

Inhaltsverzeichnis

1	Ergebnisse	2
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	Verringerung des Reaktionsvolumen (geringvolumiger Ansatz) der Influenza B RT-RPA	4
1.1.4	Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza B RT-RPA	5
1.1.5	Entwicklung einer asymmetrischen RT-RPA	6
1.1.6	Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA	7
1.1.7	Optimierung der Mischzeit der Influenza B RT-RPA	8
1.1.8	Bestimmung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA	11
1.1.9	Bestimmung der Spezifität der Influenza B RT-RPA	13
1.2	Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA	14
1.2.1	Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der Influenza A Virus Standard-RNA .	14
1.2.2	Untersuchung der Influenza A RT-RPA Primer und Sonden	15
1.2.3	Verringerung des Reaktionsvolumen der Influenza A RT-RPA	16
1.2.4	Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza A RT-RPA	17
1.2.5	Optimierung der Influenza A RT-RPA mit asymmetrischen Primer-Konzentrationen .	17
1.2.6	Optimierung der Mischzeit der Influenza RT-RPA	18
1.2.7	Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA	20
1.2.8	Einfluss des Sondendesigns auf die Influenza A RT-RPA	22
1.2.9	Bestimmung der Spezifität der Influenza A RT-RPA	23

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 mit dem RPA-Standard Protokoll auf eine geeignete Amplifikation geprüft. Zur Optimierung und Erhöhung der analytischen Sensitivität der erfolgreich getesteten Primer-Sonden-Sets wurden verschiedene Parameter wie Reaktionsvolumen, Reaktionstemperatur sowie verschiedene Mischzeitpunkte untersucht. Die ermittelten optimalen Parameter wurden in einer abschließenden Untersuchung der Sensitivität und Spezifität charakterisiert und mit entsprechenden RT-PCR-Referenzsystemen verglichen.

1.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza B RT-RPA

1.1.1 Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der Influenza B Virus Standard-RNA

Für die Vergleichbarkeit zwischen der RT-PCR und der RT-RPA sowie der variierenden Parameter wurde ein Virus-RNA Standard 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 wurden mögliche Sequenzänderungen ausgeschlossen und die Integrität der Virus-Sequenz bestätigt. Für die *in vitro* Transkription wurde das Plasmid durch einen Restriktionsverdau linearisiert und die Linearisierung in einem Agarose-Gel überprüft (Kapitel ??, Abbildung 1A). 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 mithilfe des T7-Promotors auf dem Plasmid *in vitro* transkribiert und die RNA gereinigt (Kapitel ??). Die so synthetisierte virale RNA wurde mit dem RiboGreen Assay (Kapitel ??) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in 1B dargestellt. Es ergab sich eine Geradengleichung der Kalibriergerade von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99. Der berechnete p-Wert ist $\ll 0,05$, das einen signifikant linearen Zusammenhang belegt. Mithilfe der Geradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von $476.0 \pm 7,8$ ng/ml ermittelt und somit die Menge der synthetisierten Kopien auf $2,2 \cdot 10^8$ RNA-Kopien/ μ l bestimmt werden.

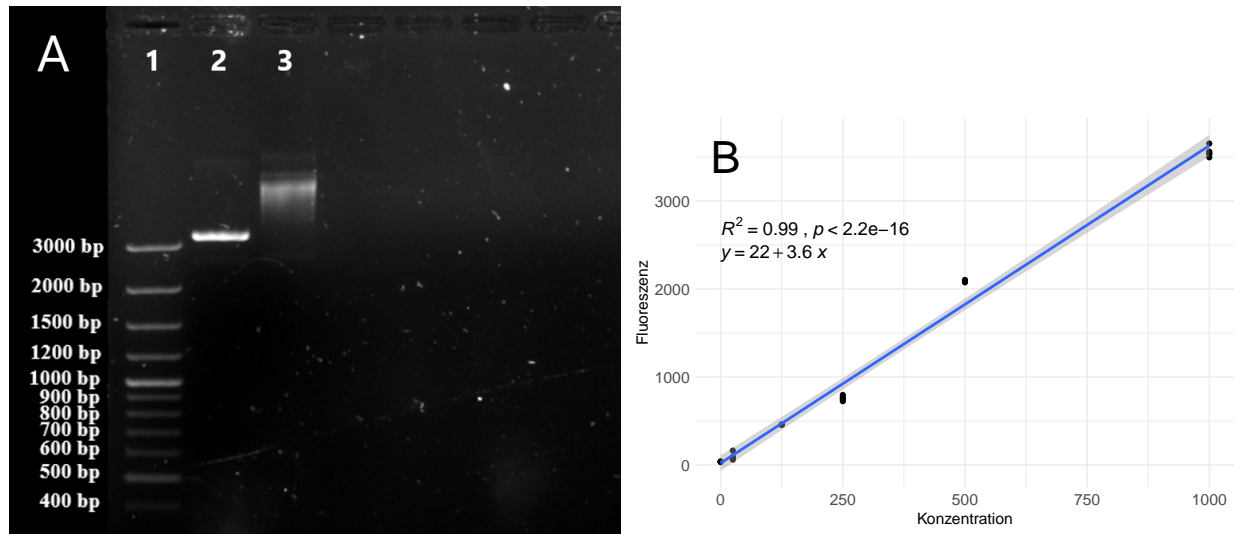


Abbildung 1: **Kontrollgel und RiboGreen Kalibriergerade des Influenza B Standards:**
A: DNA-Banden des Kontrollgels für die Linearisierung des Influenza B Plasmids mit verdautem Plasmid (2), unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das Bild wurde digital bearbeitet.
B: Kalibriergerade 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.

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 der Sonde 3.1 (grau) zeigen streuende Anstiegszeiten 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) zu 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 Anstiegszeiten. 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 eingesetzt.

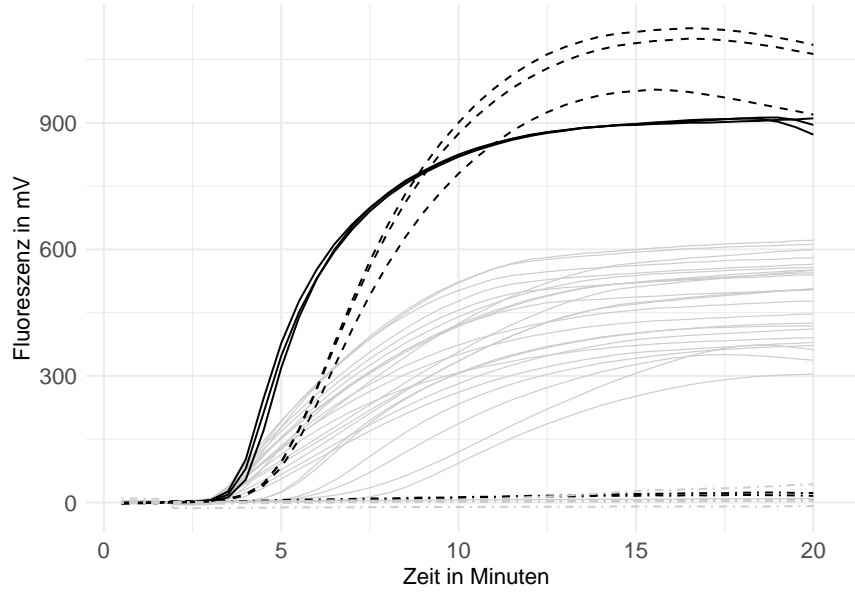


Abbildung 2: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle ?? angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde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

1.1.3 Verringerung des Reaktionsvolumen (geringvolumiger Ansatz) der Influenza B RT-RPA

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 einen geringvolumigen Ansatz adaptiert werden kann, wurde eine Reduzierung des Reaktionsvolumens untersucht (Kapitel ??). In Abbildung 3 ist der Vergleich der klassischen RPA (50 μ l) zum geringvolumigen Ansatz (6,5 μ l) bei einer Kopienzahl von 10^7 RNA-Kopien/ μ l dargestellt. Der geringvolumige 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 $3,36 \pm 0,01$ min (50 μ l RT-RPA) und $3,47 \pm 0,14$ min (geringvolumige RT-RPA). Trotz der verringerten Fluoreszenzintensität wurde der geringvolumige 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 Umgebungen vorteilhaft ist.

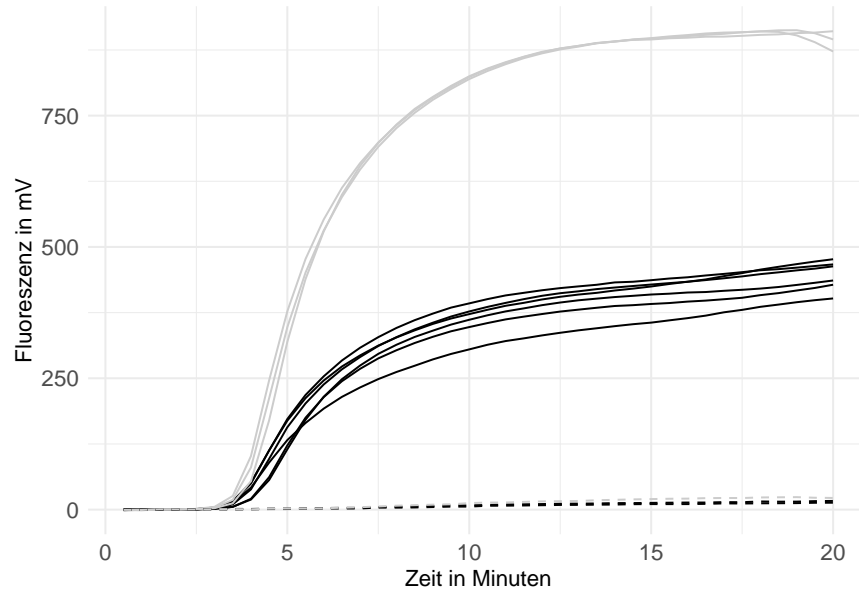


Abbildung 3: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA bei 40 °C im geringvolumigen Ansatz (schwarz n=6) sowie im 50 µl Ansatz (grau, n=3) sind dargestellt. Als Virus-RNA wurden 10^7 RNA-Kopien eingesetzt. Alle Negativkontrollen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

1.1.4 Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza B RT-RPA

Das Temperaturoptimum 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 geringvolumigen Ansatz untersucht (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten dazu sind in Abbildung 4 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 Fluoreszenzabsenkung im späteren Verlauf der Messung, welche auch von Lutz et al. (2010) beobachtet wurde, 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.

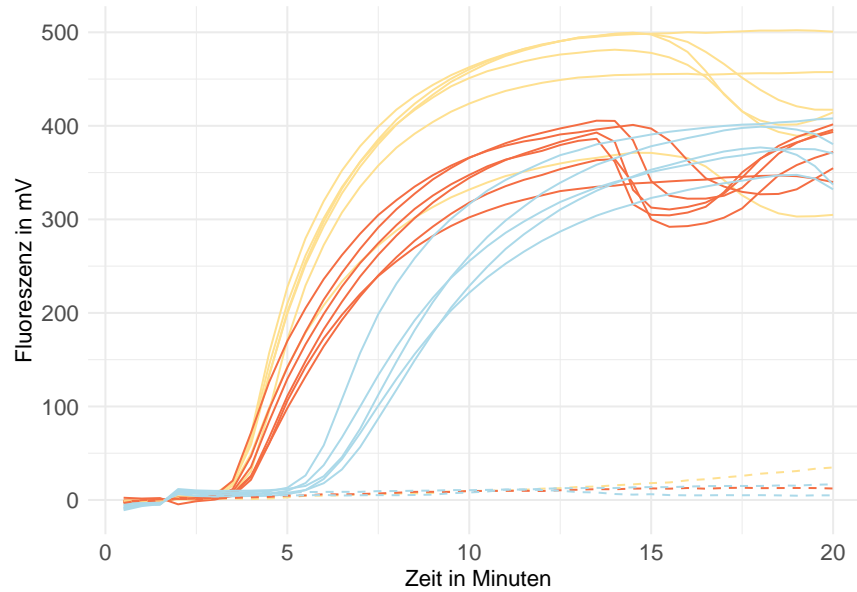


Abbildung 4: **Optimierung der Reaktionstemperatur für die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im geringvolumigen Ansatz bei 42 °C (orange), 40 °C (gelb) und 38 °C (blau), je n=6. Negativkontrollen sind gestrichelt (- - -) gekennzeichnet.

1.1.5 Entwicklung einer asymmetrischen RT-RPA

Wie von Kersting et al. (2014) und Wang et al. (2019) gezeigt wurde, kann ein asymmetrischer Primeransatz auf die RPA übertragen werden (Kersting et al. 2014; Wang et al. 2019). 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 geringvolumigen RPA mit einer Primerasymmetrie zu kombinieren und somit ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Dazu wurde eine reverse Primerasymmetrie (reverse Primer 2X-konzentriert) eingeführt, um den zur Sonde komplementäre sense Strang vermehrt zu amplifizieren. Die Messung zusammen mit der Referenz (normale Primer-Konzentration) und einer Kontrolle (equimolare 2X Primer-Konzentration) ist in Abbildung 5A gezeigt. Durch die Einführung der reverse Primerasymmetrie (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 (blau) innerhalb der Kontrolle zeigt eine ähnliche Fluoreszenzauslenkung wie die Referenz. Dementsprechend weist eine generell erhöhte Primer-Konzentration keinen Unterschied in der Fluoreszenzauslenkung zur Referenz auf. Zwischen den untersuchten Primer-Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede der TT-Werte 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, 2X Primer-Konzentration) und $3,39 \pm 0,07$ (Referenz). Die markierte Amplifikationskurve (roter Pfeil) konnte als Ausreißer identifiziert werden und wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Zur Prüfung, ob der Hybridisierungsort der Sonde an den sense oder antisense Strang der zu amplifizierenden DNA in Verbindung mit der Primerasymmetrie und der daraus resultierenden erhöhten Fluoreszenzintensität steht, wurde eine Messreihe mit der am entgegengesetzten (antisense) Strang hybridisierenden Sonde durchgeführt (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten der Messungen sind in Abbildung 5B gezeigt. Es ist zu

erkennen, dass hier die erhöhte reverse Primer-Konzentration (orange) die niedrigste Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (blau) und der erhöhten forward Primer-Konzentration (gelb) zeigt. Die asymmetrisch erhöhte forward Primer-Konzentration zeigt hingegen die höchsten Fluoreszenzwerte und die beste Signalgenerierung. Des Weiteren besitzt die erhöhte Forward Primer-Konzentration signifikant niedrigere TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) mit $3,25 \pm 0,05$ min als die Referenz ($3,63 \pm 0,19$ min) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration ($3,76 \pm 0,34$). Im Vergleich zum vorherigen Experiment (Abbildung 5A) wird durch die, am antisense Strang hybridisierende, Sonde die zur Fluoreszenzerhöhung führende Primerasymmetrie umgekehrt. Somit sorgt eine erhöhte forward Primer-Konzentration zusammen mit der antisense Sonde für stärkere Fluoreszenzsignale, während die "sense" Sonde (Sonde 1.1) zusammen mit einer erhöhten reverse Primer-Konzentration zu einer höheren Fluoreszenz führt.

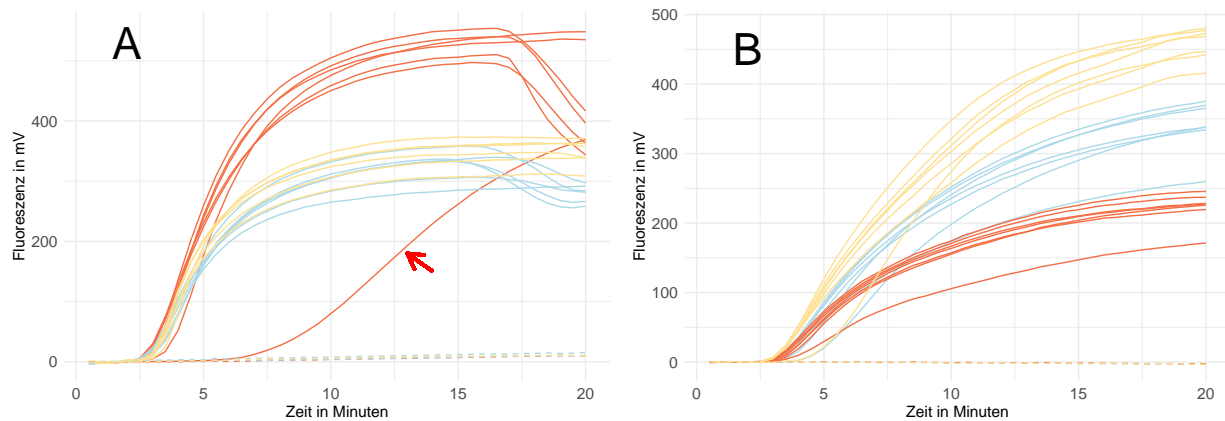


Abbildung 5: **Einfluss der Primerasymmetrie auf der RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA.

A: Einfluss einer generellen Primer-Konzentrationserhöhung auf die Influenza B RT-RPA. Die doppelte Primer-Konzentration ($42 \mu\text{M}$ im PSM, siehe ??) ist in blau dargestellt, während die asymmetrische Erhöhung des reverse Primers ($42 \mu\text{M}$ im PSM) in orange gezeigt ist. Die mitgeführte Referenz (jeweils $21 \mu\text{M}$ im PSM) ist in gelb dargestellt. 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 (orange) und forward (gelb) Primer-Konzentration (jeweils $42 \mu\text{M}$ im PSM) mit der in ?? angegebenen Sonde. Als Referenz (blau) wurde eine RT-RPA mit normaler Primer-Konzentration mitgeführt. Alle Messungen wurden in $n=7$ durchgeführt. Negativkontrollen sind gestrichelt (---) gekennzeichnet.

1.1.6 Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA

Wie in Kapitel 1.1.5 gezeigt wurde, führt eine Primerasymmetrie bei einer geringvolumigen RT-RPA zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal. Zur Bestimmung des optimalen Asymmetrie-Verhältnisses wurde eine Versuchsreihe mit einer angepassten reverse Primer-Konzentration von $0,45 \mu\text{M}$, $0,675 \mu\text{M}$ und $0,9 \mu\text{M}$ (entspricht 1X, 1,5X und 2X erhöhte Konzentration) im geringvolumigen Ansatz bei 40°C und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μl durchgeführt (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 6 dargestellt. Wie zu erwarten, zeigt die asymmetrische Erhöhung der Primer-Konzentration (orange, blau) eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur unveränderten reverse Primer-Konzentration (gelb). Eine signifikante Änderung (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 ($0,45 \mu\text{M}$),

$3,43 \pm 0,07$ min ($0,625 \mu\text{M}$) und $3,63 \pm 0,13$ min ($0,9 \mu\text{M}$). Die markierte Amplifikation (roten Pfeil) wurde mittels TT-Wert als Ausreißer identifiziert und ist nicht berücksichtigt. Der im vorherigen Abschnitt (Kapitel 1.1.4) schon beobachtete „Ditching“-Effekt konnte bei der $0,9 \mu\text{M}$ Primer-Konzentration (orange) nach etwa 12 min bei 4/6 Reaktionen beobachtet werden. Zur Vermeidung möglicher Messartefakte, wurde mit einer $0,675 \mu\text{M}$ Primerkonzentration (1,5X der Standardkonzentration, blau) weitergearbeitet.

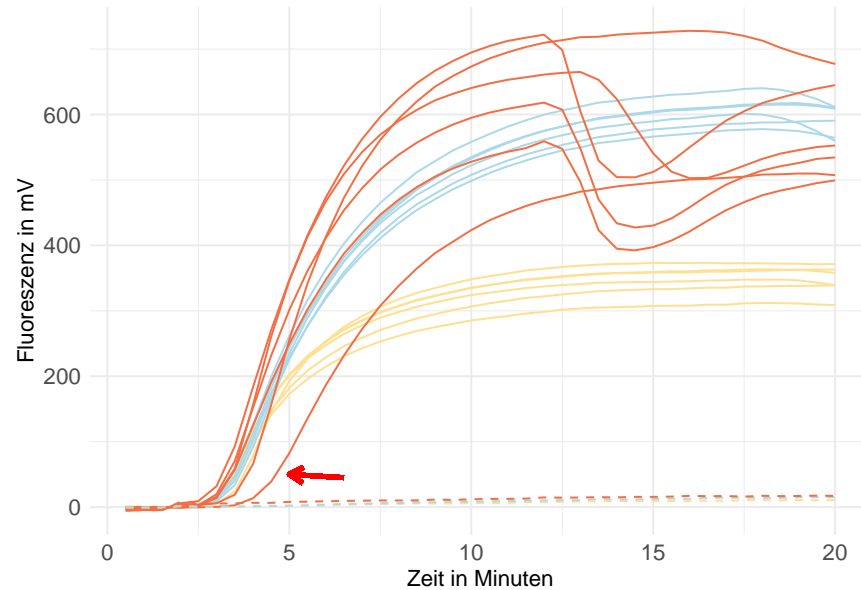


Abbildung 6: **Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im geringvolumigen Ansatz bei einer reverse Primer-Konzentration von $0,45 \mu\text{M}$ (gelb), $0,625 \mu\text{M}$ (blau) und $0,9 \mu\text{M}$ (orange). Messung in $n=6$ pro Primer-Konzentration. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

1.1.7 Optimierung der Mischzeit der Influenza B RT-RPA

Wie in ?? beschrieben kann ein zusätzlicher Mischschritt während der Reaktion zu einer erhöhten Amplifikation und somit zu einer besseren Detektion führen. Um im asymmetrischen, geringvolumigen Ansatz ($6,5 \mu\text{l}$) 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 der 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) 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 4 Minuten (orange) und 5 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 5 Minuten zeigt im Vergleich zu dem Mischzeitpunkt nach 4 Minuten eine höhere maximale Fluoreszenz Auslenkung und wurde aus diesem Grund als Optimal festgelegt und näher untersucht.

Damit der Einfluss des Mischzeitpunktes auf die geringvolumige 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 5 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 Versuchsreihen 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. Demnach konnte ebenfalls einer Erhöhung der Sensitivität durch den eingeführten Mischschritt ermittelt werden. Da alle Messungen der Mischzeit im geringvolumigen Ansatz durchgeführt wurden, wurde ein Vergleich zum 50 μ l Ansatz durchgeführt und der Einfluss des Mischschrittes nach 5 min untersucht. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung ?? im Anhang dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein Mischschritt nach 5 Minuten (rot) bei 10^4 RNA-Kopien zu einer 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.

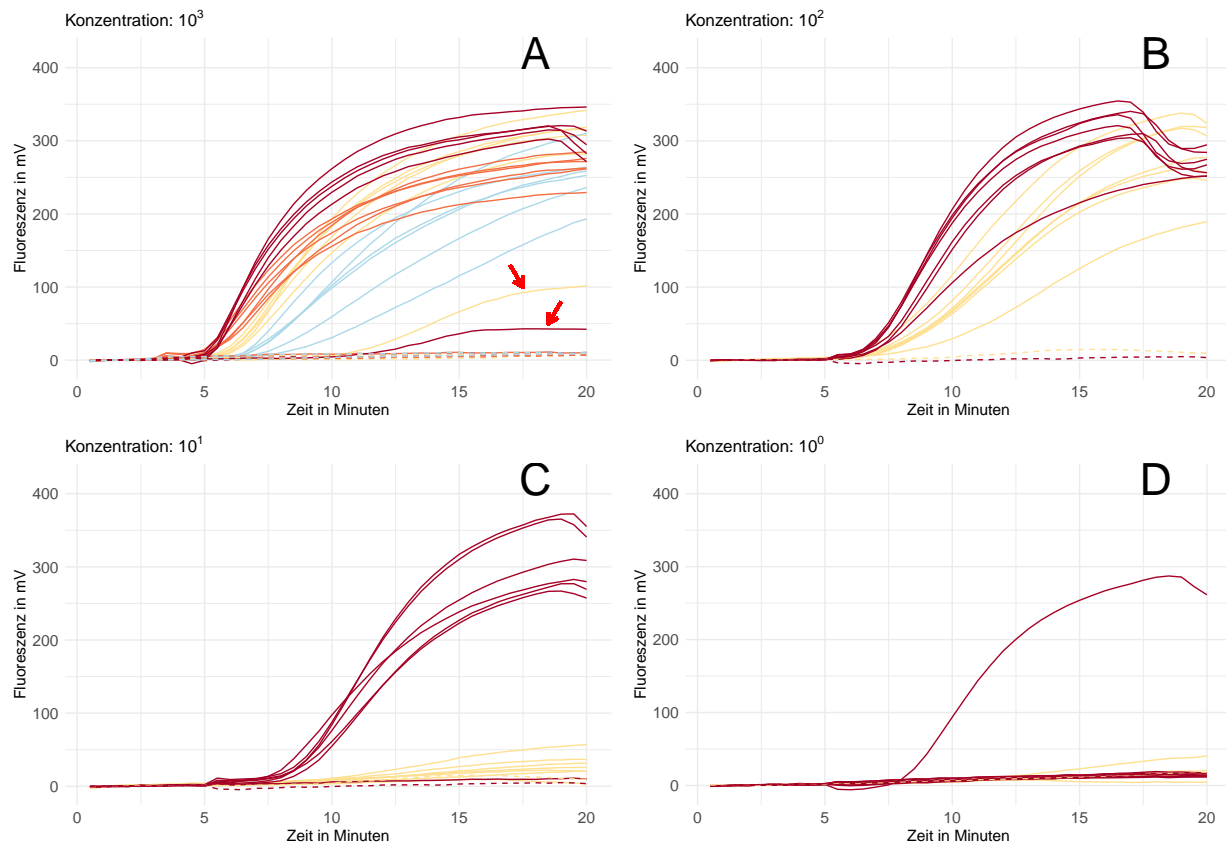


Abbildung 7: **Einfluss der Mischzeit auf die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der RT-RPA sind gezeigt, die bei A) 10^3 , B) 10^2 , C) 10^1 und D) 10^0 Kopien/Ansatz einen zusätzlichen Mischschritt im Vergleich zur RT-RPA ohne Mischschritt darstellen.

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 (rot) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (gelb) 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 (rot) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (gelb) bei eingesetzten 10^1 RNA-Kopien/ μ l (C) und 10^0 RNA-Kopien (D). Messung in n=6 durchgeführt. Negativkontrollen sind gestrichelt (- - -) gekennzeichnet.

1.1.8 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 µl) und geringvolumigen gegenübergestellt (Kapitel ??). In Abbildung 8 sind die Fluoreszenzdaten der dekadischen Verdünnungsreihe von $2 \cdot 10^7$ bis $2 \cdot 10^0$ RNA-Kopien (Abbildung 8A, 8B) sowie das mittels Probit-Analyse (Kapitel ??) berechnete Detektionslimit (Abbildung 8C, 8D) und die jeweiligen Kalibriergeraden (Abbildung 8E, 8F) dargestellt. Für die Standardvolumen Influenza B RT-RPA konnte ein Detektionslimit von 31,6 Virus RNA-Kopien berechnet werden. Die Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der eingesetzten RNA-Konzentration 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 geringvolumigen 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 geringvolumigen 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 geringvolumigen Ansatz. Damit untersucht werden kann, ob ein humaner Nukleinsäureprobenhintergrund das Detektionslimit der optimierten geringvolumigen 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 Nukleinsäure-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 wurden alle Proben mit einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/µl detektiert, 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 1 dargestellt.

Tabelle 1: 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 mit Referenzproben	1397 RNA-Kopien

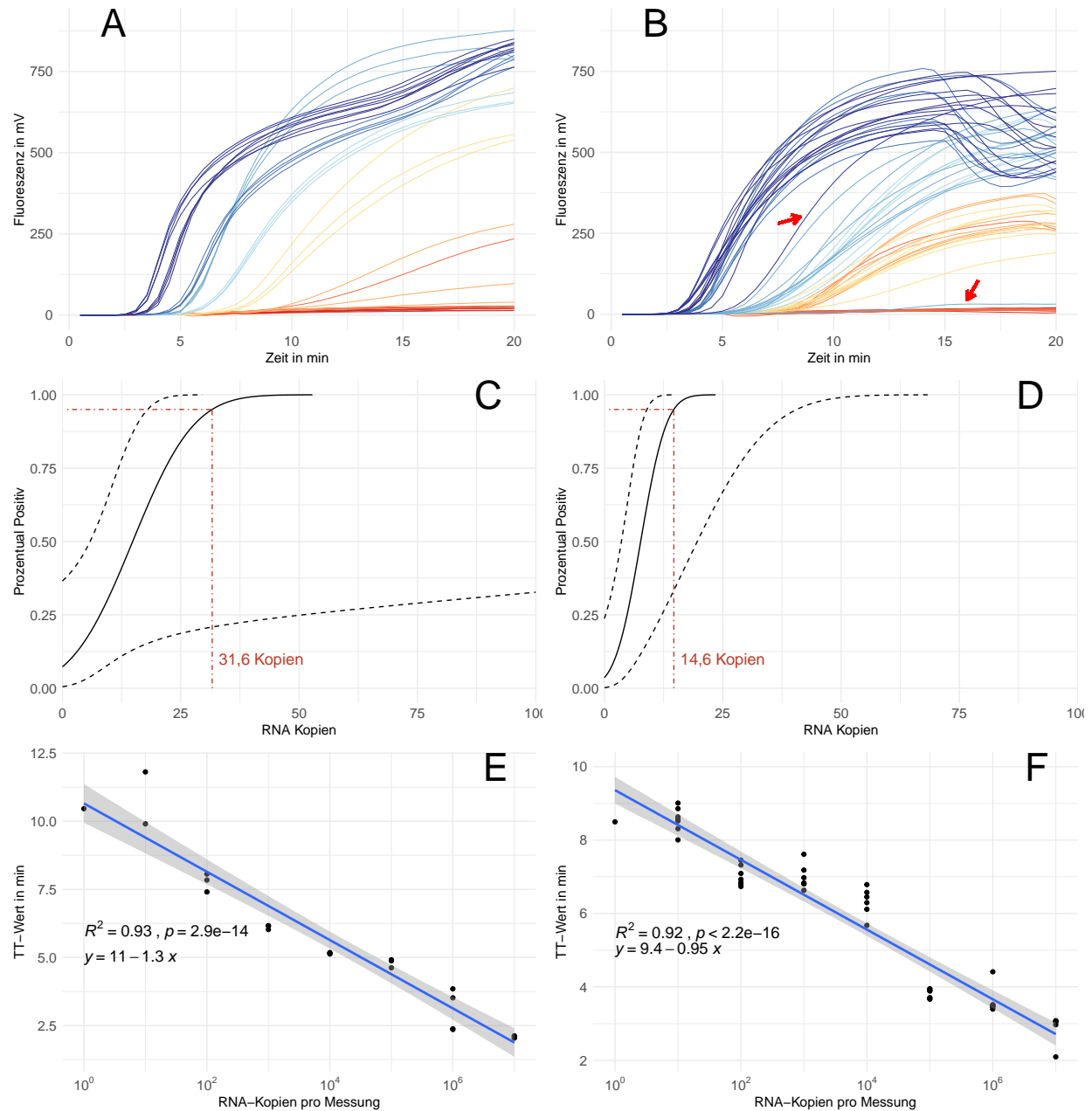


Abbildung 8: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA:**

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 **Wasserkontrollen** für den 50 µl Ansatz (A) und den geringvolumigen Ansatz (B). Jede Verdünnung wurde mit mindestens n=3 (50 µl Ansatz) bzw. n=7 (geringvolumiger Ansatz) gemessen. Ausreißer des geringvolumigen 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 geringvolumigen Ansatz (D). Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, den Probit-Regressionsgraph 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 geringvolumigen 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.

1.1.9 Bestimmung der Spezifität der Influenza B RT-RPA

Ähnlich wie die Sensitivität ist die Spezifität ein wichtiger Parameter in der Beschreibung eines Detektionssystems. Geringe Spezifitäten führen zu falsch positiven Ergebnissen und somit zu einer ungenauen Detektion (Saah 1997). Für die Untersuchung der Spezifität wurden die in Tabelle 2 gezeigten Viren mittels der optimierten Influenza B RT-RPA (40 °C, 1,5X reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 5 min) im geringvolumigen Ansatz auf eine Amplifikation getestet. Wie in Tabelle 2 dargestellt, konnte keine der untersuchten Viren detektiert werden.

Tabelle 2: Spezifitätsmessung der Influenza B RT-RPA

Virus	Detektion mittels RT-RPA
Influenza A H1N1	(-)
Influenza A H3N2	(-)
Influenza A H7N5	(-)
Rhinovirus B	(-)
Rhinovirus C	(-)
hRSV Typ A	(-)
hMPV Typ A1	(-)
Adenovirus Typ 34	(-)

Notiz:

(-) = Keine Amplifikation; hRSV = Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus; hMPV = Humanes Metapneumovirus

1.2 Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA

1.2.1 Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der 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 klonierten artifiziellen Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung (Kapitel ??) untersucht. Es konnten keine Sequenzveränderungen innerhalb der Virus-Sequenz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). 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 9A gezeigt. Die linearisierten Plasmide (Spur 2, Spur 4) zeigen eine DNA-Bande bei ≈ 3300 bp im Gel. Dies entspricht der Plasmidgröße von 3343 bp für beide Plasmide, laut den Plasmidkarten (Abbildung ??, ?? im Anhang). Dies lässt auf eine erfolgreiche Linearisierung der Plasmide schließen. Die ungeschnittenen Kontrollplasmide (Spur 3, Spur 5) zeigen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7 Promotor *in vitro* transkribiert und die RNA gereinigt (Kapitel ??). Die artifiziell synthetisierte 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-Kopienzahlen von $2,0 \cdot 10^8$ (H1N1-Subtyp) und $1,4 \cdot 10^8$ (H3N2-Subtyp) Kopien/ μ l ermittelt werden.

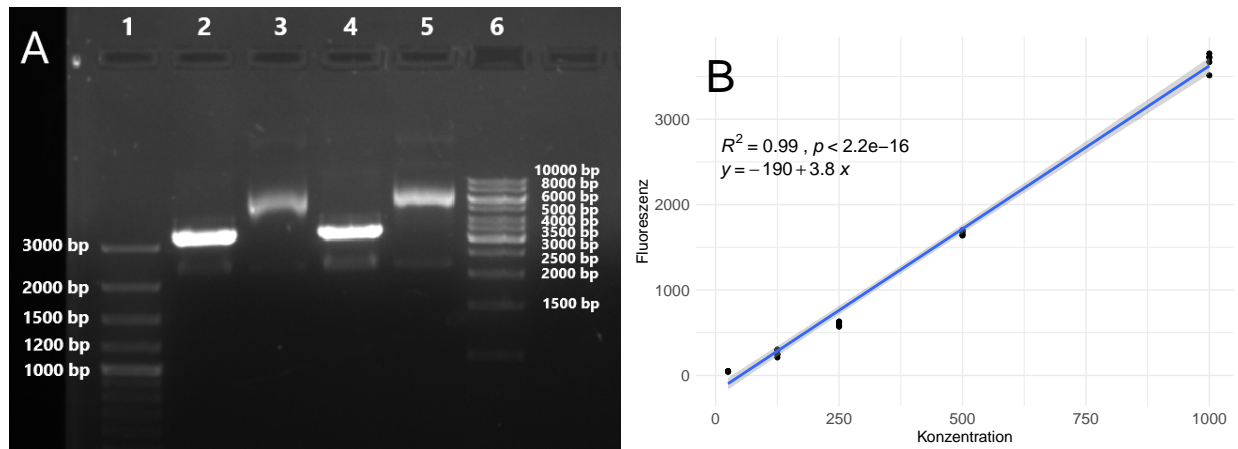


Abbildung 9: **Kontrollgel der Plasmidlinearisierung und RiboGreen Kalibriergerade der Influenza A Standardherstellung:**

A: DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdauten Plasmids des H3N2 Standards (2) mit unbehandeltem Kontrollplasmid (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). Das Bild wurde digital bearbeitet.

B: Kalibriergeraden 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 ??). Daraus konnten mit der Sonde 3 zwei Kombinationen bestehend aus Forward 3 und Reverse 3.1 und 3.2 und mit der Sonde 1 sechs Kombinationen mit Forward 1 oder 2 zusammen mit Reverse 1.1 - 1.8 gebildet werden.

Zur Ermittlung einer geeigneten Primer-Sonden-Kombination wurden die insgesamt 8 Kombinationen in einer 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 schwachen, linearen Fluoreszenzverlauf mit einem Anstieg zwischen 7 - 10 Minuten und einer maximalen Fluoreszenzauslenkung um 100 - 150 Einheiten aufweisen. Von den untersuchten Kombinationen konnten 3/8 keine positiven Amplifikationen aufweisen. Da die Fluoreszenzdaten aller untersuchten Primer-Sonden-Kombinationen Ähnlichkeiten aufweisen, wurde keine der Kombination als passend 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 ??).

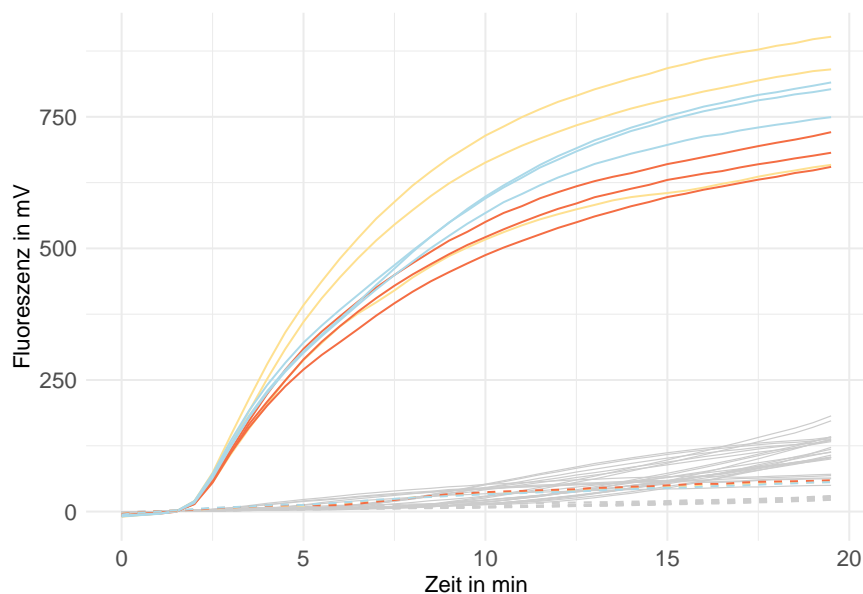


Abbildung 10: **Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle ?? angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen der mit PrimedRPA designten Primer und Sonden sind in grau dargestellt.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

Die Fluoreszenzdaten der drei neuen Primer-Sonden-Kombinationen sind farbig in Abbildung 10 dargestellt. Die Ehnts-Kombinationen besitzen im Durchschnitt eine maximale Fluoreszenzauslenkung von ≈ 750 Ein-

heiten und zeigen höhere Werte als die Systeme, die mit dem PrimedRPA Programm erstellt wurden. Dabei zeigen die Kombination mit den alternativen forward Primer (orange, blau) niedrigere Fluoreszenzauslenkungen als die Kombination mit dem Forward E Primer (gelb). Des Weiteren besitzen die Ehnts Primer-Sonden-Kombinationen niedrigere TT-Werte mit $3,18 \pm 0,08$ min als die vom PrimedRPA erstellten, 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.

1.2.3 Verringerung des Reaktionsvolumen der Influenza A RT-RPA

Die geringvolumige Applikation der RPA bietet, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, für die POCT relevante Vorteile und kann in *Lab-on-a-chip* Systeme für eine vereinfachte Handhabung eingesetzt werden. Zur Prüfung, ob die in Kapitel 1.2.2 gewählte Primer-Sonden-Kombination auf den geringvolumigen Ansatz adaptiert werden können, wurde ein Vergleich zwischen der Standard RPA (50 μ l, grau) und dem geringvolumigen Ansatz (6,5 μ l, schwarz) bei einer eingesetzten Kopienzahl von 10^8 RNA-Kopien/ μ l durchgeführt (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in 11 dargestellt. Der geringvolumige Ansatz der Influenza A RT-RPA zeigt eine ähnlich wie bei der Influenza B RT-RPA eine niedrigere Fluoreszenzauslenkung im Vergleich zum 50 μ l Ansatz. Jedoch weist die geringvolumige RPA zusätzlich signifikant höhere TT-Werte ($4,19 \pm 0,43$ min) als die Standard-RPA ($3,17 \pm 0,12$ min, statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) auf. Somit zeigt der geringvolumige Ansatz eine schlechtere Amplifikation als die Standard-RPA. Des Weiteren besitzt der Fluoreszenzgraph der geringvolumigen RPA einen untypischen linearen Verlauf. Aus diesem Grund wurde eine Adaption an den geringvolumigen Ansatz als Nachteilig eingestuft und nicht weiter verfolgt.

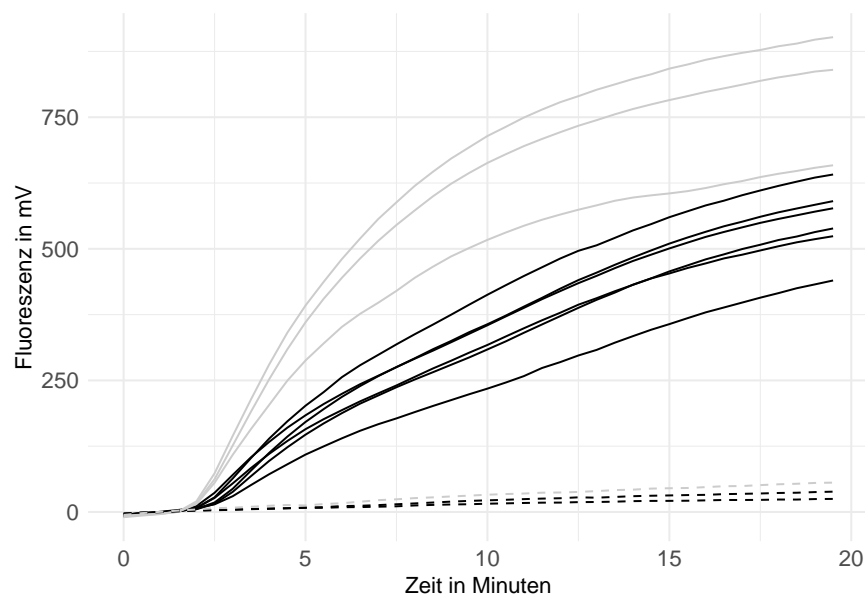


Abbildung 11: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im geringvolumigen Ansatz (schwarz) bei 42 °C in n=6 (siehe ??) mit dem in 1.2.2 angegebenen Primer-Sonden-Set. Als Virus-RNA wurden 10^8 RNA-Kopien des Standards eingesetzt.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

1.2.4 Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza A RT-RPA

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 µl) bei 10^8 Kopien pro Ansatz untersucht (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten der Temperaturoptimierung bei 38 °C (blau), 40 °C (gelb) und 42 °C (orange) sind in Abbildung 12A dargestellt. Es ist zu beobachten, dass eine höhere Reaktionstemperatur zu niedrigeren TT-Werten führt. So 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-RPA's 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.

1.2.5 Optimierung der Influenza A RT-RPA mit asymmetrischen Primer-Konzentrationen

Wie in den Kapitel 1.1.5 und 1.1.6 gezeigt, führt eine asymmetrische Erhöhung der Reverse Primer-Konzentration in der geringvolumigen RPA zu einer höheren Fluoreszenzauslenkung. Um diesen Effekt auf die Standard RPA zu adaptieren und für Influenza A RT-RPA zu nutzen, wurde eine Optimierung der asymmetrischen Primer-Konzentration in der Standard-RPA bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/µl und 42 °C durchgeführt. Dabei wurde eine 1,5X erhöhte (0,625 µM) und eine 2X erhöhte (0,9 µM) reverse Primer-Konzentration mit der Referenz (keine veränderte Primer-Konzentration) verglichen (Kapitel ??). 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 (gelb) und der Referenz mit normaler Primer-Konzentration (blau) um rund 750 Einheiten zu beobachten. Eine weitere Erhöhung um rund 300 Fluoreszenzeinheiten ist bei der 2X erhöhten reverse Primer-Konzentration (orange) 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 erhöhten reverse Primer-Konzentration ein anfängliches Ditching (markiert durch den roten Pfeil). Um dieses bei zukünftigen Messungen zu vermeiden, wurden eine 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration als Optimal festgelegt und für die weiteren RT-RPA's verwendet.

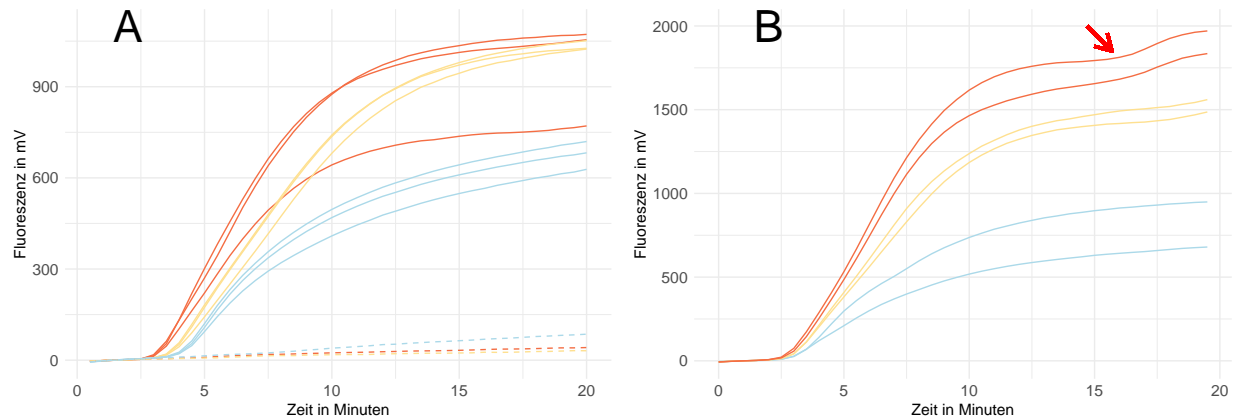


Abbildung 12: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerasymmetrie der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 50 μ l Ansatz.

A: Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (blau), 40 °C (gelb) und 42 °C (orange) mit 10^8 RNA-Kopien/Ansatz. Messung in $n=3$ pro Temperatur. Negativkontrollen sind gestrichelt (- -) gekennzeichnet.

B: Optimierung der Primerasymmetrie mit 1,5X erhöhter reverse Primer-Konzentration (gelb) und 2X erhöhter reverse Primer-Konzentration (orange) sowie mitgeführter Referenz (blau, 1X Primer-Konzentration) bei einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/Ansatz. Messung in $n=2$ pro Primer-Konzentration. Der rote Pfeil zeigt anfängliches Ditching bei der 2X erhöhten reverse Primer-Konzentration.

1.2.6 Optimierung der Mischzeit der Influenza RT-RPA

Wie in Kapitel ?? beschrieben, führt ein zusätzlicher Mischschritt zu einer besseren Amplifikation. Ebenfalls konnte Anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden, dass der Mischschritt in der Standard-RPA einen großen Einfluss bei niedrigen RNA-Konzentrationen (10^4 Kopien abwärts) auf die Amplifikation ausüben kann. Für die Optimierung des Mischschrittes für die Influenza A RT-RPA wurden 5 Mischzeitpunkte (7 min, 5 min, 3 min, 2 min und 90 s) bei einer Temperatur von 42 °C, einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l durchgeführt (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 13 dargestellt. Wie in Abbildung 13A zu sehen, führen die Mischzeiten bei 5 Minuten (orange) und 7 Minuten (blau) zu einer deutlich niedrigeren Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (ohne Mischen, gelb). Dabei hebt sich die RT-RPA mit einem Mischschritt nach 7 Minuten nicht von den mitgeführten Wasserkontrollen ab und weist in der Auswertung (Kapitel ??) 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 (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) als die Referenz ($9,05 \pm 0,58$ min) auf. Des Weiteren ist eine plötzliche Abnahme der Fluoreszenz bei den beiden Messreihen (markiert durch einen roten Pfeil) zu erkennen, welche 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 (rot) 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 (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang). In Abbildung 13B sind die Messreihen mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 90 Sekunden (blau) und 2 min (orange) zusammen mit der Referenz (gelb) 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 Reaktionsfluoreszenzverlauf zeigt. 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 mittleren 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. Aufgrund der höchsten Fluoreszenzauslenkung am Ende der Messung wurde der Mischschritt nach 2 Minuten als Optimal festgelegt.

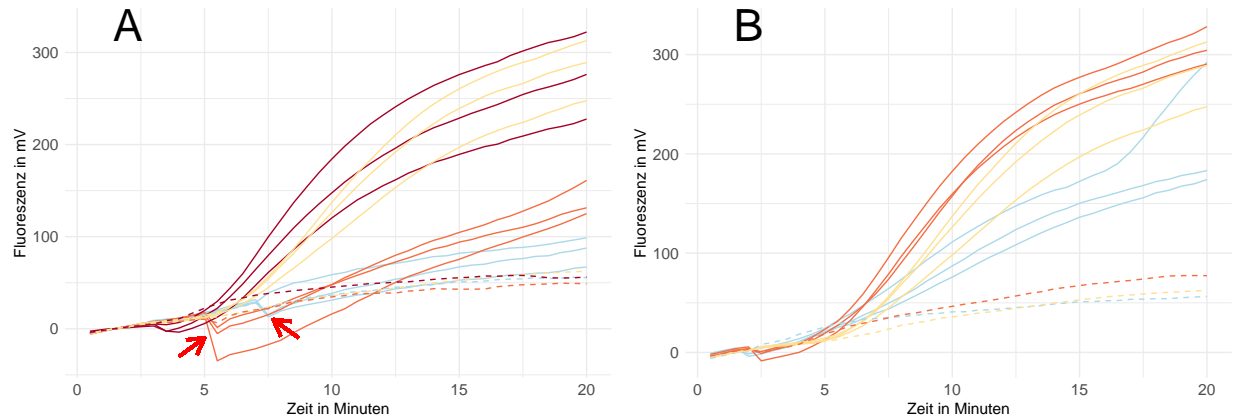


Abbildung 13: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Reaktion.

A: RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (rot), 5 min (orange), 7 min (blau) sowie der Referenz ohne Mischen (gelb) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l. Alle Messungen wurden in $n=3$ durchgeführt. Die Abnahme der Fluoreszenz nach dem Mischschritt ist mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit (- - -) dargestellt.

B: Vergleich zwischen den Mischzeiten nach 90 s. (blau) und 120 s. (orange) mit eingefügter Referenz ohne Mischen (gelb) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l. Alle Messungen wurden in $n=3$ durchgeführt. Negativkontrollen sind gestrichelt (- - -) dargestellt.

1.2.7 Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA

Analog zur Influenza B RT-RPA (Kapitel 1.1.8) wurde die analytische Sensitivität zur Beschreibung der Influenza A RT-RPA für beide Subtypen mit der Standard RPA (Reaktionsvolumen 50 µl) ermittelt und mit der RT-PCR verglichen (Kapitel ??). Die Messungen erfolgten mit den als optimal bestimmten Reaktionsparametern (42 °C, Mischen nach 2 min, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration). Für die Berechnung wurde der Schwellenwert für den p-Wert des Shapiro-Wilk-Test in Kapitel ?? auf 0,05 angepasst. Die Abbildung 14 zeigt die Fluoreszenzdaten der dekadischen Verdünnungsreihe ($2 \cdot 10^7$ bis $2 \cdot 10^0$) für die jeweiligen Subtypen (Abbildung 14A, B), die daraus ermittelten Kalibriergeraden der TT-Werte im Zusammenhang mit der eingesetzten RNA-Konzentration (Abbildung 14C, D) und das berechnete Detektionslimit (Abbildung 14E). Für beide Subtypen (H1N1, H3N2) 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 den 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 in der Auswertung nicht als positiv ermittelt werden und wurde als Messfehler eingestuft. Die Kalibriergerade lässt sich für beide Subtypen mit der Gleichung von $y = 11 - 1,2x$ beschreiben. Der Messfehler sowie generell negative Amplifikationen wurden hierbei vernachlässigt. Bei beiden Subtypen liegt der ermittelte p-Wert «0,05, was einen starken und signifikanten linearen Zusammenhang aufzeigt. 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 Detektionslimit für die Influenza A RT-RPA liegt für beide Subtypen bei 251,1 RNA-Kopien.

Bei dem Vergleich mit der RT-PCR liegen die berechneten Detektionslimits für die jeweiligen Subtypen bei 13,1 RNA-Kopien (H1N1-Subtyp) und 32,2 RNA-Kopien (H3N2-Subtyp). Dies entspricht einer Differenz von 219,9 Kopien für den H3N2 Subtyp bzw. 238 Kopien für den H1N1 Subtyp.

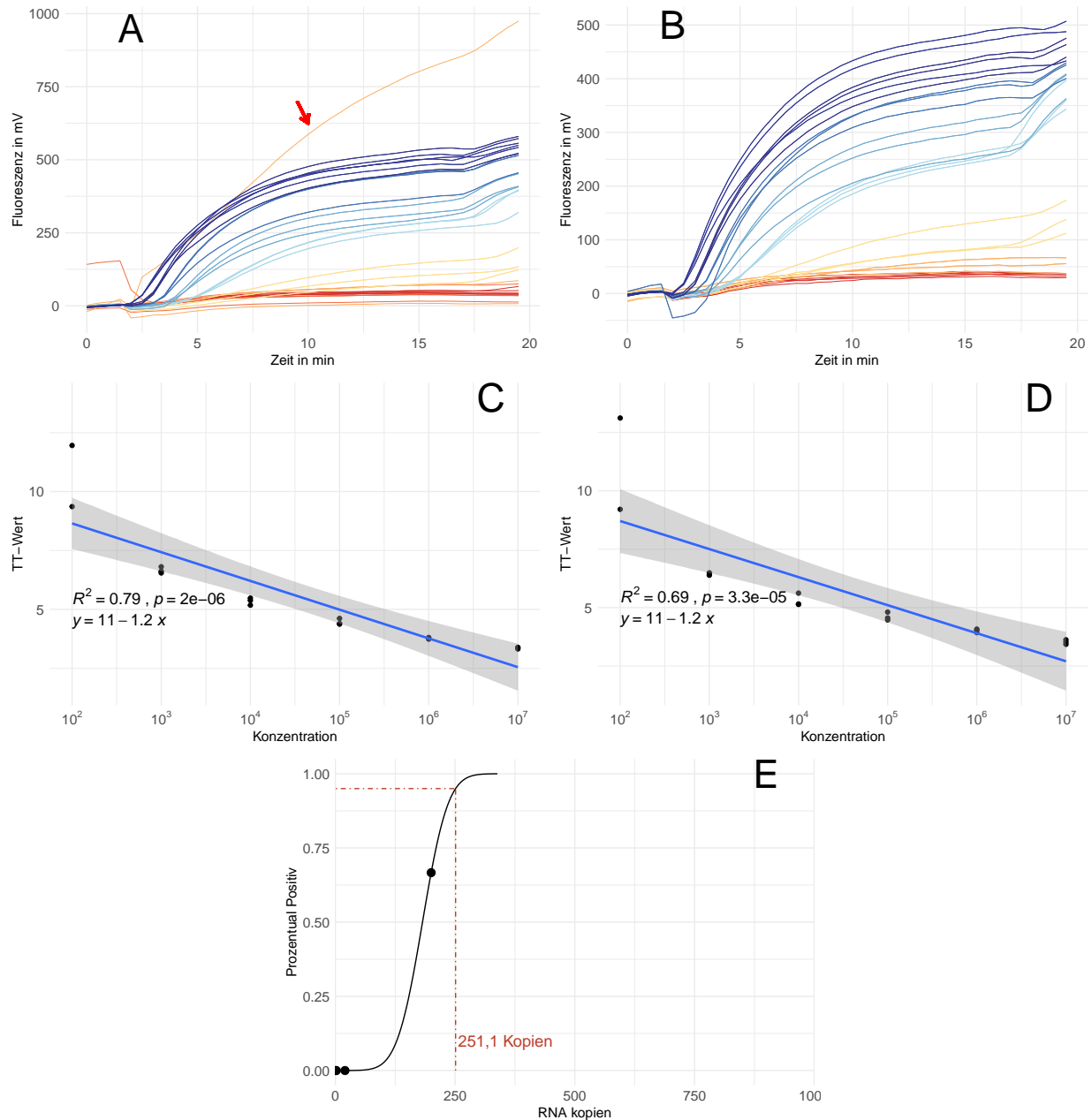


Abbildung 14: **Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA:**

A, B: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ und 10⁰ RNA-Kopien pro Messung mit dem H1N1-Standard (A) und dem H3N2-Standard (B) sowie Wasserkontrollen. Jede Verdünnung wurde mit n=3 gemessen. Der Messfehler bei 10¹ (roter Pfeil) wurde 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-Regressionsgraph der RT-RPA. Die rot gestreifte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind.

1.2.8 Einfluss des Sondendesigns auf die Influenza A RT-RPA

Wie in Kapitel ?? beschrieben, können Sonden für die RT-RPA als *iQ* und als *dT-Quenched* modifiziert werden. Damit untersucht werden kann, ob die unterschiedlichen Sondenmodifikationen einen Einfluss auf die RT-RPA haben können, wurde die Influenza A RT-RPA mit den gewählten optimalen Parametern (42 °C, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 2 min) mit beiden 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 stetiges, unspezifisches Hintergrundsignal bei ≈ 50 Einheiten, während bei *dT-Quenched*-Sonde nur minimale Hintergrundsignale detektiert wurden. Es konnte ein Unterschied (statistische Auswertung, Tabelle ??, Anhang) zwischen den TT-Werten mit $4,89 \pm 0,07$ min (*iQ*) und $4,53 \pm 0,05$ min (*dT-Quenched*) festgestellt werden. Generell lässt sich festgestellt, dass die *dT-Quenched*-Sonde höhere Fluoreszenzwerte zeigt.

Um den beschriebenen Effekt der *dT-Quenched*-Sonde auf die Sensitivität zu untersuchen, wurde eine Sensitivitätsanalyse analog zu Kapitel 1.2.7 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 das Detektionslimit für beide Subtypen bei 147,5 RNA-Kopien berechnet werden. Das entspricht einer Sensitivitätsverbesserung 49 % für beide Subtypen.

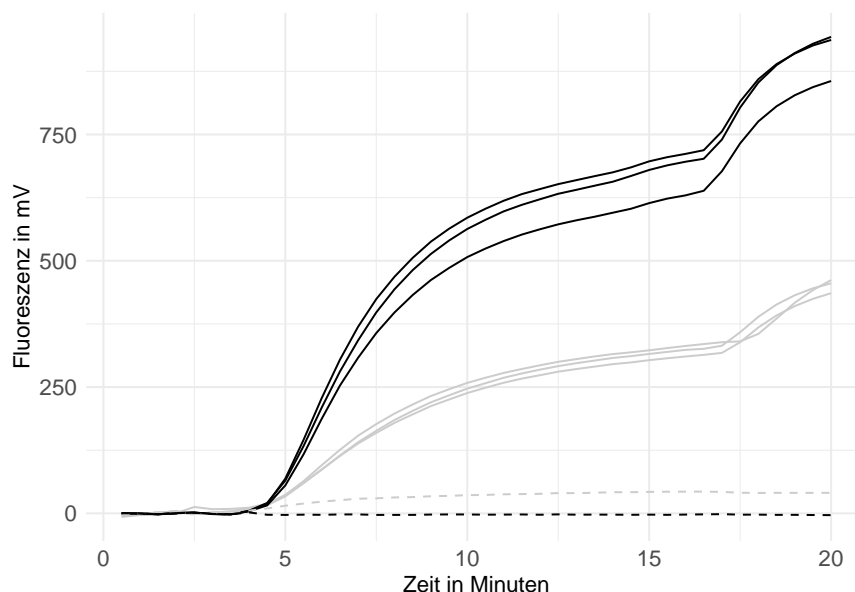


Abbildung 15: **Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Vergleichs zwischen der *iQ*-Sonde (grau) und der *dT-quenched*-Sonde (schwarz, Modifikationen siehe Abbildung ??) mithilfe der Influenza A RT-RPA. Die Messung wurde mit den optimalen Reaktionsparametern (42 °C, mischen nach 2 min, 1,5X reverse Primer-Konzentration) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l (H1N1-Standard) in $n=3$ durchgeführt. Negativkontrollen sind gestrichelt (- - -) gekennzeichnet.

Wie in Kapitel 1.1.8 anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden konnte, kann ein humaner Nukleinsäurenprobenhintergrund einen Einfluss auf das Detektionslimit ausüben. Um einen möglichen Einfluss der Referenzproben auf das Detektionslimit der optimierten Influenza A RT-RPA im Standardvolumen (50 μ l)

mit der *dT-Quenched*-Sonde zu untersuchen, wurde eine Sensitivitätsanalyse mit den Referenzproben analog zu 1.2.7 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 bei dem Ansatz mit einem RT-RPA Standardvolumen.

Zur besseren Übersicht ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: 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 und Referenzproben	147,5 RNA-Kopien	147,5 RNA-Kopien

1.2.9 Bestimmung der Spezifität der Influenza A RT-RPA

Ähnlich wie bei der Influenza B RT-RPA wurde Spezifität als wichtiger Parameter zur Beschreibung der optimierten Influenza A RT-RPA untersucht. Die Messung erfolgte mit der *dT-Quenched*-Sonde und den optimierten Reaktionsparametern (42 °C, Mischen nach 2 min, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration). Die getesteten Viren sowie die Auswertung der Amplifikation sind in Tabelle 4 gezeigt. Es konnten keine der untersuchten Viren detektiert werden.

Tabelle 4: Spezifitätsmessung der Influenza A RT-RPA

Virus	Detektion mittels RT-RPA
Influenza B Yamagata Linie	(-)
Influenza B Victoria Linie	(-)
Influenza A H7N5	(-)
Rhinovirus B	(-)
Rhinovirus C	(-)
hRSV Typ A	(-)
hMPV Typ A1	(-)
Adenovirus Typ 34	(-)

Notiz:

(-) = Keine Amplifikation; hRSV = Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus; hMPV = Humanes Metapneumovirus

- 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)." *Clin. Chem.* 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>.
- Keresting, 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>.
- Lutz, Sascha, Patrick Weber, Max Focke, Bernd Faltin, Jochen Hoffmann, Claas Müller, Daniel Mark, et al. 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>.
- 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>.
- Saah, Alfred J. 1997. "'Sensitivity' and 'Specificity' Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings." *Annals of Internal Medicine* 126 (1): 91. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-126-1-199701010-00026>.
- Wang, Ying, Xiangdong Li, Dongmei Xi, and Xiaoqiang Wang. 2019. "Visual Detection of *Fusarium Proliferatum* Based on Asymmetric Recombinase Polymerase Amplification and Hemin/g-Quadruplex DNAzyme." *RSC Advances* 9 (64): 37144–47. <https://doi.org/10.1039/c9ra05709a>.