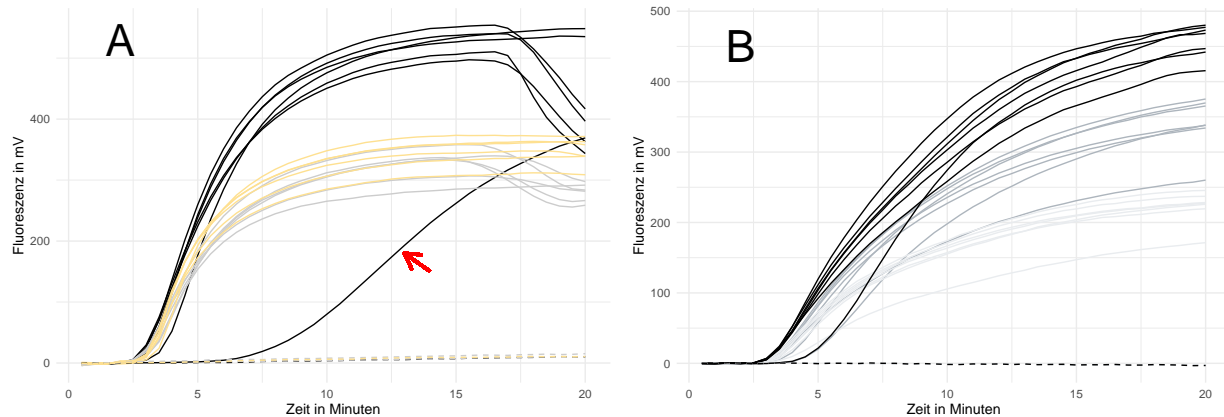


Abbildung 3: **Einfluss der Primerasymmetrie auf der RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA. **A:** Einfluss einer generellen Primer-Konzentrationserhöhung auf die Influenza B RT-RPA. Die doppelte Primer-Konzentration (jeweils 42 μ M im PSM, siehe ??) ist in Grau dargestellt, während die asymmetrische Erhöhung des Reverse Primer als Vergleich in schwarz mitgeführt ist. Alle Messungen wurden in mindestens $n=6$ durchgeführt. Über den TT-Wert konnte die markierte Amplifikation (roter Pfeil) als Ausreißer identifiziert werden. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet. **B:** Messung der Influenza B RT-RPA bei asymmetrisch erhöhter Reverse (hellgrau) und forward (schwarz) Primer-Konzentration mit der in ?? angegebenen Sonde. Als Referenz (grau) wurde eine RT-RPA mit normaler Primer-Konzentration mitgeführt. Alle Messungen wurden in $n=7$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

1.1.4 Optimierung der Influenza B RT-RPA

Verringerung des Reaktionsvolumen (low-volume Ansatz)

Wie bereits beschrieben, kann die Reduktion des Reaktionsvolumen zu einer Unabhängigkeit des Mischschrittes und einer erhöhten Sensitivität führen (Lillis et al. 2016). Neben der Kostenersparnis kann das geringe Volumen in mikrofluidische Applikationen eingebracht werden und somit für Lab-on-a-chip Applikationen innerhalb der POCT eingesetzt werden (Behrmann et al. 2020). Zur Prüfung, ob die in Kapitel 1.1.2 ausgewählte Primer-Sonden-Kombination für die POCT auf den low-volume Ansatz adaptiert werden kann, wurde eine Reduzierung des Reaktionsvolumens untersucht (Kapitel ??). In Abbildung 4 ist der Vergleich der klassischen RPA (50 μ l) zum low-volume Ansatz (6,5 μ l) bei einer Kopientahl von 10^7 RNA-Kopien/ μ l dargestellt. Der low-volume Ansatz (schwarz) zeigt im Vergleich zur Standard RT-RPA (grau) eine geringere Auslenkung der Fluoreszenz. Jedoch konnte keine signifikante Veränderung der TT-Werte zwischen den beiden Reaktionsvolumen festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) liegen bei 3,36±0,01 min (50 μ l RT-RPA) und 3,47±0,14 min (low-volume RT-RPA). Trotz der verringerten Fluoreszenzintensität wurde der low-volume -Ansatz in den folgenden Experimenten verwendet, da dieser für spätere geplante Lab-on-a-chip Applikationen besser geeignet ist und die Kostenreduzierung für Ressourcen limitierte Settings vorteilhaft ist.

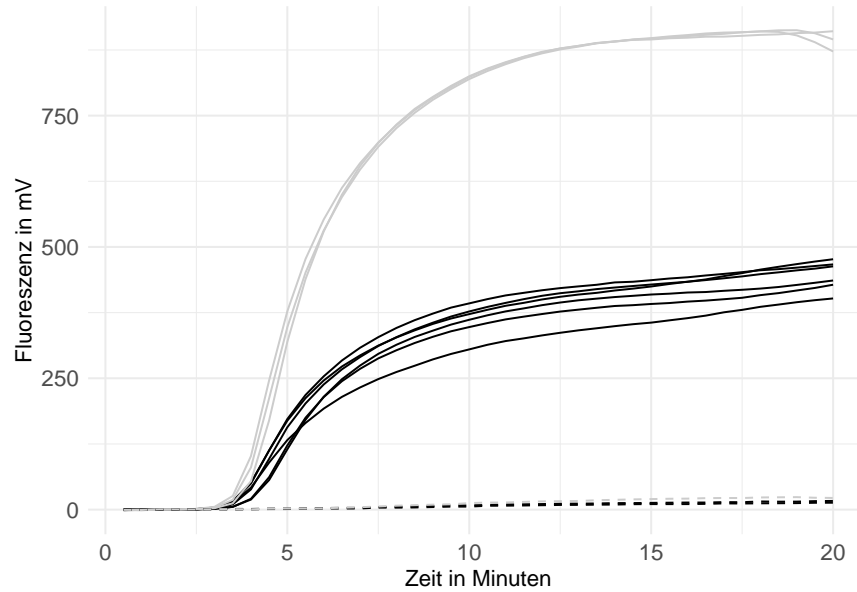


Abbildung 4: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA bei 40 °C im low-volume -Ansatz (schwarz n=6) sowie im 50 µl Ansatz (grau, n=3) sind dargestellt. Als Virus-RNA wurden 10^7 RNA-Kopien eingesetzt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Reaktionstemperatur

Das Temperaturoptimierung der RPA kann je nach System und Nachweisziel variieren (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Zur Optimierung der Reaktionstemperatur für die Influenza B RT-RPA wurden Reaktionstemperaturen zwischen 38-42 °C im low-volume Ansatz untersucht (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten dazu sind in Abbildung ??A dargestellt. Die Influenza B RT-RPA zeigt bei 38 °C (blau) einen signifikant späteren Anstieg im Vergleich zu den Reaktionen bei 40 °C (gelb) und 42 °C (orange). Die Mittelwerte der TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) für die jeweiligen Temperaturen liegen bei $5,26 \pm 0,06$ min (38 °C), $3,57 \pm 0,20$ min (40 °C) und $3,63 \pm 0,13$ min (42 °C). Zwischen den Amplifikationskurven von 40 °C und 42 °C konnten keine signifikanten Unterschiede der TT-Werte ermittelt werden. Bei der 40 °C Amplifikationskurve kann im Durchschnitt eine höhere maximale Fluoreszenzauslenkung beobachtet werden. Die Reaktionen bei 38 °C und 42 °C weisen hingegen niedrigere, jedoch ähnlich hohe Fluoreszenzauslenkungen auf. Bei den 42 °C Messdaten ist eine Abnahme der Fluoreszenz im späteren Verlauf der Amplifikation ca. 13 min) zu beobachten. Auch bei der Reaktionstemperatur von 40 °C kann bei 4 von 7 Reaktionen diese Fluoreszenzabnahme beobachtet werden, welche jedoch später (bei ca. 16 min) einsetzt. Diese Fluoreszenzabnahme im späteren Verlauf der Messung wird in dieser Arbeit als Ditching bezeichnet. Aufgrund der höchsten Fluoreszenzauslenkung, wurde die Reaktionstemperatur bei 40 °C als optimal festgelegt und für die weiteren Influenza B RT-RPAs verwendet.

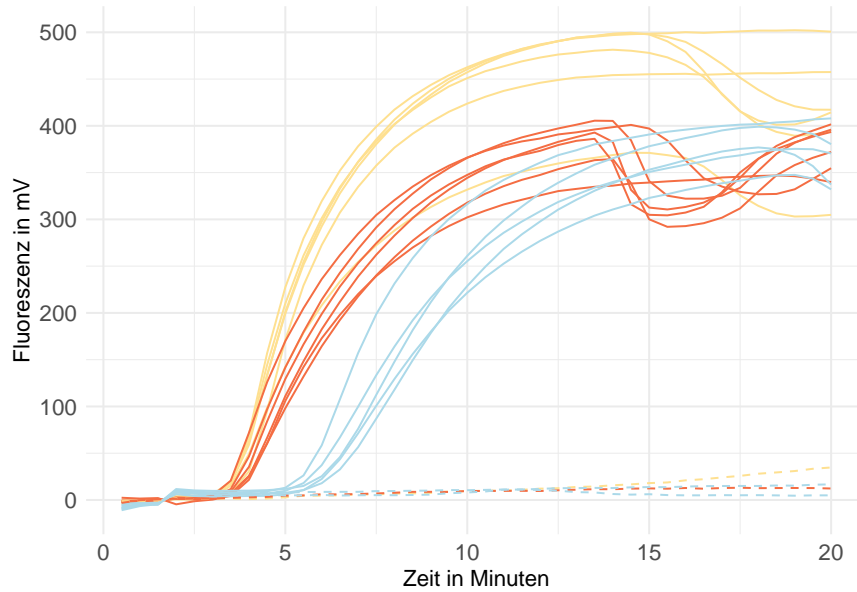


Abbildung 5: **Optimierung der Reaktionstemperatur für die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im low-volume Ansatz bei 42 °C (orange), 40 °C (gelb) und 38 °C (blau), je n=6. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Primerasymmetrie

Wie in Kapitel ?? gezeigt wurde, kann die Primerasymmetrie auf die low-volume RT-RPA angewandt werden, wo sie zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal führt. Zur Bestimmung des optimalen Asymmetrie-Verhältnis wurde eine Versuchsreihe mit einer angepassten Reverse Primer-Konzentration von 0,45 μM , 0,675 μM und 0,9 μM (entspricht 1X, 1,5X und 2X erhöhte Konzentration) im low-volume Ansatz bei 40 °C durchgeführt. Die fluoreszenzdaten sind in Abbildung ?? dargestellt. Wie zu erwarten zeigen eine asymmetrische erhöhung der Primerkonzentration eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur unveränderten Reverse Primer-Konzentration (gelb). Eine signifikante Veränderung ((statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang)) der TT-Werte konnte nicht ermittelt werden. Die mittleren TT-Werte der einzelnen Parameter liegen bei $3,39 \pm 0,07$ min (0,45 μM), $3,43 \pm 0,07$ min (0,625 μM) und $3,63 \pm 0,13$ min (0,9 μM). Die markierte Amplifikation (roten Pfeil) wurde mittels TT-Wert als Ausreißer identifiziert und ist nicht berücksichtigt. Der im vorherigen Abschnitt schon beobachtete „Ditching“-Effekt konnte bei der 0,9 μM Primerkonzentration nach etwa 12 min bei 4/6 Reaktionen beobachtet werden. Um mögliche Messartefakte zu vermeiden, wurde mit einer 0,675 μM Primerkonzentration (1,5X der Standardkonzentration) weitergearbeitet und diese als optimal festgelegt.

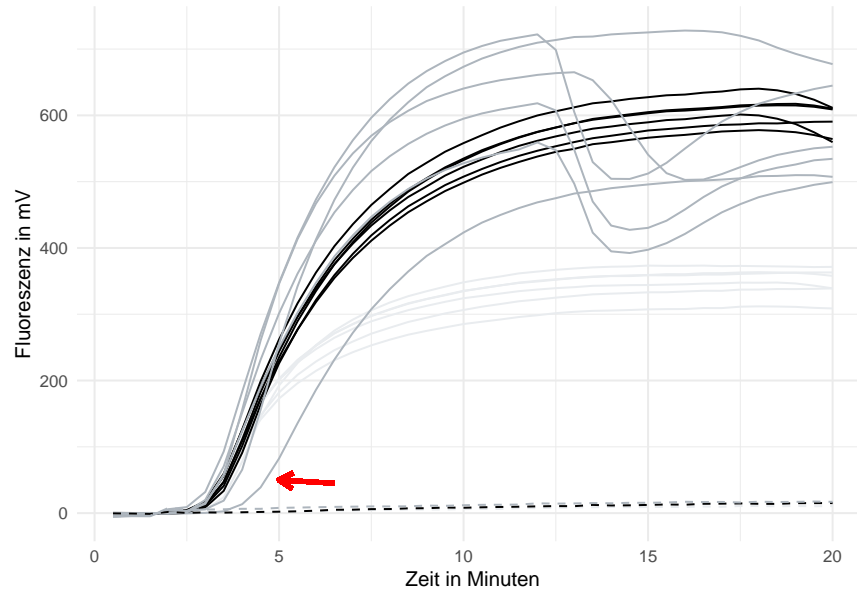


Abbildung 6: **Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im low-volume Ansatz bei einer reverse Primer-Konzentration von 0,45 μM (schwarz), 0,625 μM (blau) und 0,9 μM (grau). Messung in $n=6$ pro Primer-Konzentration. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Mischzeit

Wie in ?? beschrieben kann ein zusätzlicher Mischschritt während der Reaktion zu einer erhöhten Amplifikation und somit zu einer besseren Detektion führen. Um im asymmetrischen, low-volume Ansatz (6,5 μl) den zusätzlichen Mischschritt für die Influenza B RT-RPA als Einflussfaktor zu identifizieren wurden einerseits verschiedene Mischzeitpunkte nach 5 min, 4 min und 3 min und andererseits unterschiedliche RNA-Konzentrationen (von 10^3 Kopien bis 10^0 Kopien pro Ansatz) in den jeweiligen Reaktion untersucht (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten der Untersuchung sind in Abbildung 7A bei einer Template-Konzentration von 10^3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach drei Minuten (blau) im Vergleich zu der Referenz (ohne Mischen, gelb) ohne Mischen zu signifikant höheren TT-Werten führt und damit zu einer Verschlechterung der Amplifikation. Die TT-Werte liegen hier bei $5,90 \pm 0,19$ min (Referenz) und $7,21 \pm 0,70$ min (Mischen nach 3 min), wobei der Mischschritt nach 3 Minuten eine große Streuung der TT-Werte um den Mittelwert aufweist. Die Mischzeiten nach vier Minuten (orange) und fünf Minuten (rot) weisen jeweils signifikant niedrigere TT-Werte zur Referenz auf, sind jedoch untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Demnach liegen die Zusammengefassten TT-Werte der beiden Mischzeiten bei $5,04 \pm 0,19$ min. Die statistische Auswertung ist in Tabelle ?? im Anhang gezeigt. Der Mischzeitpunkt nach fünf Minuten zeigt im Vergleich zu dem Mischzeitpunkt nach 4 Minuten eine höhere maximale Fluoreszenzauslenkung und wurde aus diesem Grund als Optimal festgelegt und näher untersucht.

Damit der Einfluss des Mischzeitpunktes auf die low-volume RT-RPA bei geringen RNA-Konzentration untersucht werden kann, wurde eine Konzentrationsreihe mit absteigenden RNA-Konzentrationen (10^2 , 10^1 , 10^0 RNA-Kopien pro Ansatz) und dem Mischzeitpunkt nach fünf Minuten durchgeführt und mit der ungemischten Referenz verglichen (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 7B-D dargestellt. Bei 10^2 Kopien/Ansatz zeigen die Reaktionen mit Mischschritt (rot) signifikant niedrigere TT-werte ($6,53 \pm 0,25$

min) als die Referenz (gelb) ohne zusätzlichen Mischschritt ($7,35 \pm 0,58$ min, statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang). Ein Ditching Effekt nach ≈ 16 Minuten konnte hier bei 6/7 Reaktionen beobachtet werden, wodurch die maximalen Fluoreszenzauslenkungen bei beiden Versuchreihen ähnlich sind.

Beim Experiment mit 10^1 Kopien/Ansatz zeigt der Mischschritt (rot) eine deutlich erhöhte Fluoreszenzauslenkung im Vergleich zur Referenz (gelb). Des Weiteren konnte die Sensitivität von 3/7 positive Reaktionen (ohne Mischen) auf 7/7 positive Reaktionen (Mischen nach 5 min) erhöht werden.

Bei 10^0 RNA-Kopien/Ansatz wurde mit Mischschritt (rot) 1/6 Reaktion als positiv gewertet, während ohne Mischschritt keine positive Reaktion festgestellt wurden.

Da alle Messungen der Mischzeit im low-volume Ansatz durchgeführt wurden, wurde der Einfluss des Mischschrittes nach 5 min auch im 50 μ l Ansatz untersucht. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung ?? im Anhang dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein Mischschritt nach fünf Minuten (rot) bei 10^4 RNA-Kopien zu einer deutlichen Verringerung der TT-Werte und zu einer höheren Fluoreszenzauslenkung führt. Dementsprechend konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) mit $6,48 \pm 0,01$ min (ohne Mischen, gelb) und $5,21 \pm 0,03$ min (mit Mischen, rot) festgestellt werden. Des Weiteren zeigt der Mischschritt einen steileren Fluoreszenzanstieg als die ungemischte Referenz.

1.1.5 Bestimmung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA

Die Sensitivität für die Influenza B RT-RPA wurde mit den ermittelten optimalen Reaktionsparametern (40 °C, 1,5X reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 5 min) bestimmt und die Daten von den Standardvolumenansatz (50 μ l) und low volume gegenübergestellt (Kapitel ??). In Abbildung 8 sind die Fluoreszenzdaten der dekadischen Verdünnungsreihe von $2 \cdot 10^7$ bis $2 \cdot 10^1$ RNA-Kopien (Abbildung 8A, 8B) sowie das mittels Probit-Analyse (Kapitel ??) berechnete Detektionslimit (Abbildung 8C, 8D) und die jeweiligen Kalibriergeraden (Abbildung 8E, 8F). Für die Standard-volumen Influenza B RT-RPA konnte ein 95%-iges Detektionslimit von 31,6 Virus RNA-Kopien berechnet werden. Die Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit wurde mit einem $R^2 = 0,93$ und einer Geradengleichung von $y = 11 - 1,3x$ bestimmt. Der angegebene p-Wert mit $\ll 0,05$ zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang.

Die Sensitivität für den low-volume Ansatz der Influenza B RT-RPA zeigte ein berechnetes Detektionslimit von 14,6 Kopien. Die erstellte Kalibriergerade für die TT-Werte besitzt ein R^2 von 0,92 und eine Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$. Über den Boxplot-Test ermittelte Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 8B) wurden nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert $\ll 0,05$ zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang. Die RT-RPA zeigt im low-volume Ansatz eine Erniedrigung des Detektionslimits um 15 Kopien bzw. 54 %.

Ein Vergleich zur PCR als Goldstandard-Methode zeigt ein berechnetes Detektionslimit der RT-PCR bei 11,4 Kopien in der Probitanalyse. Somit liegt die Detektionsgrenze des PCR-Systems 3,2 Kopien bzw. 22 % unter der optimierten RT-RPA im low-volume Ansatz.

Die Ermittlung der Sensitivität für die Influenza B RT-RPA erfolgte mit den im Kapitel 1.1.4 ermittelten optimalen Reaktionsparametern nach beschriebener Methode (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung sowie das mithilfe der Probit-Analyse (siehe ??) ermittelte Detektionslimit sind in Abbildung 8 gezeigt. Für die Influenza B RT-RPA konnte berechnet werden, dass das System mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit 31,6 Virus RNA-Kopien detektieren kann. Des Weiteren konnte eine Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit mit einem $R^2 = 0,93$ und einer Geradengleichung von $y = 11 - 1,3x$ ermittelt werden. Der angegebene p-Wert ist $\ll 0,05$ was einen signifikanten linearen Zusam-

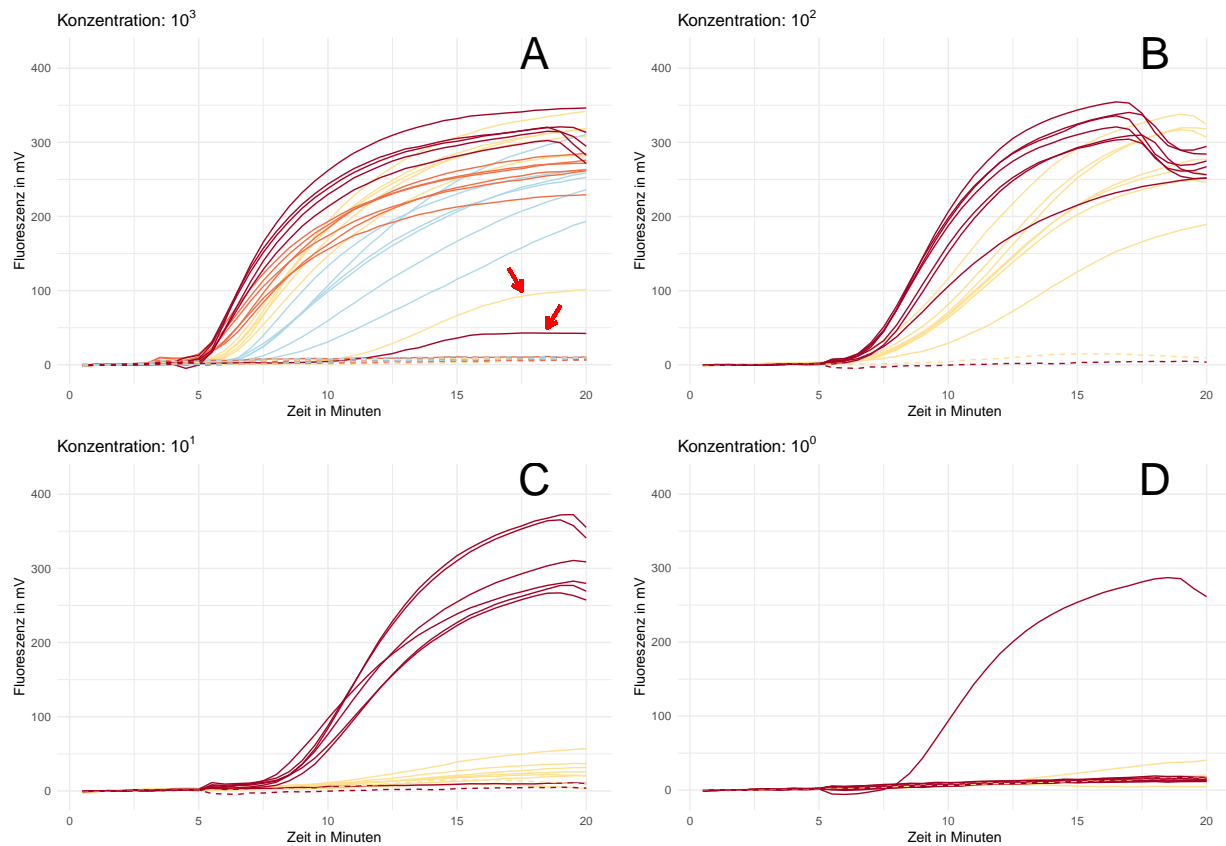


Abbildung 7: **Einfluss der Mischzeit auf die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der RT-RPA sind gezeigt, die bei A) 10^3 , B) 10^2 , C) 10^1 und D) 10^0 Kopien/Ansatz einen zusätzlichen Mischschritt im Vergleich zur RT-RPA ohne Mischschritt zeigen

A: RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min (rot), 4 min (orange), 3 min (blau) sowie der Referenz ohne Mischen (gelb) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Alle Messungen wurden in n=6 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) dargestellt.

B Vergleich zwischen der Influenza B RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschrittes nach 5 min (schwarz) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (grau) bei eingesetzten 10^2 RNA-Kopien/ μ l. Messung in n=7 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

C,D: Vergleich zwischen der Influenza B RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschrittes nach 5 min (schwarz) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (grau) bei eingesetzten 10^1 RNA-Kopien/ μ l (C) und 10^0 RNA-Kopien (D). Messung in n=6 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

menhang aussagt.

Zusätzlich wurde die Sensitivität für den low-volume Ansatz der Influenza B RT-RPA mit den gleichen Reaktionsparametern ermittelt und ein Vergleich zu dem 50µl Ansatz gezogen. Die Messung erfolgte nach der beschriebenen Methode (siehe ??). Es konnte ein Detektionslimit von 14,6 Kopien ermittelt werden. Die erstellte Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit besitzt ein R^2 von 0,92 und eine Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$. Die über den Boxplot-Test (siehe ??) ermittelten Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 8B) wurden innerhalb der Kalibriergerade nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert ist ebenfalls $\ll 0,05$ was einen signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Für die RT-RPA im low-volume Ansatz konnte eine Verbesserung des Detektionslimits um 15 Kopien beziehungsweise 54 % nachgewiesen werden.

Damit ein Vergleich zur PCR als Standardmethode in der Diagnostik herangezogen werden kann wurde die in ?? beschriebene RT-PCR für das Influenza B Virus auf die Sensitivität getestet (Kapitel ??). Das Detektionslimit der RT-PCR liegt bei 11,4 Kopien. Somit liegt die Detektionsgrenze des PCR-Systems 22 % bzw. 3,2 Kopien unter der optimierten RPA im low-volume Ansatz.

Damit untersucht werden kann, ob ein humaner Nukleinsäurehintergrund das Detektionslimit der optimierten low-volume RT-RPA verändert wurde eine weitere Sensitivitätsanalyse mit Referenzproben (extrahierte humane Nukleinsäure mit zugesetztem RNA-Standard, Kapitel ??) durchgeführt. Zusätzlich zu der Wasserkontrolle wurde eine Referenzprobe ohne zugesetzte virale RNA mitgeführt, um unspezifische Reaktionen zu analysieren. Um die humane Hintergrund-DNA zu Quantifizieren wurde die DNA-Konzentration der Kontrollproben mit dem NanoDrop (n=3) bestimmt. Es konnte eine DNA-Konzentration von $43,58 \pm 6,00$ ng/µl ermittelt werden. Es konnten alle Proben mit einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/µl detektiert werden, jedoch keine der Proben mit 10^2 RNA-Kopien. Somit konnte ein Detektionslimit von 1397 Kopien berechnet werden. Unspezifische Reaktionen in den Wasserkontrollen bzw. Referenzproben ohne virale RNA wurden nicht beobachtet.

Zur besseren Übersicht ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Vergleich der verschiedenen Sensitivitätsmessungen der Influenza B RT-RPA

Messung	Ermitteltes Detektionslimit
RT-RPA im 50 µl Ansatz	31,6 RNA-Kopien
RT-RPA im low-volume Ansatz	14,6 RNA-Kopien
RT-PCR	11,4 RNA-Kopien
RT-RPA im low-volume Ansatz in simulierten Kontrollproben	1397 RNA-Kopien

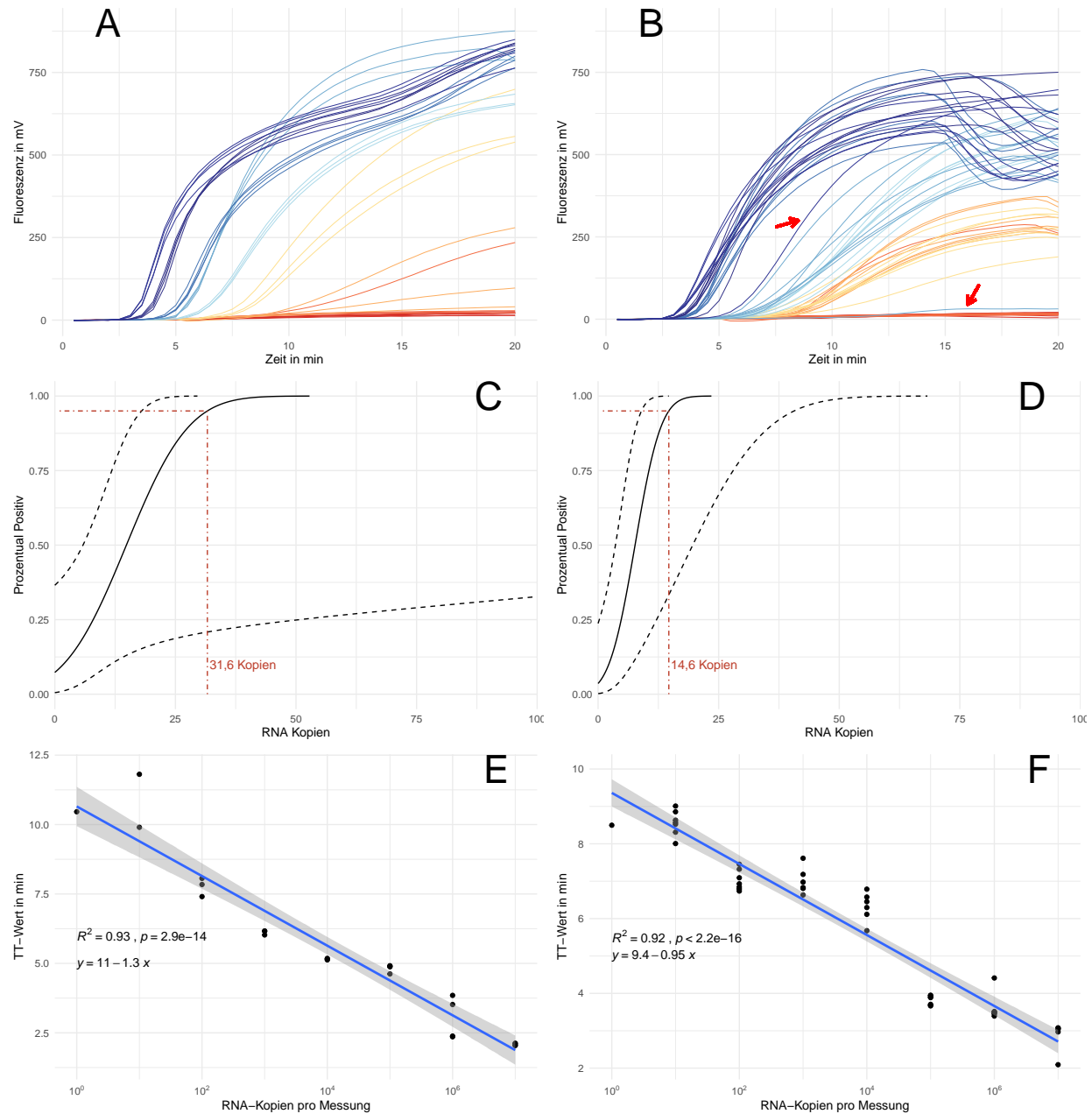


Abbildung 8: Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA:

A,B: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 und 10^0 RNA-Kopien pro Messung sowie **Negativkontrollen** für den 50 µl Ansatz (A) und den low-volume Ansatz (B). Jede Verdünnung wurde mit mindestens n=3 (50 µl Ansatz) bzw. n=7 (low-volume Ansatz) gemessen. Ausreißer des low-volume Ansatzes bei 10^7 und 10^4 (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

C,D: Probit-Analyse der Amplifikationsdaten für den 50 µl Ansatz (C) und den low-volume Ansatz (D). Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, den Probit-Regressiongraph der RT-RPA. Die schwarzen gestreiften Linien beschreiben das obere und untere Konfidenzintervall der Probit-Regression. Die rot gestreifte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind.

E,F: Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß und p-Wert für den 50 µl Ansatz (E) und den low-volume Ansatz (F). Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte der Ausreißer sowie von negativen Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht dargestellt.

1.2 Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA

1.2.1 Überprüfung und Konzentrationsbestimmung Influenza A Virus Standard-RNA

Damit die Gruppe der Influenza A Viren ausreichend untersucht und abgedeckt werden kann, wurden RNA-Standards von den aktuell vorherrschenden Subtypen H1N1 und H3N2 erstellt (Kapitel ?? - ??).

Die artifiziellen Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung (Kapitel ??) untersucht. Es konnten keine Sequenzfehler innerhalb der Virus-Sequenz festgestellt werden. In Vorbereitung für die *in vitro* Transkription wurden die Plasmide über einen Restriktionsverdau linearisiert (Kapitel ??). Das Agarose-Gel zur Prüfung der Linearisierung ist in Abbildung ?? gezeigt. Die verdauten Plasmide (Spur 2, Spur 4) weisen eine DNA-Bande bei ≈ 3300 bp. Dieses stimmt mit der Plasmidgröße von 3343 bp für beide Plasmide überein (siehe Plasmidkarten ??, ?? im Anhang). Die ungeschnittenen Kontrollplasmide (Spur 3, Spur 5) zeigen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf. Dies lässt auf eine erfolgreiche Linearisierung der Plasmide schließen. Die lineare Plasmid-DNA wurde mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7 Promotor *in vitro* transkribiert und gereinigt. Die artifiziell erstellte virale RNA wurde mittels RiboGreen Assay quantifiziert (Kapitel ??). Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 9B dargestellt. Es konnte eine Geradengleichung von $y = -190 + 3,8x$ mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,99 errechnet werden. Mithilfe dieser konnten für die viralen RNA's Konzentration von $365,3 \pm 32,4$ ng/ml (H1N1-Subtyp) beziehungsweise $247,9 \pm 22,1$ ng/ml (H3N2-Subtyp) ermittelt werden. Somit konnten entsprechende RNA-Kopienanzahlen von $2,0 \cdot 10^8$ (H1N1-Subtyp) und $1,4 \cdot 10^8$ (H3N2-Subtyp) Kopien/ μ l erhalten werden.

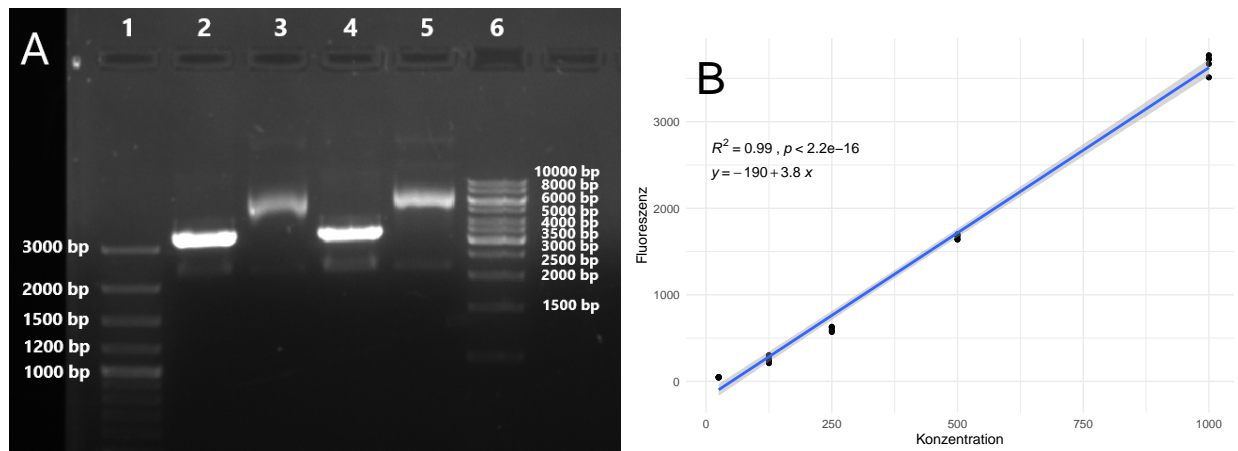


Abbildung 9: **Kontrollgel der Plasmidlinearisierung und RiboGreen Kalibrationsgerade der Influenza A Standardherstellung:**

A: DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdauten Plasmids des H3N2 Standards (2) mit unbehandelter Kontrolle (3) sowie behandeltem Plasmid des H1N1 Standards (4) mit unverdautem Kontrollplasmid (5). Die Mitgeführten DNA-Leitern sind in Spur 1 (100 bp plus DNA-Leiter) und 6 (1 kb DNA-Leiter). Bild digital bearbeitet.

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.

1.2.2 Untersuchung der Influenza A RT-RPA Primer und Sonden

Für die Influenza A RT-RPA wurden mithilfe des PrimedRPA-Programms 8 Primer und 2 Sonden ausgewählt (Kapitel ??, Tabelle @ref(tab:...)). Daraus konnten mit Sonde 3 zwei Kombinationen bestehend aus Forward 3 und Reverse 3.1 und 3.2 und mit Sonde 1 sechs Kombinationen mit Forward 1 oder 2 zusammen mit Reverse 1.1 - 1.8 gebildet werden.

Tabelle 3: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA

Name	Sequenz (5'->3')	3'-Position	Modifikation
Mit PrimedRPA designte Primer (siehe ??)			
Sonde 1.2	GGCTCTCATGGAATGGTTAAAGACAAGACCAAT 12 T 3 GTCACCTYTGACTA	182 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 3.1	GGRAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATG 12 A 3 TGGCTAAAGACAA	158 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Forward 1	CCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTKG	98 bp	
Forward 2	CTTCTTACCGAGGTCGAAACGTATGTTCT	48 bp	
Forward 3	GGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACT	96 bp	
Reverse 1.1	GCACGGTGAGCGTGAACACAAACCTAAAA	189 bp	
Reverse 1.4	TGGGCACGGTGAGCGTGAACAAAMCCTA	192 bp	
Reverse 1.8	AGCGTCTACGCTGCAGCCCTCGTCACTGG	219 bp	
Reverse 3.1	AAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACARAATTGG	161 bp	
Reverse 3.2	CCTAAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACAAARAT	164 bp	
Primer/Sonden modifiziert nach Ehnts (2013)			
Sonde E	TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAA 12 Y 3 TGTCACCTCTGACTAAGGG	186 bp	Fluorophor: FAM/ Atto-565 Quencher: BMQ-535**
Forward E	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGY	149 bp	
Forward E.2	RAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	148 bp	
Forward E.3	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	148 bp	
Reverse E	CGTCTACGCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA	216 bp	

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

Zur Ermittlung einer geeigneten Primer-Sonden-Kombination wurden die insgesamt 8 Kombinationen in der Standard RPA auf Amplifikation bei einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien pro Ansatz getestet (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 10 in Grau gezeigt. Es ist zu erkennen, dass alle gewählten Primer/Sonden-Kombinationen einen linearen Fluoreszenzverlauf mit einem Anstieg zwischen 7-10 Minuten und einer maximalen Fluoreszenzauslenkung um 100-150 Einheiten aufweisen. Von den untersuchten Kombinationen konnten drei von acht keine positiven Amplifikationen aufweisen. Da die Fluoreszenzdaten aller untersuchten Primer-Sonden-kombinationen Ähnlichkeiten aufweisen wurde keine der Kombination als passen gewählt. Alternativ wurde die bereits beschriebene Primer-Sonden-Kombination von Ehnts (2013) mit degenerierten Basen modifiziert und auf Amplifikation getestet (Ehnts 2013). Aufgrund einer degenerierten Base am 3'-Ende des forward Primers wurde die Kombination um zwei weitere alternative Forward Primer (Forward E.2 und Forward E.3) ergänzt und ebenfalls untersucht (siehe Tabelle 3). Die Fluoreszenzdaten der drei neuen Primer/Sonden-Kombinationen sind in Schwarz in Abbildung 10 dargestellt. Die Ehnts-Kombinationen besitzen im Durchschnitt eine maximale Fluoreszenzauslenkung von ≈ 750 Einheiten und erreichen höhere Werte als die PrimedRPA-Kombinationen. Dabei zeigen die Kombination mit den alternativen forward Primer (schwarz, gestrichelt und schwarz, gepunktet) niedrigere Fluoreszenzauslenkungen als die Kombination mit dem Forward E Primer (schwarz, durchgezogen). Des Weiteren beistzen die Ehnts-Kombinationen niedrigere TT-Werte mit $3,18 \pm 0,08$ min als die PrimedRPA-Kombinationen wobei kein signifikanter Unterschied (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) zwischen den Ehnts-Kombinationen ermittelt werden konnte. Aufgrund der höchsten Fluoreszenzauslenkung wurde die Primer-Sonden-Kombination bestehend aus Forward E, Reverse E und Sonde E ausgewählt und für alle weiteren Influenza B RT-RPA verwendet.

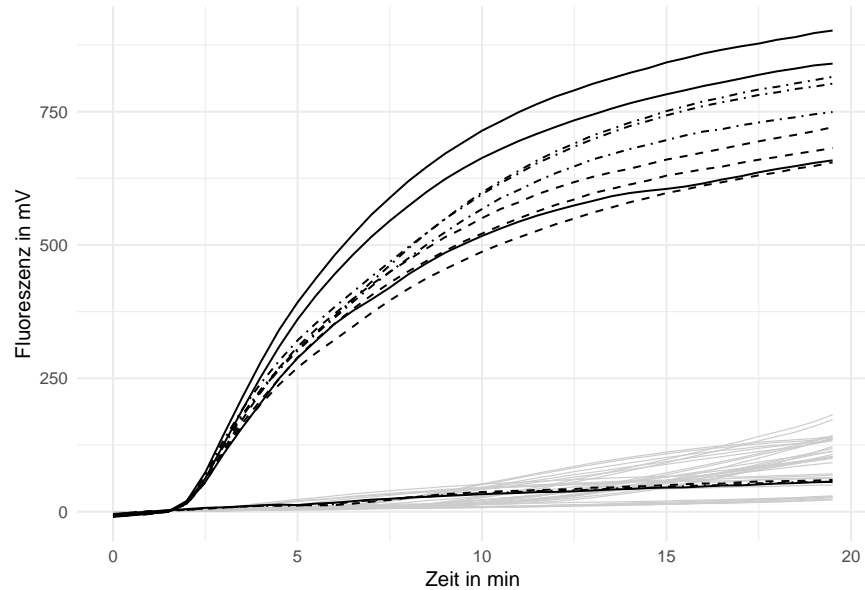


Abbildung 10: **Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 3 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen der mit PrimedRPA designten Primer und Sonden sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen abstammend vom entwickelten System von Ehnts (2013) sind in **Schwarz** dargestellt, wobei die Kombination mit Forward E in **schwarz** (—), die Kombination mit Forward E.2 in **schwarz** (- - -) und die Kombination mit Forward E.3 in **schwarz** (. . .) abgebildet sind. Alle Negativkontrollen sind mit (· - ·) gekennzeichnet.

1.2.3 Optimierung der Influenza A RT-RPA

Verringerung des Reaktionsvolumen

Die low-volume Applikation der RPA bietet, wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben, für die POCT relevante Vorteile und kann in Lab-on-a-chip System für eine vereinfachte Handhabung eingesetzt werden. Zur Prüfung ob die in Kapitel 1.2.2 gewählte Primer-Sonden-Kombination auf den low-volume Ansatz adaptiert werden können, wurde ein Vergleich zwischen der Standard RPA (50 μ l, grau) und dem low-volume Ansatz (6,5, schwarz) bei einer eingesetzten Kopienzahl von 10^8 RNA-Kopien/ μ l durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in 11 dargestellt. Der low-volume Ansatz zeigt eine niedrigere Fluoreszenzauslenkung sowie signifikant höhere TT-Werte (4, 19 ± 0 , 43 min) als die Standard-RPA (3, 17 ± 0 , 12 min, statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang). Somit zeigt der low-volume Ansatz eine schlechtere Amplifikation als die Standard-RPA. Des Weiteren weist der Fluoreszenzgraph der low-volume RPA einen untypischen linearen Verlauf auf. Aus diesem Grund wurde eine Adaption an den low-volume Ansatz als Nachteilig eingestuft und nicht weiter verfolgt.

Optimierung der Reaktionstemperatur

Unterschiedliche Reaktionstemperaturen können, wie am Beispiel der Influenza B RT-RPA zu sehen (Kapitel 1.1.4) einen Einfluss auf die Amplifikation der RT-RPA ausüben. Zur Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur der Influenza A RT-RPA wurde das Temperaturintervall zwischen 38 °C und 42 °C innerhalb der Standard-RPA (50 μ l) bei 10^8 Kopien pro Ansatz untersucht (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten der Temperaturoptimierung bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (grau) und 42 °C (schwarz) sind in Abbildung 12A dargestellt. Es ist zu beobachten, dass eine höhere Reaktionstemperatur zu niedrigeren TT-Werten führt. So

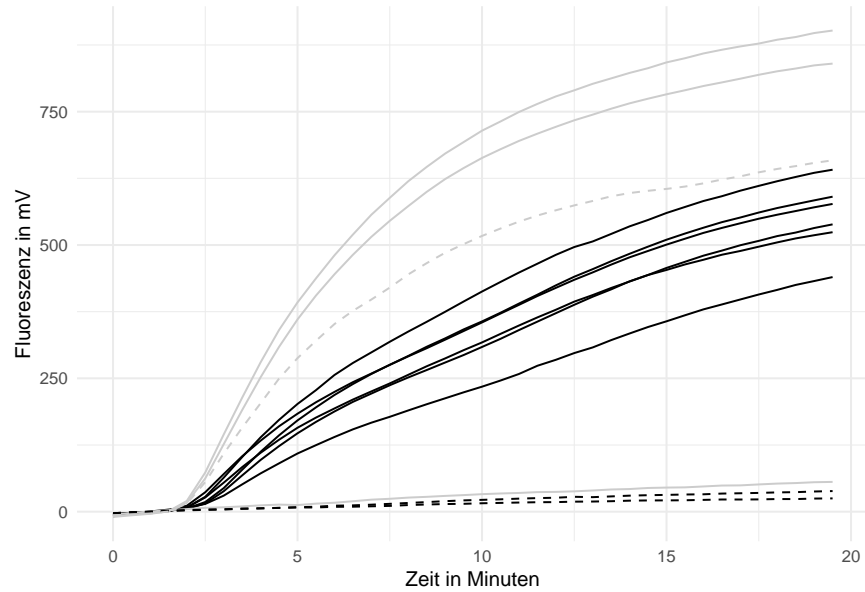


Abbildung 11: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im low-volume-Ansatz (schwarz) bei 42 °C in n=6 (siehe ??) mit dem in 1.2.2 angegebenen Primer-Sonden-Set. Als Virus-RNA wurden 10^8 RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 µl Ansatz (grau) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

gibt es signifikante Unterschiede (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) zwischen allen untersuchten Reaktionstemperaturen, wobei 42 °C die niedrigsten TT-Werte mit $3,69 \pm 0,11$ aufweist. Die RT-RPAs bei 40 °C und 38 °C besitzen TT-Werte von $4,28 \pm 0,12$ min (40 °C) und $4,76 \pm 0,11$ min (38 °C). Die Reaktion bei 38 °C zeigt eine niedrigere durchschnittliche Fluoreszenzauslenkung von ≈ 700 Einheiten während die Reaktionen bei 40 °C und 42 °C mit einer Ausnahme bei 42 °C maximale Fluoreszenzwerte von über 1000 Einheiten aufweisen. Aufgrund der niedrigsten TT-Werte und dementsprechend zeitigsten Anstieg wurde eine Reaktionstemperatur von 42 °C als optimal gewählt und für die weiteren Influenza A RT-RPAs verwendet.

Optimierung der Primer-Konzentration

Wie in den Kapitel 1.1.4 und ?? gezeigt führt eine asymmetrische Erhöhung der Reverse Primer-Konzentration zu höheren Fluoreszenzwerten. Um diesen Effekt für die Influenza A RT-RPA zu nutzen wurde eine Optimierung der asymmetrischen Primer-Konzentration für 1,5X Erhöht () und 2X Erhöht () in der Standard-RPA bei 42 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 12B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Reverse Primer-Konzentration wie erwartet zu einer Erhöhung der maximalen Fluoreszenzintensität führt. So ist eine Erhöhung der Fluoreszenz zwischen der 1,5X erhöhten Primer-Konzentration (schwarz) und der Referenz mit normaler Primer-Konzentration (hellgrau) um rund 750 Einheiten zu beobachten. Eine weitere Erhöhung um rund 300 Fluoreszenzeinheiten ist bei der 2x erhöhten Reverse Primer-Konzentration zu sehen. Ein Vergleich der TT-Werte war durch die begrenzte Probenanzahl nicht möglich. Alle TT-Werte liegen um $3,71 \pm 0,27$ min und keine markanten Unterschiede sind zu erkennen. Des Weiteren zeigt die 2X erhöhte reverse Primer-Konzentration ein anfängliches Dichting (markiert durch den roten Pfeil). Um dieses bei zukünftigen Messungen zu vermeiden, wurden eine 1,5-fach erhöhte Reverse Primer-Konzentration als Optimal festgelegt und für die weiteren RT-RPAs

verwendet.

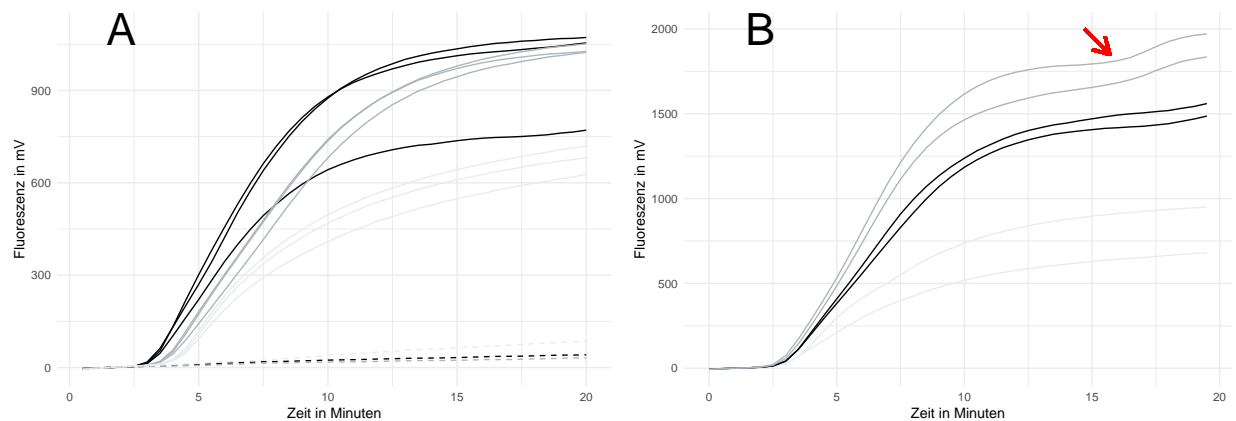


Abbildung 12: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerasymmetrie der Influenza A RT-RPA**: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 50 µl Ansatz. **A**: Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (grau) und 42 °C (schwarz). Messung in n=3 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B**: Optimierung der Primerasymmetrie mit 1,5-fach erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2-fach erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=2 pro Konzentration. Der rote Pfeil zeigt anfängliches Ditching bei der 2-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration.

Optimierung Mischen

Wie in Kapitel @Ref(...) beschrieben führt ein zusätzlicher Mischschritt zu einer besseren Amplifikation. Für die Optimierung des Mischschrittes für die Influenza A RT-RPA wurden 5 Messungen bei den Mischzeitpunkten 7 min, 5 min, 3 min, 2 min und 90 sek durchgeführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 13 gezeigt. Wie in Abbildung 13A zu sehen, führen die Mischzeiten bei 5 min (grau, durchgezogen) und 7 min (schwarz, durchgezogen) zu einer deutlich niedrigeren Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz ohne Mischen (grau, gestrichelt). Dabei hebt sich die RT-RPA mit einem Mischschritt nach 7 Minuten nicht von den mitgeführten Negativkontrollen ab und weist in der Auswertung (siehe ??) keine positive Reaktion auf. Die RT-RPA-Reaktionen mit einem Mischschritt nach 5 Minuten zeigen in der Auswertung positive Amplifikationen, weisen jedoch mit TT-Werten von $15,04 \pm 1,53$ min signifikant höhere TT-Werte als die Referenz ($9,05 \pm 0,58$ min) auf. Des Weiteren ist ein plötzlicher Abfall der Fluoreszenz bei den beiden Messreihen (markiert durch einen roten Pfeil) zu erkennen, welcher jedoch nicht als Ditching bewertet wird sondern von der Unterbrechung der Messung zusammen mit dem Mischschritt herrührt. Die Messungen mit einem Mischschritt nach 3 Minuten zeigen im Gegensatz zu den Messungen mit einem Mischen nach 5 min beziehungsweise 7 min ähnliche Fluoreszenzwerte wie die Referenz. Ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten konnte nicht festgestellt werden. Werden die Mittelwerte der beiden Messreihen mit $9,05 \pm 0,58$ min (Referenz) und $8,00 \pm 0,73$ min (Mischen nach 3 min) einzeln betrachtet ist ein zeitigerer jedoch nicht signifikanter Anstieg bei der Messreihe mit Mischen nach 3 min zu erkennen. In Abbildung 13B sind die Messreihen mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 90 sek und 2 min zusammen mit der Referenz gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach 90 Sekunden zu einer niedrigeren Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz führt und zusätzlich eher einen linearen Fluoreszenzverlauf während der Reaktion besitzt. Der Mischschritt nach 2 Minuten führt als einziger untersuchter Mischschritt zu einer höheren Fluoreszenzintensität am Ende der Messung als die Referenz. Bei dem Vergleich der TT-Werte zwischen den beiden

Versuchsreihen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Betrachtet man allerdings die Mittelwerte der TT-Werte mit $7,77 \pm 0,34$ min (Mischen nach 2 min) und $9,05 \pm 0,58$ min (Referenz) einzeln, lässt sich, ähnlich wie bei dem Mischschritt nach 3 min, ein zeitigerer Anstieg bei dem Mischschritt nach 2 min erkennen. Dadurch und durch die höchsten Fluoreszenzintensitäten am Ende der Messung wurde ein Mischschritt nach 2 Minuten als Optimal festgelegt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

Zusammengefasst lassen sich für die Influenza A RT-RPA eine Reaktionstemperatur von $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, eine 1,5-fach asymmetrisch erhöhte reverse Primer-Konzentration und ein zusätzlicher Mischschritt nach 120 s als optimal festlegen.

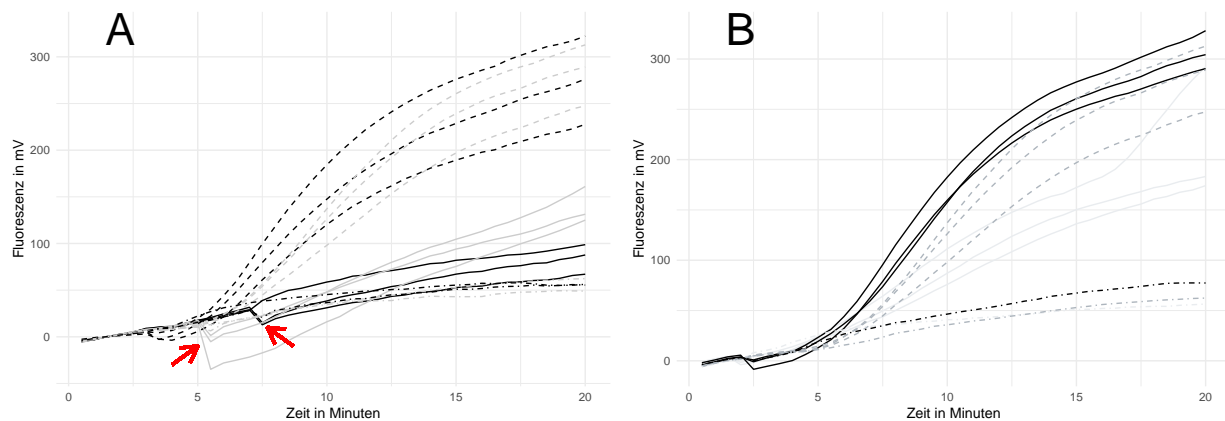


Abbildung 13: Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Messung. **A:** RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (schwarz, gestrichelt), 5 min (grau, durchgezogen), 7 min (schwarz, durchgezogen) sowie der Referenz ohne Mischen (grau, gestrichelt) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μl . Alle Messungen wurden in $n=3$ durchgeführt. Die Abnahme der Fluoreszenz nach dem Mischschritt ist mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit $(\cdot - \cdot)$ dargestellt. **B** Vergleich zwischen den Mischzeiten nach 90 Sek. (hellgrau) und 120 sek. (schwarz) mit angefügter Referenz ohne Mischen (grau, gestrichelt) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μl . Alle Messungen wurden in $n=3$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit $(\cdot - \cdot)$ dargestellt.

1.2.4 Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA

Ähnlich wie in bei der INfluenza A RT_RPA wurde die analytische Sensitivität zur beschreibung des Systems

Die Sensitivitätsanalyse und das daraus resultierende Detektionslimit wurden mit den in Kapitel 1.2.3 ermittelten optimalen Reaktionsparametern für den H1N1- und H3N2-Subtyp berechnet (siehe ??). Dabei wurde der Schwellenwert für den p-Wert des Shapiro-Wilk-Test in Kapitel ?? auf 0,05 angepasst. Die Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessungen mit den linearen zusammenhängen der ermittelten TT-Werte sowie den berechneten Detektionslimits sind in Abbildung 14 dargestellt. Für beide Subtypen konnten jeweils 2 von 3 positive Amplifikationen bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von $2 \cdot 10^2$ Kopien/ μl detektiert werden. Bei niedrigeren RNA-Konzentrationen konnten keine weiteren positiven Amplifikationen erfasst werden. In dem Fluoreszenzdaten für den H1N1-Subtyp (siehe Abbildung 14A) ist ein linearer Anstieg der Fluoreszenz bei der eingesetzten RNA-Konzentration von 10^1 Kopien/ μl zu beobachten (markiert mit rotem Pfeil), welcher eine maximale Fluoreszenzintensität von über 950 Einheiten erreicht. Dieser konnte jedoch nicht als

positiv ermittelt werden, und es liegt die Vermutung nahe, dass der Anstieg einem Messfehler des Gerätes zugrunde liegt. Der Zusammenhang der TT-Werte über die Zeit lässt sich für beide Subtypen mit der linearen Gleichung von $y = 11 - 1,2x$ beschreiben. Der Messfehler sowie generell negative Amplifikationen wurden hierbei vernachlässigt. Bei beiden Subtypen liegt der ermittelte p-Wert $\ll 0,05$, was einen starken und signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression liegt jeweils bei $R^2 = 0,79$ (H1N1-Subtyp) und $R^2 = 0,69$ (H3N2-Subtyp). Das mithilfe der Probit-Analyse berechnete 95 %-ige Detektionslimit für die Influenza A RT-RPA liegt für beide Subtypen bei 251,1 RNA-Kopien. Damit ein Vergleich zur PCR als Standardmethode in der Diagnostik herangezogen werden kann wurde das Detektionslimit (siehe ??) für beide Subtypen von dem in ?? beschriebene RT-PCR System für das Influenza A Virus ermittelt. Die berechneten 95 %-igen Detektionslimits liegen bei 13,1 RNA-Kopien (H1N1-Subtyp) und 32,2 RNA-Kopien (H3N2-Subtyp). Dies entspricht einer Verbesserung von 219,9 Kopien für beide Influenza A Subtypen.

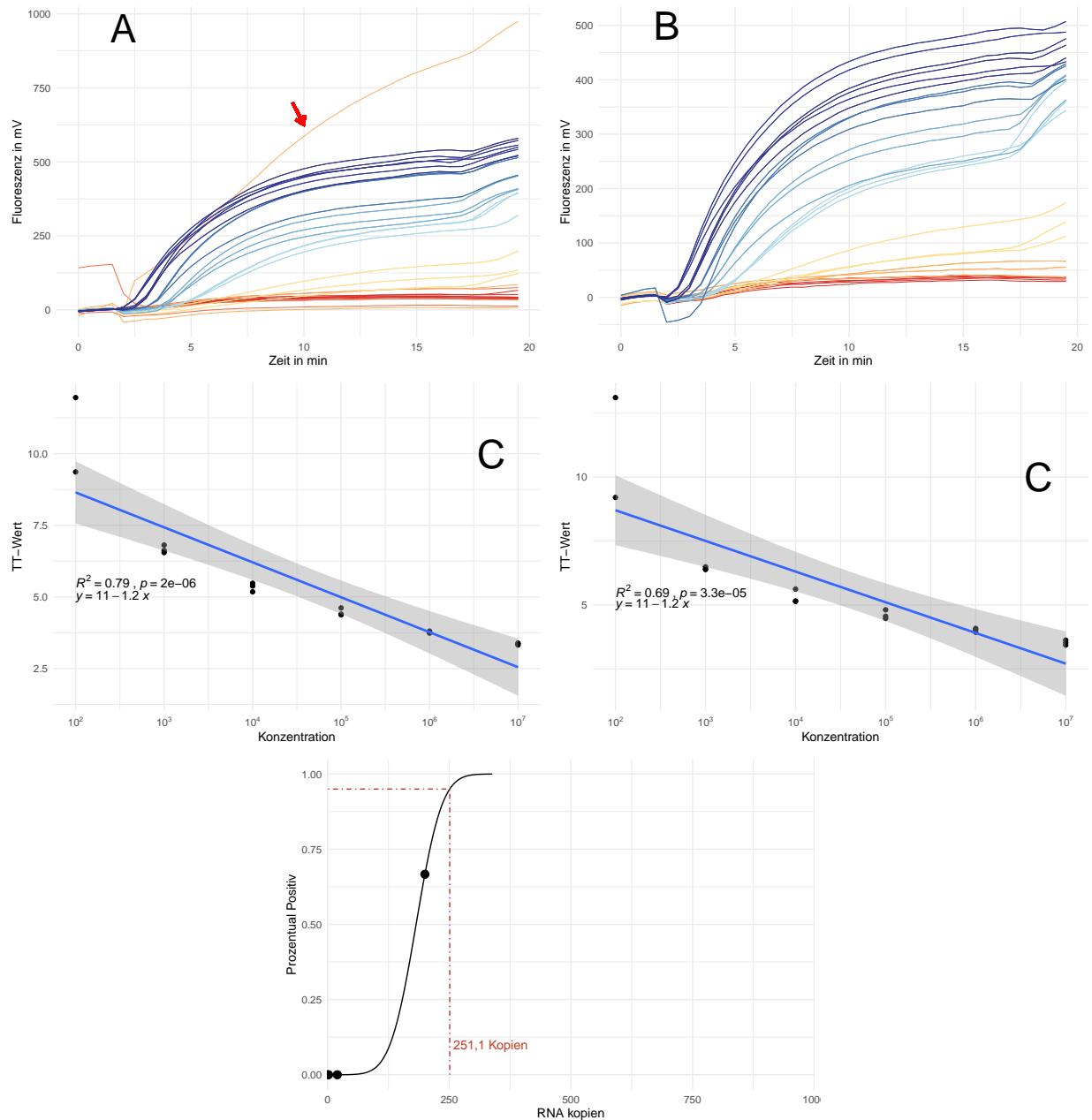


Abbildung 14: **Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA: A,B:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 und 10^0 RNA-Kopien pro Messung mit dem H1N1-Standard (A) und dem H3N2-Standard (B) sowie **Negativkontrollen**. Jede Verdünnung wurde mit $n=3$ gemessen. Ausreißer bei 10^7 und 10^4 (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. **C,D:** Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß und p-Wert für den H1N1-Standard (C) und den H3N2-Standard (D). Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte von negativen Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht gezeigt. **E:** Probit-Analyse der Amplifikationsdaten für den H1N1 und H3N2-Standard. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, die Probit-Regression der RT-RPA. Die rot gestreifte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind.

1.2.5 Einfluss des Sondendesigns auf die Influenza A RT-RPA

Wie in Kapitel ?? beschrieben können Sonden für die RT-RPA als *internally Quenched* und als *dt-Quenched* modifiziert werden. Damit untersucht werden kann, ob das unterschiedliche Sondendesign einen Einfluss auf die RT-RPA hat wurde eine Influenza A RT-RPA mit den gewählten optimalen Parametern (42 °C, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 2 min) mit beide Sondentypen durchgeführt (Kapitel ??). Der Vergleich der beiden Sondentypen bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l ist in Abbildung 15 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die *dT-quenched* Sonde eine höhere Fluoreszenzauslenkung als die *iQ*-Sonde im Verlauf der Reaktion annimmt. Des Weiteren zeigt die Wasserkontrolle der *iQ*-Sonde im Vergleich zu der *dT-quenched* Sonde ein steigendes unspezifisches Signal-Rauschen. Es konnte ein signifikanter Unterschied (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) zwischen den TT-Werten mit $4,89 \pm 0,07$ min (*internally Quenched*) und $4,53 \pm 0,05$ min (*dT-Quenched*) festgestellt werden. Generell lässt sich festgestellt, dass die *dT-Quenched* Sonde höhere Fluoreszenzwerte annimmt und zu einem zeitigeren Signal führt.

Um den beschriebenen Effekt der *dT-Quenched* Sonde auf die Sensitivität zu untersuchen wurde eine Sensitivitätsanalyse analog zu Kapitel 1.2.4 mit der *dT-Quenched* Sonde für beide Subtypen durchgeführt. Mit der *dT-Quenched* Sonde konnten alle Reaktion mit einer RNA-Ausgangskonzentration von $2 \cdot 10^2$ Kopien/ μ l als positiv Detektiert werden und dementsprechend Detektionslimit für beide Subtypen bei 147,5 RNA-Kopien berechnet werden. Das entspricht einer Sensitivitätsverbesserung von 61 % für den H1N1 Subtyp beziehungsweise 49 % für den H3N2 Subtyp.

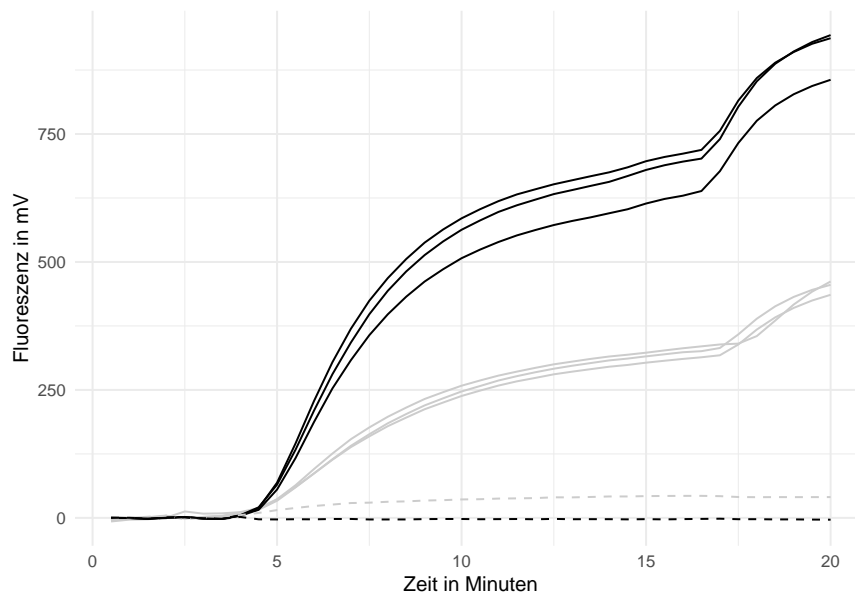


Abbildung 15: **Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Vergleichs zwischen der *internally Quenched* Sonde (grau) und der *dT-quenched* Sonde (schwarz, Modifikationen siehe Abbildung ??) mithilfe der Influenza A RT-RPA. Die Messung wurde dabei mit den in Kapitel 1.2.3 festgelegten optimalen Reaktionsparametern bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l (H1N1-Standard) in $n=3$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Wie in Kapitel ?? anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden konnte, übt ein humaner Nukleinsäure Probenhintergrund im low-volume Ansatz einen Einfluss auf das Detektionslimit aus. Um einen möglichen Einfluss der Referenzproben auf das Detektionslimit der optimierten Influenza A RT-RPA mit der *dt-Quenched*

Sonde zu untersuchen, wurde eine Sensitivitätsanalyse mit den Referenzproben analog zu 1.2.4 durchgeführt. Neben der Wasserkontrolle wurde eine Referenzprobe ohne zugesetzte Influenza A RNA mitgeführt um unspezifische Reaktionen mit der humanen Nukleinsäure zu untersuchen. Es konnte dabei keine Verringerung der Sensitivität, sowie keine unspezifischen Reaktionen mit dem humanen Nukleinsäure Hintergrund festgestellt werden. Dementsprechend liegt das Detektionslimit unverändert für beide Subtypen bei 147,5 RNA-Kopien. Zur besseren Übersicht ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich der verschiedenen Detektionslimits der Influenza A RT-RPA

Messung	H1N1-Subtyp	H3N2-Subtyp
RT-RPA im 50 µl Ansatz	251,1 RNA-Kopien	251,1 RNA-Kopien
RT-PCR	13,1 RNA-Kopien	32,2 RNA-Kopien
RT-RPA mit dT-Quenched Sonde	147,5 RNA-Kopien	147,5 RNA-Kopien
RT-RPA mit dT-Quenched Sonde in simulierten Kontrollproben	147,5 RNA-Kopien	147,5 RNA-Kopien

1.3 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza A Virus

kleiner Einleitungstext... (kommt darauf an, was ich in der Einleitung/theoretischem Hintergrund dazu schreibe) Mit H1N1 und H3N2 erwähnen als Subtypen

1.3.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus

1.3.2 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)
- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
 - wenn sensitivität dann auch Spezifität

1.3.3 Optimierung der InfB-RPA

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt

1.3.4 Primerassymetrie

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

1.3.5 Sensitisanalysen und Verlgleich

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

1.3.6 Spezifität

- Spezifität

1.4 Influenza A

1.4.1 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

1.4.2 Optimierung der InfbARPA

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt
- Primerassymetrie

1.4.3 Sensitivitätsanalysen und Vergleich

- Sensitivitätstest und vergleich mit PCR

1.4.4 Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA

- Test mit neuer Sonde
- Sensitivitätsvergleich

1.4.5 Spezifitätstest

Glökler et al. (2021) -> RPA als vorherrschende und beste Methode, da sie viel kombiniert (großer Vergleich mit anderen isothermen Amplifikationen)

Shen et al. (2011) slipChip -> digitale RPA = single nucleotide Detection

- Primer design
 - Influenza B (gibt nicht viel zu diskutieren, hat super geklappt)
 - > warum gewähltes target
 - Influenza A (warum hat es nicht geklappt)
 - > genomstruktur (macht sone schleife, mal in eigenhybridisierungs ding hauen)
- Optimierungen (warum wurden die Parameter so gewählt)
 - Influenza A
 - Influenza B -> lab on Chip mit 8tel Ansatz
 - wie wichtig ist Mischen am Beispiel in InfB
- Sensitivitätsanalysen
 - Vergleich mit PCR
 - Vergleich 50µl und 8tel-Ansatz -> welche Vorteile hat 8tel-Ansatz
 - Sensitivität im Klinischen Background reicht das für klinische Proben
- Spezifität
- R-Programm
 - unterschiede zwischen RPA und PCR
 - > Mischen (evtl. Lücke in den Daten)
 - > Negativkontrolle (leichter linearer Anstieg)
 - > Überexponentielle Amplifikation oder linearer Anstieg (nicht immer Sigmoidale Kurve, hängt mich dem Mechanismus zusammen)
 - > ditching

- Wie wirken sich die Unterschiede auf die Tests aus
 - > Normalverteilung (sehr wichtig, kann aber auch bei PCR sein, wurde nicht getestet)
 - > linear Regression test (wird rausgelassen)
 - > resids growth test
- mögliche Lösungen
 - > algorhytmus für ditching
 - > normalverteilung anpassen
 - > threshold diskutieren

- Assymetrie
 - Warum hat die Assymetrie so einen Erfolg
 - Warum macht die Assymetrie so großes Ditching
- Sondendesign
 - warum ist dt-besser

- Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Martin Spiegel, Marina Schramm, Ahmed Abd El Wahed, Gerhard Dobler, Gregory Dame, and Frank T Hufert. 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): 1047–54. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>.
- Ehnts, Kai Ilmo. 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>.
- Glökler, Jörn, Theam Soon Lim, Jeunice Ida, and Marcus Frohme. 2021. “Isothermal Amplifications – a Comprehensive Review on Current Methods.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 56 (6): 543–86. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1937927>.
- Kersting, Sebastian, Valentina Rausch, Frank F. Bier, and Markus von Nickisch-Rosenegk. 2014. “Multiplex Isothermal Solid-Phase Recombinase Polymerase Amplification for the Specific and Fast DNA-Based Detection of Three Bacterial Pathogens.” *Microchimica Acta* 181 (13-14): 1715–23. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1198-5>.
- Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix von Stetten. 2019. “Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification.” *The Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>.
- Lillis, Lorraine, Joshua Siverson, Arthur Lee, Jason Cantera, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, Dara A. Lehman, and David S. Boyle. 2016. “Factors Influencing Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Assay Outcomes at Point of Care.” *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>.
- Poddar, SK. 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>.
- Shen, Feng, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Jason E. Kreutz, Olaf Piepenburg, and Rustem F. Ismagilov. 2011. “Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions on SlipChip.” *Analytical Chemistry* 83 (9): 3533–40. <https://doi.org/10.1021/ac200247e>.