

Bachelorarbeit

# Entwicklung und Optimierung eines isothermen Amplifikationssystems zur Detektion von Influenza A und B Viren-RNA für die Point-of-care Diagnostik

Julius Rublack

Matrikel Nr.: 3801533

10. Februar, 2023

Erstbetreuer: Dr. rer. nat. Gregory Dame

Zweitbetreuer: Dr. rer. nat. Barbara Hansen

Institut für Mikrobiologie und Virologie

Medizinische Hochschule Brandenburg - Theodor Fontane

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
2.1	Viren - Die Gefahr aus dem nichts . . . . .	1
2.2	Die Influenza Viren - Pandemieversucher Nr. 1 . . . . .	1
2.2.1	Influenza A . . . . .	2
2.2.2	Influenza B . . . . .	4
2.3	Nachweismethoden von Influenza . . . . .	5
2.4	Amplifikation . . . . .	5
2.4.1	Die Polymerase Kettenreaktion . . . . .	6
2.4.2	Isotherme Amplifikation . . . . .	7
2.4.3	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation . . . . .	7
2.4.4	Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation . . . . .	8
2.4.5	Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	10
2.5	Ziel der Arbeit . . . . .	11
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
3.1	Bioinformatische Methoden . . . . .	13
3.1.1	Primer- und Sondendesign für die Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	13
3.1.2	Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen . . . . .	13
3.1.3	Statistische Auswertung der Amplifikationen . . . . .	14
3.1.4	Vergleich von Anstiegszeiten . . . . .	16
3.1.5	Probit-Analyse . . . . .	17
3.2	Herstellung synthetischer RNA-Standards . . . . .	17
3.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA . . . . .	17
3.2.2	Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen . . . . .	18
3.2.3	Sequenzierung der extrahierten Plasmide . . . . .	19
3.2.4	Restriktionsverdau zur Plasmidlinearisierung . . . . .	19
3.2.5	DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus . . . . .	19
3.2.6	<i>In Vitro</i> Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards . . . . .	20
3.2.7	RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA . . . . .	20
3.3	Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem RNA-Hintergrund . . . . .	20
3.4	Nukleinsäure Amplifikation . . . . .	21
3.4.1	Reverse Transkription Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) . . . . .	21
3.4.2	Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz . . . . .	21
3.4.3	Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low volume Ansatz . . . . .	23
3.4.4	Primerscreening für die RT-RPA . . . . .	23
3.4.5	Optimierung der Reaktionstemperatur für die Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	24
3.4.6	Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	24
3.4.7	Optimierung der Primerassymetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	24
3.4.8	Einfluss der Primerassymetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	25
3.4.9	Ermittlung der Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA . . . . .	25

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
4.1	Entwicklung und Optimierung der Influenza RT-RPA . . . . .	26
4.1.1	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA . . . . .	26
4.1.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer . . . . .	27
4.1.3	Optimierung der InfB RPA . . . . .	28
4.1.4	Einfluss der Primerassymetrie auf die RT-RPA . . . . .	31
4.1.5	Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA . . . . .	32
4.2	Influenza A . . . . .	35
4.2.1	Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA . . . . .	35
4.2.2	Entwicklung der InfA-RPA Primer . . . . .	36
4.2.3	Optimierung InfA . . . . .	37
4.2.4	InfA Sensitivität . . . . .	39
4.2.5	Einfluss der des Sondengesigns auf die RT-RPA . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>VI</b>

# Abbildungsverzeichnis

1	Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus . . . . .	3
2	Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP . . . . .	8
3	Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA . . . . .	9
4	Schematischer Reaktionsmenismus der RPA . . . . .	11
5	Schematischer Aufbau der RPA-Sonden . . . . .	14
6	Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung . . . . .	27
7	Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen. . . . .	28
8	Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA . . . . .	29
9	Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie. . . . .	30
10	Optimierung der Mischzeit für die Influenza B RT-RPA. . . . .	31
11	Einfluss der Primerassymetrie auf der RT-RPA . . . . .	32
12	Etablierung der Influenza B RPA im Original- und 8tel-Ansatz. . . . .	34
13	Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plas- mide. . . . .	35
14	Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen. . . . .	37
15	Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA . . . . .	38
16	Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie der Influenza A RT-RPA. . . . .	39
17	Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA. . . . .	40
18	Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA. . . . .	41
19	Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA. . . . .	42
20	Plasmidkarte des Influenza B Plasmides . . . . .	III
21	Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard . . . . .	IV
22	Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard . . . . .	V

# Tabellenverzeichnis

1	Übersicht und Vergleich der Proteine von Influenza A und B (Modifiziert nach Sandt et al. (2015)) . . . . .	5
2	Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm . . . . .	13
3	Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR . . . . .	18
4	Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes . . . . .	21
5	Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes . . . . .	21
6	Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes . . . . .	22
7	Temperaturprotokoll für die Influenza PCR . . . . .	22
8	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes . . . . .	23
9	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz . . . . .	24
10	Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz . . . . .	24
11	Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA . . . . .	27
12	Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA . . . . .	36
13	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8 . . . . .	I
14	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8 . . . . .	I
15	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8 . . . . .	I
16	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung ??A . . . . .	I
17	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung ??B . . . . .	II
18	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8 . . . . .	II

# 1 Abkürzungsverzeichnis

## 2 Einleitung

### 2.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Bakterien sind eine ernstzunehmende Bedrohung für Menschen und Staaten. Dabei sorgen virale Epidemien und Pandemien wie die Spanische Grippe (1918) mit über 50 Millionen Toten ([Dharmapalan 2020](#)), das Chikungunya Virus (2006) mit mehr als 1,3 Millionen Infizierten ([Charrel, Lamballerie, and Raoult 2007](#)), und die aktuelle SARS-CoV-2 Pandemie mit weit über 140 Millionen Infizierten ([Bai, Zhong, and Gao 2021](#)) für weltweite Krisen und Milliarden Schäden ([Louie et al. 2009](#)).

Viren lassen sich als ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, bestehend aus einer Proteinhülle mit einem **DNA oder RNA** Kern beschreiben. Sie haben keinen eigenen Reproduktionsmechanismus und sind auf die Infizierung von anderen Zellen angewiesen, welche mithilfe ihrer Reproduktions-Maschinerie die Viralen Komponenten vervielfältigen ([Modrow et al. 2010](#)). Viren zeigen eine hohe Mutationsrate wodurch neue Varianten entstehen und diese, durch leicht veränderte Infektionsstrukturen Immunlücken besetzen ([Sanjuán and Domingo-Calap 2016](#)). Dadurch entstehen neue Infektionsherde und Pandemien ([quelle?](#))

Gerade die vorherrschende SARS-Cov-2 Pandemie hat gezeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um die Gesundheitssysteme zu entlasten und die Infektionsketten zu unterbrechen ([Valera et al. 2021](#)). Dabei ist die Polymerase Ketten Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) die vorherrschende Testmethode, da sie durch die Amplifikation von Nucleinsäuren hohe Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht. Jedoch benötigt die PCR meist mehr als 24h bis zum Ergebnis, sowie spezialisierte Laboratorien und geschultes Personal ([Brendish, Schiff, and Clark 2015](#)). Dadurch kann es schwierig werden, die Infektionsketten erfolgreich zu unterbrechen, da erkrankte Patienten binnen der 24h weitere Personen infizieren können ([Sharma et al. 2021](#)). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Diagnostik mit sensitiven und kostengünstigen Alternativen zu ergänzen, welche vor Ort durchgeführt werden können; das sogenannte *Point of care testing* (POCT) ([Goble and Rocafort 2016](#)). Ein großes Feld innerhalb der PoCT spielen dabei isotherme Amplifikationstechniken, welche ebenfalls Erreger anhand ihrer Nukleinsäuren detektieren, jedoch keine großen Geräte erfordern und kürzere Testzeiten bieten. Dadurch können diese Techniken innerhalb des PoCT dezentral für die Diagnostik verwendet werden, was zu einer schnelleren Detektion und somit zu einem unterbrechen der Infektionsketten führen kann ([Pumford et al. 2020](#); [Islam and Koirala 2022](#)).

### 2.2 Die Influenza Viren - Pandemieversacher Nr. 1

Die Grippe, verursacht durch die Influenza Viren ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit mehr als 300000 Todesfällen weltweit ([RKI 2019](#); [Uyeki et al. 2022](#)). Mehrere Influenza Pandemien erfolgten in den letzten 100 Jahren, darunter die bekannte Spanische Grippe (1918) mit über 50 Millionen toten ([Paules and Subbarao 2017](#); [Biggerstaff et al. 2014](#)). Weitere Pandemien waren die Asiatische Grippe (1957), die Hongkong Grippe (1968) sowie die Schweinegrippe (2009) bei welcher durch eine Reassortierung in Schweinen die Viren auf den Menschen übersprangen ([Paules and Subbarao 2017](#)).

Die zur Virusfamilie der Orthomyxoviren gehörige Influenza Viren sind behüllte, einzelsträngige RNA-Viren. Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5'-3' Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Abschnitte unterteilt ([Modrow et al. 2010](#)). Die Influenza Viren lassen sich in die vier Typen A, B, C und D unterteilen. Von diesen können alle außer D, welcher nur

Rinder und Schweine als Wirt befällt (Foni et al. 2017), Menschen infizieren und Krankheiten verursachen (Javanian et al. 2021). Typ A besitzt von den vier die höchste Virulenz (S. J. Yoo, Kwon, and Lyoo 2018) und ist für die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verantwortlich. Dieser wird abermals in viele Subtypen anhand von Oberflächenproteinen unterteilt, wovon die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 derzeit in der Bevölkerung kursieren (Javanian et al. 2021). Influenza Typ B infiziert ausschließlich Menschen und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Jedoch ist die Pandemiegefahr eingeschränkt, da er kein tierisches Reservoir besitzt und somit die Verbreitung gezielter begrenzt werden kann. Bei Influenza B findet keine Einteilung in Subtypen statt, jedoch sind zwei genetisch differenzierbare Viruslinien (Victoria/2/1987-like und Yamagata/16/1988-like) bekannt (Koutsakos et al. 2016). Influenza Typ C besitzt ähnlich wie Influenza B keine Pandemie-Gefahr und ruft eher milde Krankheitsverläufe hervor. Bei Infektion von Kindern wurden jedoch Infektionen der unteren Atemwege beobachtet. Neben humanen Infektionen sind auch Schweine als Wirt bekannt (Hause et al. 2013; Njouom et al. 2019).

### 2.2.1 Influenza A

Das zur Virusfamilie der Orthomyxoviren gehörige Influenza A Virus ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA Virus. Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5'-3' Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 1). Das ca. 13.500 bp große, segmentierte Genom codiert dabei für mindestens 17 Proteine, wobei die 3' und 5' Regionen keine codogenen Bereiche enthalten, sondern komplementär zueinander sind. Dadurch bilden sie über eine kurze Distanz einen Doppelstrang aus, welcher als Signalsequenz bei Transkription dient (Modrow et al. 2010; X. Chen et al. 2018). Von den 17 codierten Proteinen zählen 10 als Essentiell Wichtig, während der Rest als Accessoire-Proteine zählt (Vasin et al. 2014). Zu den essentiellen Proteinen zählen die Neuraminidase (NA), welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das Hämagglutinin (HA), welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixproteinen (M1), das Membranprotein (M2), die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, das nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, Pb1 und Pb2 der RNA-Polymerase (Luo 2011; Krammer et al. 2018). Die Accessoire-Proteinen sind auf alternativen offene Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) codiert. Diese erlauben es Viren eine größere Protein-Vielfalt auf engen genomischen Raum, durch die "mehrfachverwendung" einer Nukleotid-Sequenz, zu exprimieren. Diese alternativen ORF entstehen dabei durch verschiedene molekularbiologische Mechanismen, wie *frame shifting* bei welchem das Ribosom bei der translation eine Base überspringt und somit den Leseramen ändert, *readthrough* bei dem das Ribosom ein Stopp-codon überspringt, oder *internal Ribosom Entry* wobei das Ribosom an ein internes Start-Codon durch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird, sowie einige weitere (Firth and Brierley 2012). Zu den Accessoire-Proteinen zählen unter anderem das 2012 entdeckte nichtstruktur Protein 3 (Selman et al. 2012), das von M2 abstammende M42 (Wise et al. 2012) und die dem PA zugehörigen Proteine PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger et al. 2012; Muramoto et al. 2013).

Die RNA-abhängige RNA Polymerase des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 1 gezeigt aus den 3 Untereinheiten PA, PB1 und PB2, wobei die Gensequenz für PA auf dem Segment 3, für PB1 auf dem Segment 2 und PB2 auf dem Segment 1 codiert sind (Krammer et al. 2018). Das heterotrimer assoziiert innerhalb des Virus mit den komplementären Sequenzen an den jeweiligen Enden der einzelnen Genom-Segmente. Der restliche Teil der einzelsträngigen RNA wird von oligomeren NP gebunden, welches auf dem Segment 5 codiert ist. Dieser RNA-Protein-Komplex ist in der Literatur als vRNP-Komplex (engl.: *viral ribo-*



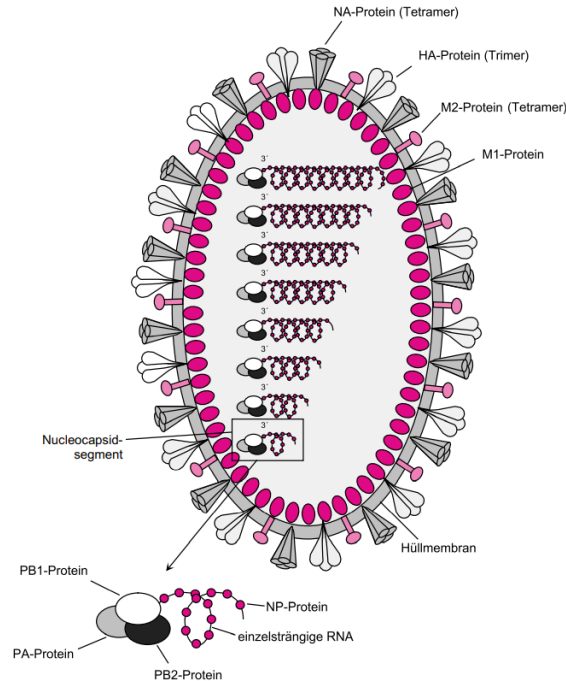


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den Längen der einzelnen Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Modifizierte nach Modrow et al. (2010).

*nucleoprotein*) beschrieben (Krammer et al. 2018; Velthuis and Fodor 2016). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des vRNP-Komplex zeigten eine doppel-helikae Struktur mit einer Schleife am nicht RNA-Polymerase assoziierten Ende. Die Helix-Struktur wird dabei durch eine Assoziation von unterschiedlich polaren oligo-NP-Proteinen stabilisiert (Arranz et al. 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung aus einer äußeren cholesterol haltigen doppel-Lipid Schicht, in welche die glycoproteine NA, HA und M2 integriert sind (To and Torres 2019; Modrow et al. 2010). Hier schon erwähnen, dass die Membran vom wirt und nicht vom Virus stammt? Oder das doch lieber beim Infektionsmechanismus Die darunter liegende Proteinmatrix besteht aus oligomeren M1-Proteinen, welche auf dem Genom-Segment 7 codiert sind. Dieses Matrixprotein dient als Angelpunkt und bindet alle anderen Struktur-bildenden Komponenten wie den vRNP-Komplex, die Membranbindenden Glycoproteine, sowie die Lipidmembran durch seine positive Polarität (Kordyukova et al. 2018; Chlanda and Zimmerberg 2016). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essentielle Rolle bei dem Zusammenbau des Virus und der nachfolgenden Umhüllung mit Wirts-Lipiden, dem sogenannten *Budding* (Nayak et al. 2009). Durch seine komplexe Funktion und die verschiedenen Bindungsdomänen für die anderen Strukturkomponenten, ist die Aminosäuresequenz des M1-Protein am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley and Mahy 1983; Kordyukova et al. 2018). Das M2-Protein ist ein Ionen-Kanal, welcher im Verlauf der Virus-Infektion eine wichtige Rolle spielt. Einerseits wird durch eine Ansäuerung des Virusinneren die Freilassung des genetischen Materials mediiert und andererseits durch den pH-Wert regulierung um den Golgi-Apparat das Budding durch Konformationsänderung des HA zu vermitteln (To, Surya, and Torres 2016; Takeuchi and Lamb 1994). Die oberflächen Proteine HA und NA sind am variabelsten und spielen aus dem Grund bei der Klassifizierung der Influenza A Viren eine große Rolle (Krammer et al. 2018). Sie sind der Hauptangriffspunkt von neutralisierenden Antikörpern und lassen sich in

verschiedene Subtypen einteilen. Derzeit sind 18 Subtypen der HA bekannt (H1-H18) und 11 Subtypen der NA (N1-N11), welche sich abermals in Untergruppen und Kladen unterteilen lassen (Shao et al. 2017). Während nur die Subtypen H1-H3 und N1-N2 für den Menschen relevant sind kann Geflügel von allen Subtypen des Influenza A Virus befallen werden (Nicholson, Wood, and Zambon 2003). Die hohe Variabilität der HA und NA-Proteine lässt sich durch die spezielle RNA-Polymerase der Viren erklären. Diese besitzt eine hohe Fehlerate, wodurch es während der Replikation zu Mutationen kommt, welches wiederum zu veränderten Oberflächenproteinen führt (Luo 2011). Dieser Prozess ist als “Antigendrift” bekannt und führt dazu, dass neue Varianten dem Immunsystem von vorher Infizierten Individuen entgehen kann (Luo 2011; Axelsen et al. 2014). Ein weiterer wichtiger Teil der generellen Variabilität des Influenza A Virus ist der sogenannte Antigenshift. Durch das segmentierte Genom und die verschiedenen tierischen Reservoirs kann bei gleichzeitiger Infektion ein Austausch einzelner Genomsegmente erfolgen. Dies führt zu einer spontanen Neukombination der einzelnen Viruskomponenten und somit zu einer neuen HA, NA Subtyp-Kombination (Kim, Webster, and Webby 2018). **Abschlussatz nach dem Motto: deswegen ist Infuenza unberechenbar und kann plötzlich auftauchen oder so haha**

**Infektionsmechanismus? oder wird das zu lang?**

## 2.2.2 Influenza B

Das Influenza B Virus ist ein ständiger Begeleiter des Influenza A Virus und co-zirkuliert zusammen mit dem Influenza A Virus in saisonalen Epidemien (Sandt et al. 2015). Jedoch liegt der Fokus der Forschung auf dem Influenza A Virus, da hier durch die etablierten tierischen Reservoirs ein deutlich erhöhtes Pandemierisiko besteht (Zaraket et al. 2021; Koutsakos et al. 2016). Nichts desto trotz ist das Influenza B Virus für ca. 23 % aller Influenza-Erkrankungen mit einer besonders hohen Mortalität bei Kindern (0 - 18 Jahre) von über 50 % verantwortlich (Zaraket et al. 2021).

Die Genomstruktur und der Aufbau der Influenza B Viren ist identisch mit dem des Influenza A Virus (Hampson and Mackenzie 2006), jedoch unterscheiden sich die Proteine der Viren in Länge, Aminosäure-Komposition und Funktion (Koutsakos et al. 2016). So codiert das Influenza A Genom für mindestens 17 Proteine (Vasin et al. 2014), während das leicht größere Genom des Influenza B Virus mit rund 14,6 kb nur 11 Proteine codiert (Paterson et al. 2003; Sandt et al. 2015). Der Vergleich der einzelnen Proteine mit ihren entsprechenden Aminosäure(AS) -Längen ist in Tabelle 1 gezeigt. Die wichtigsten Unterschiede hierbei sind das NB-Protein, welches ein hochkonserviertes Protein mit Ionenkanalaktivität ist sowie das BM2-Protein (Sandt et al. 2015). Letzteres ist ein kleines hydrophobes integrales Membranprotein, welches eine Ionenaktivität, ähnlich wie das M2-Protein bei Influenza A, besitzt und essentiell für die Virus-Replikation ist (Paterson et al. 2003; Hatta, Goto, and Kawaoka 2004). Weitere Differenzen liegen unter anderem bei der RNA-Polymerase, welche zusätzlich unmethylierte gecappte mRNA's erkennen kann oder bei dem NP-Protein, welches deutliche strukturelle Unterschiede aufweist (Koutsakos et al. 2016).

Des Weiteren besitzt das Influenza B Virus eine langsamere Mutationsrate von geschätzt  $0,14 \times 10^{-3}$  bis  $3,32 \times 10^{-3}$  Substitutionen/Jahr/untersuchter Sequenz als Influenza A mit einer Mutationsrate von rund  $2,68 \times 10^{-3}$  bis  $12,50 \times 10^{-3}$  Substitutionen/Jahr/untersuchter Sequenz (R. Chen and Holmes 2008). Zusätzlich wurden bei dem Influenza B Virus keine großen Veränderungen der antigenen Oberflächenproteine beobachtet, was einerseits vermutlich daran liegt, dass keine tierischen Reservoirs vorhanden sind, andererseits kein Antigenshift mit den Influenza A Viren möglich ist (Paterson et al. 2003).

Tabelle 1: Übersicht und Vergleich der Proteine von Influenza A und B (Modifiziert nach Sandt et al. (2015))

RNA-Segment	Influenza A		Influenza B		Funktion
	Protein	Länge[AS]	Protein	Länge[AS]	
1	PB2	759	PB2	770	Untereinheit der RNA-Polymerase
2	PB1	757	PB1	752	Katalytische Untereinheit der RNA-Polymerase
2	PB1-F2	87		/	Proapoptotische Aktivität, Regulierung der Immunreaktionen, Interaktion mit PB1 zur Regulierung der Polymeraseaktivität
2	PB1-N40	718		/	N-terminal verkürzte Version von PB1; interagiert mit Polymerasekomplex Untereinheiten, Gleichgewicht der PB1- und PB1-F2-Expression, genaue Funktion unbekannt
3	PA	716	PA	726	Untereinheit der RNA-Polymerase
3	PA-X	61		/	Moduliert die Wirtsgenexpression, negativer Virulenzregulator
3	PA-N155	568		/	N-terminal verkürzte Version von PA; Funktion unbekannt
3	PA-N182	535		/	N-terminal verkürzte Version von PA; Funktion unbekannt
4	HA	550	HA	584	Oberflächenglykoprotein; Rezeptorbindung und Membranfusion; antigene Determinante
5	NP	498	NP	560	Verkapselung der viralen genomischen RNA
6	NA	454	NA	486	Oberflächenglykoprotein; Neuraminidase-Aktivität, Freisetzung neuer Viruspartikel nach Budding; antigene Determinante
6		/	NB	100	Ionenkanalaktivität; Funktion unbekannt
7	M1	252	M1	248	viraler Zusammenbau, Budding
7	M2	97	BM2	109	Ionenkanalaktivität; wesentlich für die Entschichtung, Rolle bei der Virusknospung
7	M42	99		/	M2-Isoform mit alternativer Domäne, Ionenkanalaktivität; kann M2 ergänzen/ersetzen
8	NS1	230	NS1	281	Regulierung des viralen RNA-Polymerase-Komplexes, Beeinflussung des antiviralen Zustands der Zelle
8	NS2	121	NS2	122	Kern-Export-RNP, Regulierung von Transkription und Replikation
8	NS3	174		/	NS1-Isoform mit einer internen Deletion; Funktion unbekannt, mögliche Rolle: Wirtsanpassung und Überwindung der Speziesbarriere

\* Y=C oder T; V=A, C oder T \*\* Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

## 2.3 Nachweismethoden von Influenza

## 2.4 Amplifikation

Nachweis-Methoden mit hohen Sensitivitäten und Spezifitäten sind essentiell für eine genaue Diagnose und medizinische Behandlung. Dabei sind Nukleinsäure amplifizierende Methoden (engl.: *nucleic acid amplification techniques*, NAAT) ein mächtiges Werkzeug um genau diese Ziele zu erreichen (Kang et al. 2022). Hierbei

werden einzelne DNA/RNA-Moleküle detektiert und das Signal über verschiedenste Methoden, wie PCR oder isotherme Amplifikation verstärkt (Kang et al. 2022; Özay and McCalla 2021). Des Weiteren sind Benutzerfreundlichkeit, robust, schnell, sowie → auf die POCT herleiten → Paper based tests usw.

#### 2.4.1 Die Polymerase Kettenreaktion

Die PCR, entwickelt von Mullis et al. (1986) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA und ist ein Meilenstein in der Molekularbiologie. Erstmals konnten Nukleinsäuren vermehrt werden und somit für Genetik, Forensik und Diagnostik verwendet werden (Gaňová et al. 2021). Das Prinzip der PCR beruht dabei auf 2 ca. 20 bp großen Oligonukleotiden, die sogenannten Primer, welche spezifisch an ein DNA-Fragment binden und von einer hitzestabilen Polymerase verlängert werden. Ein Primerpaar, bestehend aus forward und reverse Primer flankiert jeweils einen definierten DNA-Abschnitt, welcher in einer PCR amplifiziert wird (Ableitner 2018). Der Reaktionsmechanismus der PCR besteht aus 3 Zyklen; Denaturierung, Hybridisation und Amplifikation. Im ersten Schritt der Reaktion werden durch hohe Temperaturen ( $\sim 95^{\circ}\text{C}$ ) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und die DNA so denaturiert. Bei dem Hybridisationsschritt wird die Temperatur auf 55 - 65  $^{\circ}\text{C}$  erniedrig und es können sich die Primer an die DNA anlagern (Sreejith et al. 2018). Dabei ist der Vorwärtsprimer komplementär zu einer Sequenz auf dem Sense-Strang der DNA und der Rückwärtsprimer komplementär zu einer Sequenz auf dem Antisense-Strang (Mülhardt 2009). Nun kann im nachfolgenden Amplifikationsschritt die Polymerase bei  $\sim 72^{\circ}\text{C}$  die gebundenen Primer Anhand der DNA-Vorlage erweitern und somit die DNA verdoppeln. Für eine erfolgreiche Amplifikation werden mehrere Zyklen hintereinander durchgeführt, wodurch die DNA jedes mal verdoppelt/ **exponentiell vermehrt** wird (Sreejith et al. 2018). Die amplifizierte DNA am Ende der PCR kann über eine Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (Wood et al. 1994). Bei RNA als Ausgangsmaterial wird eine reverse Transkriptase-Reaktion vor der PCR durchgeführt, um die RNA und DNA umzuschreiben. Die DNA kann anschließend über den beschriebenen PCR-Mechanismus amplifiziert werden (Mülhardt 2009). Diese erweiterte PCR wird als reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) in der Literatur bezeichnet (S. A. Bustin et al. 2005).

Eine besondere Form der PCR ist die quantitative PCR (qPCR). Hierbei wird ein fluoreszierendes Reportermolekül dem Reaktionsmix zugesetzt (Ma, Bell, and Loker 2021). Über die Messung der Fluoreszenz kann der DNA-Gehalt während der laufenden Reaktion bestimmt werden. Typische Reportermoleküle sind dabei Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, sogenannten Sonden, welche innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs binden (Ranasinghe and Brown 2005). Das Prinzip der Fluoreszenzsonden beruht dabei auf der Interaktion eines Fluorophors und einem sogenannten Quencher, welche sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befinden. Der Quencher ist ein weiteres Fluorophor, welches von der Emission des Reportermoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) angeregt wird und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann (Ranasinghe and Brown 2005). Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde bei einer erfolgreichen Bindung hydrolysiert und somit Fluorophor und Quencher voneinander getrennt (Thornton and Basu 2011). Der Quencher kann nicht mehr das Signal des Reportermoleküls blockieren und die Fluoreszenz kann detektiert werden. Durch das steigende Fluoreszenzsignal kann ein Rückschluss auf die amplifizierte DNA-Menge erfolgen und Reaktion live verfolgt werden (S. Bustin 2000).

### 2.4.2 Isotherme Amplifikation

Wie bereits in 2.1 erwähnt unterliegt die PCR einigen Limitationen, welche sie für die POCT ungeeignet machen. Isotherme Amplifikationstechniken bieten eine große Alternative bei der Amplifikation von Nukleinsäuren und für die POCT (Kang et al. 2022). Ihr großer Vorteil liegt in der simplen Handhabung und der gleichbleibenden Temperatur. Dadurch ist es möglich Nukleinsäuren mit einfachen Gerätschaften wie beispielsweise einem Wasserbad zur vervielfältigen. Seit den 1990 Jahren wurden viele isotherme Methoden entwickelt, welche unterschiedliche Eigenschaften kombinieren und somit ein Repertoire für verschiedenste Applikationen bildet (Zhao et al. 2015). In dem folgenden Kapiteln werden ausgewählte isotherme Methoden vorgestellt.

### 2.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation

Die erstmal im Jahr 2000 von Notomi (2000) entwickelte Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (engl.: *loop mediated isothermal amplifikation*, LAMP) ist eine effektive isotherme Amplifikationsmethode von DNA bei einer Konstanten Temperatur von 60 - 65 °C. Im Gegensatz zur der PCR werden bei der LAMP 4 bis 6 Primer verwendet, um die Nukleinsäure zu amplifizieren. Dadurch erreicht die LAMP einerseits sehr hohe Spezifitäten, da die 4 essenziellen Primer binden müssen, andererseits aber hohe Anforderung an die Optimierung und das Primer-Design (Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska 2021). Die Primer werden dabei in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer unterteilt. (Nagamine, Hase, and Notomi 2002). Die äußeren Primer, bestehend aus forward und reverse Primer sind zweigeteilt, wobei der 3'-Teil jedes Primers komplementär zum jeweiligen Strang (forward- / reverse-Strang) ist. Der zweite Teil der Primer hingegen ist komplementär zu einer Stelle auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang. Diese Zweiteilung der Primer sorgt im späteren Verlauf der Reaktion für die Bildung einer Hantel ähnlichen Struktur. Die äußeren Primer, ebenfalls bestehend aus forward und reverse Primer binden weiter außen auf dem DNA-Doppelstrang und liegen in niedrigerer Konzentration vor als die inneren Primer. Zusätzlich können optional die Loop Primer verwendet werden, welche in den Köpfen der gebildeten Hantelstruktur binden (Huang et al. 2020). Ebenfalls nötig für die Amplifikation ist eine DNA-Polymerase, welche eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt (Park 2022).

Der Reaktionsmechanismus der LAMP kann in zwei Phasen unterteilt werden; der nicht zyklischen Phase und der zyklischen Phase. Im ersten Schritt der nicht zyklische Phase hybridisiert einer der inneren Primer mit seinem 3'-Ende an die zu amplifizierende DNA. Dadurch kann eine Strangverlängerung des Primers durch die Polymerase stattfinden und mithilfe der Strang Verdrängungs-Aktivität wird der ursprüngliche Doppelstrang abgelöst. Anschließend bindet der äußere Primer hinter dem neu entstandenen Doppelstrang, es findet abermals eine Strangverlängerung statt und der innere Primer mit der neu synthetisierten DNA wird verdrängt. Der nun entstandene DNA-Einzelstrang besitzt an einem Ende die Sequenz des inneren Primers, und bildet durch den hinteren komplementären Teil des Primers eine Schleife aus. Der beschriebene Amplifikations-Schritt wird mit den entgegen gesetzten inneren und äußeren Primern wiederholt, sodass eine einzelsträngige DNA entsteht, welche an beiden Enden die Sequenzen der inneren Primer besitzt. Dadurch nimmt diese einzelsträngige DNA, die oben erwähnte Form einer Hantel an und der nicht zyklische Teil der Amplifikation ist damit beendet (Parida et al. 2008).

Die gebildete Hantelstruktur dient in der zweiten Phase der Amplifikation als Startpunkt. Hier können nun die verschiedenen Primer gleichzeitig binden und somit die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigen. Ebenfalls dient das 3'-Ende der Hantelstruktur als Primer und somit als Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf

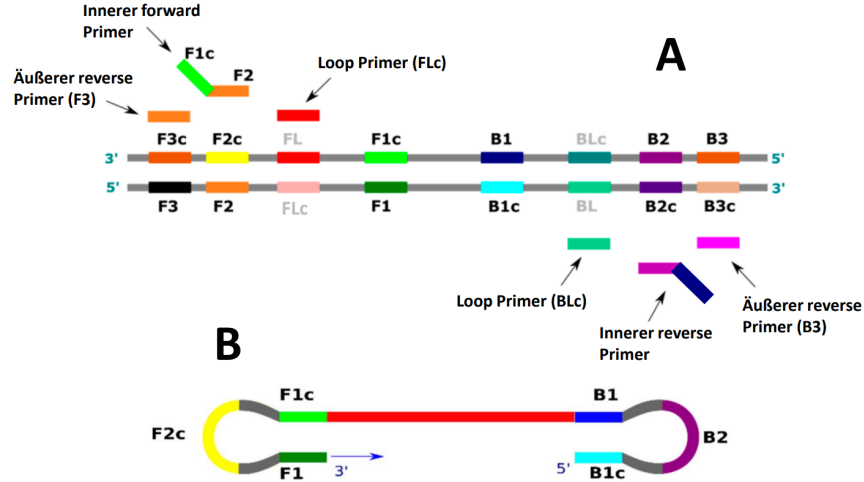


Abbildung 2: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP:** **A:** Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußeren Primer liegen "hinter" den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung für eine Verdrängung des DNA-Strangs. **B:** Hantelstruktur als Ausgangspunkt der zyklischen Phase. Die verschiedenen Bindestellen dienen als Startpunkte einer Amplifikation, wodurch eine exponentielle Amplifikation erreicht wird. Modifiziert nach Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska (2021)

der Reaktion entstehen verschiedenste Strukturen wie Konkatemere und blumenkohlähnliche Strukturen mit vielen Schleifen (Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska 2021; Silva, Pardee, and Pena 2019). Ebenfalls kann durch das zusätzliche Einbringen der Loop Primer, die Anzahl der Startpunkte abermals erhöht werden, was zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit führt (Nagamine, Hase, and Notomi 2002). Eine Amplifikation von RNA ist ebenfalls unproblematisch möglich, jedoch muss eine Reverse Transkriptase Reaktion vor der LAMP vorgeschaltet werden (Chander et al. 2014).

Zur Detektion der Amplifikation können kolorimetrische Fluoreszenzfarbstoffe wie Calcein, welche vor der Messung zugegeben werden (Tomita et al. 2008) oder Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I, welche nach Abschluss der Amplifikation zugegeben werden (Iwamoto, Sonobe, and Hayashi 2003) verwendet werden. Durch die eine hohe DNA-Endkonzentration von 10-20 µg am Ende der Reaktion kann eine Auswertung mit dem bloßen Auge erfolgen (Parida et al. 2008). Ebenfalls kann die Messung der Trübung für den Nachweis einer Positiven Reaktion verwendet werden. Durch die extrem hohe Menge an synthetisierter DNA entstehen große Mengen an Pyrophosphat, welches Magnesium-Ionen bindet und bei hohen Konzentrationen ausfällt. Diese Fällung führt zu einer Trübung der Reaktionsmischung, welche wiederum quantifiziert werden kann (Mori et al. 2001).

#### 2.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation

Die Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA), auch bekannt unter *self-sustained sequence replication* (3SR) ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode zum Nachweis von Nukleinsäuren (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Die erstmals von Guatelli et al. (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzym-mix bestehend aus einer reversen Transkriptase (RT), des avian myeloblastosis Virus, der RNase H und einer T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (DdRp) (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Eine Besonderheit der NASBA



liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer Primer 1 an das 3'-Ende einer einzelsträngigen RNA. Dadurch eignet sich die NASBA besonders zum Nachweis von RNA-Molekülen, da diese direkt zum Start der Reaktion benötigt werden. Durch diese Eigenschaft unterscheidet sich die NSABA zu anderen Amplifikationsmethoden, wo ein RT-Schritt vorgeschaltet werden muss (Compton 1991; Bachman 2013; Zhang et al. 2021). Dabei hybridisieren nur 20 bp am 3'-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5-Ende hingegen besitzt eine Promotor-Erkennungssequenz für die DdRp. Nachdem der Primer gebunden hat, wird eine cDNA bei einer Temperatur von 41 °C von der im Reaktionsmix enthaltenen RT synthetisiert. Das entstandene cDNA/RNA-Hybrid wird anschließend von der RNase H verdaut, sodass der einzelsträngige DNA-Anteil mit der Promotorsequenz im Reaktionsmix enthalten ist. Ein zweiter 20 bp langer Primer2, welcher komplementär zur DNA ist, hybridisiert und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche um die 100 RNA-Kopien pro DNA-Template erzeugt. Die neu entstandenen RNA-Moleküle gehen in den ersten Zyklus der NASBA ein, indem der Primer2 hybridisiert, die RT ein cDNA/RNA hybrid erzeugt und der RNA-Anteil durch die RNase H hydrolysiert wird. An diese cDNA bindet wiederum Primer1 und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang, sodass der Promotor wieder aktiv wird und neue RNA-Kopien erstellt werden können (Compton 1991).

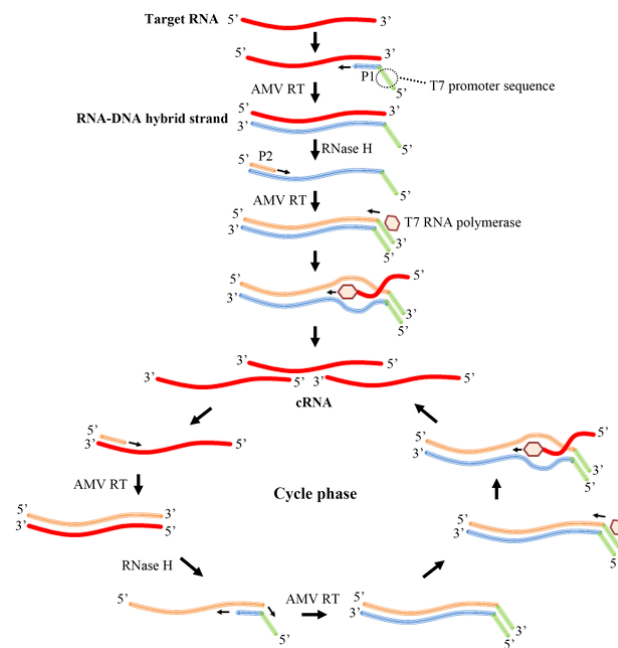


Abbildung 3: **Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der NASBA mit der Initialen Phase und der zyklischen Phase. Die Anfängliche RNA wird durch die Hybridisation von Primern in ein DNA/RNA hybrid überführt, dieses über einen RNase verdaut und erneute DNA Synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt. Durch den auf dem Doppelstrang aktiven Promotor werden viele RNA-Kopien erzeugt, welche in den Amplifikationszyklus eingehen. Modifiziert nach Zhong and Zhao (2018).

Die Amplifikation von DNA-Molekülen als Ausgangsmaterial mittels NASBA ist ebenfalls möglich, jedoch mit einem erhöhten Aufwand und zusätzlichen Denaturierung-Schritten (Malek, Sooknanan, and Compton 1994). Hierbei hybridisiert nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C Primer1 mit der Ziel-DNA und wird durch die frisch dazugegebene RT verlängert. Da kein cDNA/RNA hybrid entstanden ist, kann

die RNase nicht den Gegenstrang hydrolysieren und ein weiterer Denaturierungsschritt ist nötig. Durch die hohen Temperaturen wird jedoch die RT inaktiviert, wodurch sie mit den anderen Enzymen neu zugegeben werden muss. Anschließend bindet Primer2, der Doppelstrang wird vervollständigt und die DdRp kann über den aktiven Promotor RNA-Kopien erstellen (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002).

Zur Detektion und Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle hybridisations-Sonden sogenannte “Molecular-Beacon” verwendet werden (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Diese besitzen die Struktur einer Stem-Loop, wobei das eine Ende mit einem Reporterfluorophor und das andere Ende mit einem Quencher gekoppelt sind. Die Stem-Loop ist dabei so ausgebildet, dass die beiden Enden der Sonde komplementär zueinander sind und somit Reporterfluorophor und Quencher in direkter Nähe zueinander liegen, wodurch der FRET-Effekt einsetzt. Die Sequenz innerhalb der ausgebildeten Schleife ist komplementär zu einer Region auf dem zu detektierenden RNA-Molekül. Bei der Bindung der Sonde an die Zielregion öffnet sich die Schleife, Reporterfluorophor und Quencher werden voneinander getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden (Omran et al. 2022).

#### 2.4.5 Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die von (Piepenburg et al. 2006) entwickelte Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) ist ein von dem Replikationszyklus der T4 Bakteriophage angepasstes isothermales Amplifikationssystem (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Der Mechanismus beruht dabei auf einem Zusammenspiel aus mehreren Enzymen (recombinase, recombinase loading factor, single-stranded binding protein und DNA-Polymerase), welche die vervielfältigung von DNA koordinieren (Li, Macdonald, and Stetten 2019; [anquelle?](#)). Im ersten Schritt bindet die T4 UvsX Rekombinase mithilfe des T4 UvsX Rekombinase Co-Enzyms unter ATP verbrauch an einzelsträngige Primer (Daher et al. 2016; Lobato and OSullivan 2018). Der entstandene Rekombinase-Primer-Komplex migriert entlang doppelsträngiger DNA und sucht zu den gebundenen Primern homologe Sequenzen. Wird ein homologer Bereich gefunden, verdrängt der Komplex den Doppelstrang und bindet mithilfe des Primers unter Bildung einer D-Schleife an den homologen DNA-Einzelstrang. Der Rekombinase-Komplex dissoziiert nach erfolgreicher Primerbindung unter ATP verbrauch und kann wieder an neue Primer binden. Eine rehybridisierung und die damit verbundene Verdünnung des gebundenen Primer durch den abgespaltenen DNA-Einzelstrang wird durch die Anlagerung von single stranded binding Proteins (SSB's) an diesen Verhindert (Babu, Ochoa-Corona, and Paret 2018). Anschließend bindet die DNA-Polymerase (Sau DNA polymerase, abgeleitet von dem Bakterium *staphylococcus aureus*) an das freie 3'-OH Ende des hybridisierten Primers und verlängert diesen komplementär zur DNA. Dabei besitzt die Sau DNA Polymerase eine Strangverdrängungsaktivität, wodurch die den DNA-Doppelstrang weiter aufbrechen und somit die Verlängerung des Primers fortsetzen kann. Dies führt zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA (Babu, Ochoa-Corona, and Paret 2018; Tan et al. 2022).

Um unter anderem eine Dissoziation des Rekombinase-Primer-Komplexes zu unterbinden und so die Amplifikation zu beschleunigen wird ein Polyethylen Glucol (PEG) mit hohem molekularem Gewicht, ein sogenannter “Crowding-Agent” verwendet (Lobato and OSullivan 2018; Lillis et al. 2016). Dieser trägt zu einer Viskosität der Reaktionslösung bei und erschwert so die Diffusion. Zusammen mit den niedrigen Reaktionstemperaturen von ~40 °C und der dadurch geringen Thermischen Konvektion kann es zur lokalen Reagenzien-Knappheit kommen, wodurch eine Minderung der Amplifikationsrate entsteht. Aus diesem Grund kann vor allem bei niedrigen DNA-Konzentrationen ein zusätzlicher Mischschritt während der laufenden RPA-Reaktion erforderlich sein (Lillis et al. 2016). Ebenfalls kann Analog zur RT-PCR, die RPA mit einer



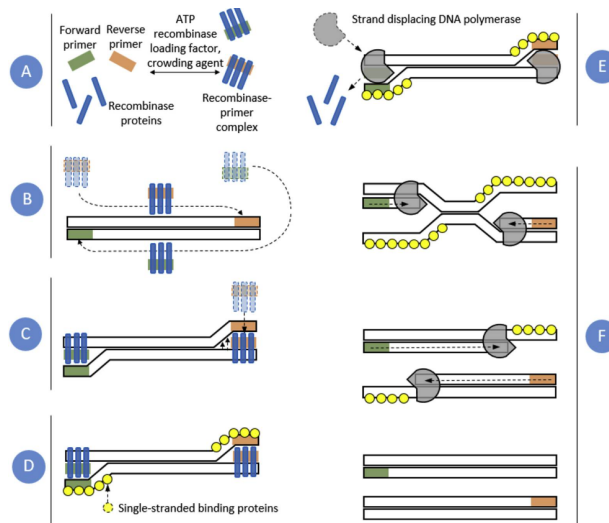


Abbildung 4: **Schematischer Reaktionsmenismus der RPA:** **A:** Bildung der Rekombinase-Primer-Komplexe unter ATP verbrauch. **B:** Migration der Rekombinase-Primer-Komplexe entlang der Ziel DNA bis zu den homologen Primersequenzen. **C:** Insertion des Rekombinase-Primer-Komplexes in die doppelsträngige DNA mit der Bindung des Primer an die komplementäre Sequenz. **D:** Stabilisierung der einzelsträngigen DNA durch die SSB's. **E:** Dissoziation der Rekombinase nach erfolgreicher Primerbindung und beginn der Amplifikation durch die Polymerase. **F:** Fortschreiten der Amplifikation bis zwei neue komplementäre doppelsträngige DNA-Moleküle vorliegen und der Mechanismus von vorne beginnen kann. Modifiziert nach Lobato and OSullivan (2018).

Reversen Transkripase Reaktion kombiniert werden um RNA zu vervielfältigen (H. M. Yoo, Kim, and Kim 2021).

Ein wichtiger Punkt der RPA ist das spezielle Primerdesign. Im gegensatz zur PCR werden hier längere Oligonukleotide (zwischen 30 - 35 bp) verwendet, welche ein Amplifikationsbereich von wenigen 100 Nukleotiden einspannen (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Ein automatisiertes Programm für das Design der RPA-Primer ist in der Literatur beschrieben (Higgins et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass bis zu drei Nukleotid-Mismatches in den jeweiligen Primern, die Detektion nicht beeinflussen (Boyle et al. 2013), auch wenn eine Studie von Higgins et al. (2022) zum Schluss kam, dass viel mehr die Kombination der Mismatches als die Anzahl einen Einfluss auf die Reaktion hat (Higgins et al. 2022). Die

solidphase RPA

8tel ansatz erwähnen

## 2.5 Ziel der Arbeit

Das Projekt R&C.net befasst sich mit der Erstellung eines mobilen Kofferlabors für die Point of Care Diagnostik und vor Ort Analytik. Schwerpunkt bildet dabei die Detektion viraler Atemwegs-Infektionserkrankungen. Ziel der Arbeit ist es, jeweils ein RPA-System für den Einsatz im Kofferlabor zum Nachweis der Influenza A und B Viren zu entwickeln. Dabei soll das Influenza A System die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nachweisen können und die Influenza B RPA alle PAN-Influenza B Viren detektieren können. Die Entwicklung der RPA-Systeme unterteilt sich dabei in das Design von Primer-Sonden-Sets, welche anschließend auf Eignung geprüft werden, sowie Sensitivitäts- und Spezifitätstest des geeigneten Systems. weiterführend soll die Wirk-

samkeit der Entwickelten RPA-Systeme in einem klinischen Probenhintergrund getestet und die Sensitivität mit PCR-Systemen für die Detektion der gleichen Viren verglichen werden. Um diese Tests durchführen zu können ist die *in vitro* Erstellung einer artifizieller viraler RNA notwendig. Des Weiteren ist es ein Ziel Optimierungsschritte zur Verbesserung der RPA-Performance der entwickelten Systeme vorzunehmen. Dabei sollen Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt der Reaktion sowie Ansatzvolumen im Vergleich zwischen 50 µl und 6 µl (8tel Ansatz) untersucht werden. Zusätzlich soll überprüft werden, ob eine Primerassymetrie einen positiven Einfluss auf die Reaktion ausübt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Bioinformatische Methoden

Einführende Worte (keine Ahnung was lol)

#### 3.1.1 Primer- und Sondendesign für die Rkombinase Polymerase Amplifikation

Für die Erstellung der RPA Primer und Sonden zur Detektion des Influenza A und B Virus wurde das von Higgins et al. (2018) entwickelte Programm *PrimedRPA* verwendet. Die Parameter für die Ausführung des Programms sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm

Parameter	Wert
Länge der Primer	30 - 34 bp
Länge der Sonde	50 bp
Sondentyp	Exonuclease Sonde
Nukleotid-Wiederholungs-Grenzwert	5 bp
GC-Gehalt für Primer und Sonde	40 - 60 %
Hintergrund-Kreuzreaktivitäts-Grenzwert	65 %
Prozentuale Primer-Sonden Dimersierungstoleranz	40 %

Als Referenzsequenz für das Influenza A Virus dienten die Sequenzen des Virusgenomsegmentes 7 der Subtypen H1N1 (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2 (GenBank Nr.: MT244214). Die Primer und Sonden wurden so gewählt, das sie 3 oder weniger Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Subtypen aufweisen. Für das Influenza B Virus diente das Virusgenomsegment 8 (GenBank Nr.: MT637911) als Referenzsequenz. Alle konstruierten Primer/Sonden Sets wurden mit dem Online-Programm *PrimerDimer*<sup>1</sup> von Johnston et al. (2019) auf Eigenhybridisierung und Dimerbildung mit den anderen Konstrukten untersucht. Im Anschluss wurden die Primer-Sonden-Sets mit DNA-Sequenzen des gleichen Virusgenomsegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Fehlpaarungen durch die Einführung von degenerierten Primern vermieden. Für das Alignment wurde das Online-Programm *Clustal Omega*<sup>2</sup> verwendet (Sievers and Higgins 2017). Für die Influenza A Primer-Sonden-Sets wurden zusätzlich degenerierte Basen eingeführt, um eine optimales Alignment an die Sequenzen der beiden Subtypen zu gewährleisten. Bei den Influenza B Primer/Sonden Sets war dies nicht notwendig, da die Sequenzen im gewählte Bereich vollständig Homolog sind.

#### 3.1.2 Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen

Der Mechanismus der Signalgenerierung von Fluoreszenzsonden ist bei PCR und RPA gleich. Es Beruht auf wie bereits erwähnt (siehe 2.4.1) dem FRET-Prinzip, welches während der Reaktion durch die räumliche Trennung des Reporterfluorophors und des Quenchers außer Kraft gesetzt wird.

<sup>1</sup><http://www.primer-dimer.com/>

<sup>2</sup><https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

## PCR-Sonden

Alle verwendeten PCR-Sonden wurden am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Zusätzlich wurde an der 9. Basenposition ein zweiter Quencher eingebaut um unspezifische Signale zu verringern (Biomers 2023b).

## RPA-Sonden

Das Design der RPA-Sonden erfolgte wie in Behrmann et al. (2020) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde die erste Thymin-Base nach ca. 30 bp mit dem Reporterfluorophor markiert, gefolgt von einer a-basischen Seite. Diese besteht aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat ohne Nucleobase. Nachfolgend wurde über interne "linker" an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrades der nächsten zwei Nukleotide ein entsprechender Quencher gekoppelt (siehe Abbildung 5). Am 3'-Ende wurde die Sonde mit einem dreikettigen Kohlenstoff-Rest versehen, um eine Kettenverlängerung der Sonde zu unterbinden (Behrmann et al. 2020; Biomers 2023a). Zusätzlich wurde für das Influenza A virus eine zweite Sonde mit der gleichen Sequenz, wie beschrieben Modifiziert. Die Kopplung des Quenchers erfolgte jedoch an das nachfolgende dT-Nukleotid (siehe Abbildung 5).

**Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den Längen der einzelnen Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Modifiziert nach Modrow et al. (2010).

**Schematischer Aufbau der RPA-Sonden:** Modell der RPA sonde mit Reporterfluorophor, Quencher, a-basischer Seite und Kohlenstoffrest gebunden an die Ziel-DNA. **A:** Sonde mit intern gebundenem Quencher (*internally quenched*). **B:** Sonde mit dT-gekoppeltem Quencher (*dT-quenched*).

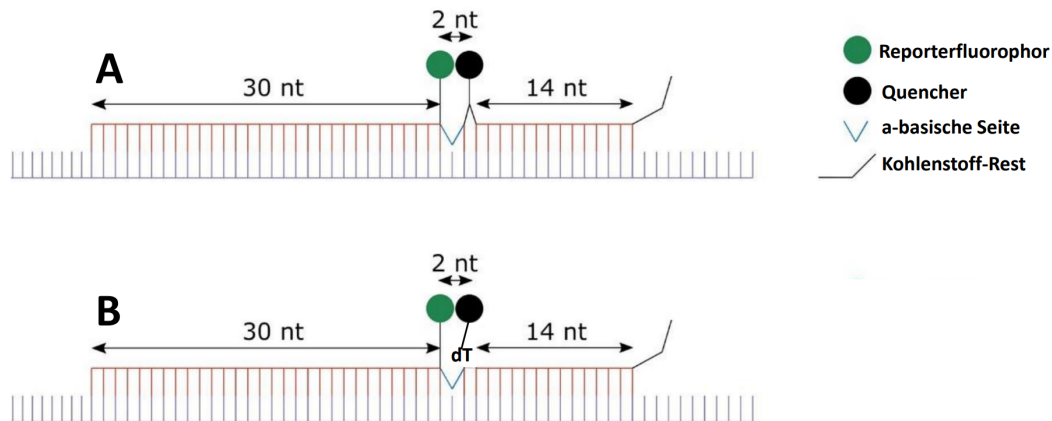


Abbildung 5: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den Längen der einzelnen Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Modifiziert nach Modrow et al. (2010).

### 3.1.3 Statistische Auswertung der Amplifikationen

Für die Entwicklung und Optimierung von Amplifikationsverfahren ist eine einheitliche statistische Auswertung notwendig (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015). Als Werkzeug einer digitalen Analyse wurde die "open source" Programmiersprache R verwendet, welche für spezifische Anwendungen durch die Verwendung sogenannter "packages" beliebig erweiterbar ist (Pabinger et al. 2014).

### Normalisierung der Fluoreszenz-Daten:

Für die Normalisierung der Daten wurde der Mittelwert der ersten fünf Messwerte jeder Amplifikationskurve berechnet, wie bei Ritz and Spiess (2008) beschrieben und von diesem Datensatz subtrahiert.

### Ermittlung signifikanter Amplifikationen:

Die Überprüfung, ob es sich bei den gemessenen Fluoreszenz-Datensatz um eine positive Amplifikation handelt, wurde mit dem *chipPCR* Paket, von Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack (2015) entwickelt, durchgeführt. Für die Auswertung wurden folgende Tests aus diesem package vorgenommen.

*Shapiro-Wilk Test:* Negative Amplifikationen unterliegen einem gleichmäßig starken Rauschen, weswegen eine Normalverteilung der Daten gegeben ist. Bei positiven Amplifikationen hingegen sind die Daten durch den linearen Anstieg in der exponentiellen Phase der Amplifikation nicht mehr normalverteilt. Anhand dieser Gesetzmäßigkeit lassen sich durch einen Test auf Normalverteilung positive von negativen Amplifikationen unterscheiden (Rödiger et al. 2022). Mithilfe des Shapiro-Wilk Tests für Normalität (beschrieben durch SHAPIRO and WILK (1965)) für Normalität wird der Datensatz auf Normalverteilung getestet. Bei errechneten P-Werten von  $\geq 5 \cdot 10^{-4}$  liegt keine Normalverteilung mehr vor und der Datensatz wird als positive Amplifikation gewertet.

*Residuen Wachstums Test:* Bei diesem Test wird die Stabilität der Residuen in der linearen Phase des Anstiegs untersucht. Residuen lassen sich bei einer linearen Regression als Abweichung der einzelnen Messwerte zu der vorhergesagten Gerade verstehen. Dabei wird der horizontale Abstand der einzelnen Messpunkte zu der berechneten geraden verwendet (Fahrmeir et al. 2016). Bei negativen Amplifikationen weichen die Fluoreszenzwerte von dem linearen Modell ab. Dadurch korrelieren die Residuen im Gegensatz zu positiven Amplifikationen stark mit den Fluoreszenzwerten. Anhand eines Schwellenwertes von 0,5 wird diese Korrelation untersucht und der Datensatz als positive bzw. negative Amplifikation eingestuft (Rödiger et al. 2022).

*Vergleichs Test:* Innerhalb dieses Tests wird untersucht, ob die ersten 20 % des Datensatzes sich signifikant von den letzten 15 % unterscheiden. Dazu werden die beiden Datengruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, beschrieben durch Mann and Whitney (1947), verglichen. Dieser Test erlaubt eine Aussage, ob zwei unabhängige Datengruppen sich signifikant voneinander unterscheiden (Mann and Whitney 1947). Bei einem p-Wert  $< 0,05$  besteht ein solcher Unterschied und es handelt sich um eine positive Amplifikation.

*Signal Level Test:* Dieser Test vergleicht zwei aus dem Datensatz berechnete Werte. Ersterer berechnet sich aus Formel (1), wobei  $MAD^3$  (engl. *mean-absolute deviation*) für die absolute Standardabweichung steht (siehe R-Dokumentation). Der zweite Wert ist das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, engl. *signal noise ratio*), berechnet mit Formel (2) (quelle?). Bei einem um 25 % erhöhtem Wert des SNR im Vergleich zum ersten Wert wird die Amplifikation als positiv gewertet (Rödiger et al. 2022).

$$Median + 2 * MAD \quad \text{mit} \quad MAD = n^{-1} \sum_{i=1}^n |O_i - \bar{O}| \quad (1)$$

$$SNR = \frac{\text{Mittelwert der Fluoreszenzwerte}}{\text{Standardabweichung der Fluoreszenzwerte}} \quad (2)$$

*Polygon Test:* Innerhalb dieses Tests wird der Anstieg pro Zeitintervall mit Formel (3) aufsummiert. Bei positiven Amplifikationen erreicht die Summe höhere Werte als bei negativen Amplifikationen, da hier das stärkere Rauschen der Daten die Endsumme niedrig hält. Als Schwellenwert für eine positive Amplifikation wurde hier empirisch ein Wert von 10 festgelegt. (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

<sup>3</sup><https://search.r-project.org/CRAN/refmans/ie2misc/html/madstat.html>

$$((x_2 - x_1)) * ((y_2 + y_1)) \hat{=} (\Delta t) * ((y_2 + y_1)) \quad (3)$$

Des Weiteren wird oft bei Analysen von Echtzeit-Amplifikationsmethoden mit einen Schwellenwert gearbeitet. Sollte dieser während der Messung nicht überschritten werden, wird die Amplifikation als negativ eingestuft (Aranha et al. 2021). Um dies zu berücksichtigen wurde ein weiterer Test, der *Schwellenwert Test*, eingeführt. Für die Berechnung des Schwellenwertes wurde die von Frey, Canzio, and Zurakowski (1998) beschriebene Methode verwendet. Diese beruht auf dem Median der gesamten Daten, zu welchem ein Faktor addiert wird. Der Faktor bildet sich dabei aus der Standardabweichung  $SD$  der Daten multipliziert mit einem Term bestehend aus der Probenanzahl  $n_1$  und den Werten einer einseitigen Student's t-Verteilung (siehe Formel (4)) (Frey, Canzio, and Zurakowski 1998). Die Student's t-Verteilung ist dabei eine Art der Wahrscheinlichkeitsverteilung, welche es erlaubt möglichst genaue Berechnungen für kleine Stichproben durchzuführen (Fisher 1992). Für die Schwellenwertberechnung wurden mindestens sechs Negativkontrollen als Datensatz verwendet. Das Konfidenzintervall für die t-Verteilung wurde bei 0,99 (99 %) festgelegt.

$$\text{Schwellenwert} = \bar{X} + SD * t \sqrt{1 + \frac{1}{n_1}} \quad \text{mit} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n_2 - 1}} \quad (4)$$

Um eine Amplifikation als positiv einzustufen, müssen alle aufgeführten Tests ein positives Testergebnis aufweisen. Sobald ein oder mehrere Tests ein negatives Testergebnis zeigten, wird die Amplifikation als negativ eingestuft.

### Ermittlung der Anstiegszeit

Die Anstiegszeit, in der Literatur bei PCR-System nach den MIQE Richtlinien auch als  $C_q$ -Wert (engl. *quantification cycle*) angegeben, ist der Zeitpunkt bei, die dem Fluoreszenzwerte einer Amplifikation einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten und sich zusätzlich signifikant von dem Grundrauschen unterscheiden (Stephen A. Bustin et al. 2009). Dies lässt sich auch auf die RPA als TT-Wert (engl. *threshold time*) übertragen (Diagne et al. 2020). Für die Ermittlung der Anstiegszeit wurde der im *chipPCR*-Paket vorhandene Befehl "th.cyc" verwendet. Dieser gleicht die Amplifikationskurve im Bereich des vorher festgelegten Schwellenwertes mit einer Polynomfunktion zweiten Grades an und gibt den Schnittpunkt mit dem Schwellenwert als Anstiegszeit aus. Hierzu wurde der im Schwellenwert Test beschriebene Wert (siehe Kapitel 3.1.3) verwendet (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

#### 3.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten

Die Vergleich von Datensätzen ist ein Standardverfahren in der deskriptiven Statistik und wird bei zwei Gruppen mit dem Student's T-Test und bei drei oder mehr Gruppen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt (Kuckartz et al. 2010). Um diese Verfahren durchführen zu können, müssen als Voraussetzungen die Daten Normalverteilt sein und gleiche Varianzen besitzen. Zusätzlich können Daten auf Ausreißer überprüft werden um fehlerhafte Aussagen zu vermeiden (Gehrau, Maubach, and Fujarski 2022). Der Test auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalität durchgeführt (González-Estrada, Villaseñor, and Acosta-Pech 2022). Anschließend wurden die Daten mit der Boxplot-Methode auf Ausreißer untersucht (Gehrau, Maubach, and Fujarski 2022). Datenpunkte, welche als Ausreißer identifiziert werden konnten wurden für die folgenden Tests ignoriert. Der nachfolgende Test auf Varianzhomogenität mit den

bereinigten Daten wurde mithilfe des Levene-Tests durchgeführt (Gastwirth, Gel, and Miao 2009). Bei zwei zu untersuchenden Gruppen mit festgestellter Varianzhomogenität wurde der Student's T-Test durchgeführt. Bei unterschiedlichen Varianzen wird die Voraussetzung für den Student's T-Test nicht mehr erfüllt und es wurde der alternative Welch T-Test durchgeführt (WELCH 1947). Bei einem Vergleich von drei oder mehr Gruppen mit gleichen Varianzen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, welche bei einem p-Wert von unter 0,05 mit einem nachfolgendem Tukey HSD Test kombiniert wurde, um die Verhältnisse zwischen den Gruppen zu untersuchen (Rasch et al. 2014). Bei unterschiedlichen Varianzen wurde eine Welch's Varianzanalyse durchgeführt. Konnten innerhalb der Welch's Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, wurde ein Games Howell Test nachfolgend durchgeführt, um die Verhältnisse der einzelnen Gruppen zu untersuchen (Lee and Lee 2018).

### 3.1.5 Probit-Analyse

Die Probit-Analyse ist eine Form der Regressionsanalyse, welche binäre Fälle (0 und 1) mit einer fortlaufenden Variablen in Verbindung bringt. Dabei wird berechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit  $y$  den Wert 1 an der Stelle  $x$  annimmt. Vereinfacht wird dazu die Normalverteilungsfunktion  $\phi$  auf ein parametrisches Regressionsmodell (siehe Formel (5)) übertragen (Bingham and Fry 2010). Es wird also eine Regression von  $\phi^{-1}(p_x)$  auf  $x$  durchgeführt. Die neue Regressionsgleichung ist in Formel (6) gezeigt (Stahel 1999).

$$p_x = f(\vec{\alpha}, x) + \epsilon_x, \quad (5)$$

$$\hat{q}_i = \phi^{-1}(\hat{p}) = \hat{a}x_i + \hat{b}, i = 1, \dots, k, \quad (6)$$

Die von Bliss (1934) entwickelte Methode wurde ursprünglich für toxikologische Experimente genutzt, um die tödliche Dosis mathematisch zu bestimmen (Bliss 1934). Aufgrund der gleichen Datenlage lässt sich jedoch dieses Modell auch verwenden, um das Detektionslimit anhand einer Konzentrationsreihe für ein Nukleinsäure-Amplifikationssystem zu ermitteln. Die Probit-Analyse anhand von Amplifikationsdaten erfolgte mittels einer R-skripts, entwickelt durch Ole Behrmann, beschrieben in Behrmann et al. (2020).

## 3.2 Herstellung synthetischer RNA-Standards

Zur Etablierung und Optimierung der RPA-Protokolle ist es notwendig, eine definierte Menge amplifizierbarer RNA-Moleküle einzusetzen, damit eine Vergleichbarkeit der Protokolle ermöglicht wird. Dafür wurden *in vitro* molekularbiologisch definierte Virus-RNA Standards der zu amplifizierenden Nukleinsäuren hergestellt. Die RNA-Standards für das Influenza A Virus wurden wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben hergestellt. Da für das Influenza B Virus bereits eine transformierte *E. coli* Kultur in der Arbeitsgruppe vorhanden war, wurde mit dieser erst ab Kapitel 3.2.2 weitergearbeitet.

### 3.2.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die chemische Transformation von NEB<sup>®</sup> 5-alpha kompetenten *E. coli* Zellen (High Efficiency, New England BioLabs<sup>®</sup> GmbH) erfolgte nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll<sup>4</sup> online verfügbar). Als Vektor dienten artifiziell synthetisierte Plasmide der Firma Invitrogen, die einerseits eine Antibiotikaselektivkassette

<sup>4</sup><https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>

sowie andererseits die virale RNA-Sequenz als DNA-Gegenstück beinhalten (Plasmidkarten siehe Abbildung 20 - 22 im Anhang). Die entsprechenden Genebank Nr. der enthaltenen Virus-RNA-Sequenzen sind in Kapitel 3.1.1 erwähnt. Von diesen Plasmiden wurden jeweils 200 ng in die Transformation eingesetzt. Im Anschluss wurden jeweils 25 µl des Transformationsansatzes auf mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml, Roche diagnostics) versetzte LB-Platten (Carl Roth, Fertigmischung, 1,5 % Agar zugesetzt) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung der Transformation wurde eine Kolonie-PCR, eine modifizierte Form der PCR, durchgeführt. Hierbei dient nicht die bloße DNA, sondern die transformierten Bakterien als Ausgangsmaterial. Durch die Wahl spezifischer Primer, welche das gewünschte Insert innerhalb des Plasmids amplifizieren können, wird geprüft, ob die Transformation mit dem Plasmid inklusive des gewünschten Inserts innerhalb der Kolonie erfolgreich war (Bergkessel and Guthrie 2013). Für die PCR wurde der Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) eingesetzt. Eine Kolonie der transformierten *E. coli* wurde in 20 µl PCR-reinem Wasser (Nuklease- und Nukleinsäure-frei, DEPC behandelt, Carl Roth) suspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2 µl mit 18 µl PCR-Mix gemischt und eine PCR im Light Cycler 480 II (Roche) durchgeführt. Das Temperaturprogramm der 2-stufigen PCR ist in Tabelle 3 angegeben. Weitere 5 µl der Suspension wurden auf einer mit Ampicillin versetzten LB-Platte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert, um eine Folgekultur der überprüften *E. coli* zu erhalten.

Tabelle 3: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Zellyse</b>		
95 °C	60 s	1 x
<b>Amplifikation</b>		
95 °C	10 s	45 x*
60 °C	30 s	
<b>Kühlen</b>		
40 °C	30 s	1 x

\* Messung der Fluoreszenz

### 3.2.2 Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen

Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C und 200 RPM über Nacht in 25 ml Lennox LB-Medium kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (Protokoll<sup>5</sup> online verfügbar). Das Prinzip der Qiagen DNA-Reinigung beruht dabei auf einer speziellen alkalischen Lyse der Bakterien kombiniert mit einem Ionen Austausch (QIAGEN 2021). Hierbei wird die negativ geladene DNA an ein positiv geladenes Säulenmaterial wie Diethylaminoethyl (DEAE) Zellulose gebunden (Gautam 2022). Durch in Salzkonzentrationen variierende Puffer kann anschließend die gebundene DNA von Unreinheiten befreit und eluiert werden (Prazeres, Schluep, and Cooney 1998). Die Elution der DNA im letzten Schritt wurde mit 30 µl PCR-reinem Wasser durchgeführt. Eine anschließende Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 8000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

<sup>5</sup><https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0bd0c5fb-c271-43e7-af43-32d539374fa9&lang=en>



### 3.2.3 Sequenzierung der extrahierten Plasmide

Zur Prüfung der DNA-Sequenz, wurde die extrahierte Plasmid-DNA mittels Sequenzierung untersucht. Dabei wird der Plasmidabschnitt mit der Virussequenz über eine PCR amplifiziert und mittels der von Sanger, Nicklen, and Coulson (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Dideoxynucleotiden amplifiziert. (Mülhardt 2009). Als Primer für die aus Kapitel 3.2.2 extrahierte Plasmid-DNA wurde der Vorwärtsprimer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') und der Rückwärtsprimer M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab GmbH.

### 3.2.4 Restriktionsverdau zur Plamidlinearisierung

In Vorbereitung für eine *in vitro* Transkription zum Erstellen viraler RNA wurde die aus Kapitel 3.2.2 extrahierte Plasmid-DNA linearisiert. Dafür wurden Restriktions-Endonukleasen benutzt, welche innerhalb der spezifischen Erkennungssequenzen den DNA-Doppelstrang schneiden (Smith, n.d.). Für das Influenza B Plasmid (siehe Abbildung 20 im Anhang) wurde das Enzym SacI (Fast Digest, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 30 µl einfach konzentriertem Fast Digest Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 6 µl Enzym und 3 µg Plasmid-DNA versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 65 °C für 5 min inaktiviert. Für die Influenza A Plasmide (siehe Abbildung ?? - 22 im Anhang) wurde das Enzym PshAI (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 40 µl einfach konzentriertem Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 3 µg Plasmid-DNA und 1,5 U/µl Enzym versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Sie dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die negativ geladene DNA wandert durch das Anlegen einer Spannung durch ein Trägermaterial (Agarose-Gel) Richtung Anode. Dabei wandern kürzere DNA-Moleküle schneller durch das Trägermaterial als längere, wodurch DNA-Moleküle anhand ihrer Sequenzlänge aufgetrennt werden. Ungeschnittene verschiedene Plasmidformen wie zirkuläre oder supercoilde Plasmide lassen sich so unterscheiden, da die unterschiedlichen Formen für geringere oder stärkere sterische Beeinträchtigung in der Gittermatrix sorgen. Zur visuellen Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen Farbstoff markiert (Mülhardt 2009; Schmidt et al. 1999). Als Trägermaterial diente ein Agarosegel mit 1 % (w/v) Agarose in 1X TRIS-Borat-EDTA-Puffer (Roti®fair, Carl Roth) versetzt mit 1,5 µl Green Gel DNA/RNA Stain (Bio & Sell). Pro Geltasche wurden 100 ng DNA-Material mit 1 µl 6X orange loading DYE (Thermo Fisher Scientific) in einem finalen Volumen von 6 µl analysiert. Als Referenz wurden jeweils 3 µl einer 100bp plus DNA-Leiter (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific) und einer 1 kb DNA-Leiter (PeqGOLD, Thermo Fisher Scientific) mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 80 V für 60 min. Nach der erfolgten Elektrophorese wurde das Gel bei UV-Licht mithilfe des Geldokumentationsgeräts Biorad universal Hood II (Bio-Rad) ausgewertet.

### 3.2.5 DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus

Zur Entfernung von Puffer- und Enzymbestandteile des fertigen Restriktionsansatz zu, wurde das DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. (Protokoll<sup>6</sup> online verfügbar). Die Elution im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10 µl DNA Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl;

<sup>6</sup>[https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4003t\\_d4003\\_d4004\\_d4013\\_d4014\\_dna\\_clean\\_concentrator\\_-5.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf)

pH 8,5; 0,1 mM EDTA; bereitgestellt von Kit). Anschließend wurde die Quantität und Reinheit der DNA mittels NanoDrop 8000 Spektrophotometer bestimmt.

### 3.2.6 *In Vitro* Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards

Damit realitätsnahe Bedingungen in Bezug auf die Nukleinsäure-Standards erreicht werden, mussten die DNA-Fragmente in RNA transkribiert werden, da dieses das genomische Material der zu untersuchenden Influenza Viren ist. Für diesen Zweck wurde eine Promotor-Region von der viralen Sequenz genutzt (siehe Plasmidkarten ?? - 22 im Anhang).

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) nach Herstellerangaben (Protokoll<sup>7</sup> online verfügbar). Pro Reaktion wurde 1 µg linearisierte und gereinigte DNA aus Kapitel 3.2.4 eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Entfernung residualer Anfangs-DNA aus der RNA-Lösung wurde anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde der Mix mit 70 µl PCR-reinem Wasser verdünnt und 10 µl 10X DNase-Puffer (New England Biolabs) dazugegeben. Die neu entstandene Reaktionslösung wurde mit 4 U DNase I (New England Biolabs) versetzt und abermals bei 37 °C für 15 min inkubiert. Um Puffer- und Enzymbestandteile aus den vorherigen Arbeitsschritten zu entfernen und eine reine RNA-Lösung zu erhalten, wurde das EchoCLEAN RNA CleanUp Kit (BioEcho Life Sciences GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll<sup>8</sup> online verfügbar). Das Prinzip der RNA-Aufreinigungsmethode von BioEcho basiert dabei auf einer Matrix, welche durchlässig für Nukleinsäuren ist, jedoch andere Verunreinigungen bindet (BioEcho 2022).

### 3.2.7 RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA

Zur präzisen RNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Quant-iT RiboGreen RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip des Kits basiert dabei auf der Bindung eines gleichnamigen Fluoreszenzfarbstoffes an die einzelsträngige RNA. Durch die Bindung erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes um den Faktor 1000, so dass eine sensitive Detektion von bis zu 1 ng/ml RNA ermöglicht wird (Jones et al. 1998). Vor der RNA-Konzentrationsbestimmung wurde/wird eine Kalibriergerade im “High-Range” Bereich erstellt. Dazu wurden mit dem im Kit enthaltenen RNA-Standard 5 Kalibrierlösungen im Bereich zwischen 2000 ng/ml und 50 ng/ml mit 1X TE-Puffer (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Die zu messende RNA-Probe wurde vor der Messung mit 1X TE-Puffer auf eine in der Kalibriergerade liegende Konzentration verdünnt. Jede Messlösung der Kalibriergerade sowie zu bestimmende RNA-Lösung wurde 1:1 mit einer Farblösung (RiboGreen 1:200 mit 1X TE-Puffer verdünnt) gemischt. Diese wurde homogenisiert, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend abermals gemischt. Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 Fluoreszenzspektrometer bei 525 nm.

## 3.3 Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem RNA-Hintergrund

Damit überprüft werden kann, ob die Detektion von RNA mittels RT-RPA in einem humanen Probenhintergrund beeinflusst wird, wurden Kontrollproben erstellt. Dazu wurden von gesunden Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Nasopharyngeal-Abstriche mithilfe der 1ml UTM REGULAR FLOQ SWAB (305c, UTM™)

<sup>7</sup><https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/standard-rna-synthesis-e2040>

<sup>8</sup>[https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol\\_EchoCLEANRNACleanupcolumn\\_001\\_EN.pdf](https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol_EchoCLEANRNACleanupcolumn_001_EN.pdf)

entnommen und die RNA mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online<sup>9</sup> Verfügbar). In die erhaltenen RNA-Extrakte wurde in einem 1:10 Verhältnis die entsprechende virale Standard-RNA zugegeben und die Kontrollprobe homogenisiert.

### 3.4 Nukleinsäure Amplifikation

#### 3.4.1 Reverse Transkription Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die Amplifikation von viraler standard RNA mittels RT-qPCR wurde mit dem Luna<sup>®</sup> Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 4) mit 1 µl Virus-RNA-Standard versetzt. Für den in Tabelle 4 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurden je nach Detektionssystem die für Influenza A (siehe Tabelle 5) bzw. Influenza B (siehe Tabelle 6) Primer und Sonden beschrieben durch das Nationale Center für Immunisierung und Respiratorische Krankheiten (NCIRD) verwendet (NCIRD 2021). Dabei sind jeweils die Oligonukleotid-Sequenz, die verwendeten Fluorophore und Quencher sowie die 3'-Position auf der entsprechenden Virus-Genomsequenz (siehe 3.1.1) dargestellt. Die finalen 20 µl Reaktionsmix wurden nach dem in Tabelle 7 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche) gemessen. Für das Hexachlorofluorescein (HEX) Fluorophor wurde im Wellenlängenbereich von ..... gemessen. Die Erfassung des Cyanine 5 (Cy5) Fluorophors erfolgte im Wellenlängenbereich von ..... Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 3.1.3 beschrieben.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes

Bestandteil	Konzentration	Volumen
2X Luna <sup>®</sup> Universal Probe One-Step Reaction Mix	1X	
20X Luna <sup>®</sup> WarmStart <sup>®</sup> RT Enzyme Mix	1X	
40X PSM	1X	
Virus RNA*		1 µl
PCR-reines Wasser		x µl $\sum$ 20 µl

\* Bei Negativkontrollen die Virus RNA mit PCR-reinem Wasser substituiert

Tabelle 5: Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5'→3')	Konzentration	3'-Position	Modifikation
InfA For1	CAAGACCAATCYTGTCACCTCTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA For2	CAAGACCAATYCTGTACCTYTGTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA Rev1	GCATTYTGGACAAAVCGTCTACG*	16 µM	261 bp	/
InfA Rev2	GCATTTTGGATAAAGCGTCTACG	16 µM	261 bp	/
InfA-P	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	8 µM	214 bp	Fluorophor: HEX; Quencher: BMN-Q535**

\* Y=C oder T; V=A, C oder T \*\* Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

#### 3.4.2 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels RPA wurde das TwistAmp<sup>®</sup> exo Kit (TwistDX<sup>™</sup>) verwendet. Die für die RPA verwendeten Oligonukleotide sind für Influenza B in Tabelle 11 und für Influenza A

<sup>9</sup><https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

Tabelle 6: Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5'->3')	Konzentration	3'-Position	Modifikation
InfB For	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG*	16 µM	716 bp	/
InfB Rev	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	16 µM	818 bp	/
InfB-P	CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	8 µM	761 bp	Fluorophor: Cy5, Quencher: BMN-Q620**

\* Y=C oder T; V=A, C oder T \*\* Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Tabelle 7: Temperaturprotokoll für die Influenza PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Reverse Transkription</b>		
55 °C	10 min	1x
95 °C	60 s	
<b>Amplifikation</b>		
95 °C	10 s	45x*
60 °C	30 s	
<b>Kühlen</b>		
40 °C	30 s	1x

\* Messung der Fluoreszenz

in Tabelle @ref(tab:....) angegeben. Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzym pellet zur Resuspendierung übertragen. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion (46,5 µl) wurden in eine Kavität eines 8-ter Messstreifens (Carl Roth) übertragen und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 µl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 µl PCR reines H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben, sowie 2,5 µl Magnesium Acetat (280 mM) in den Deckel der Kavität pipettiert. Zum Start der Reaktion wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert und homogenisiert, um das Magnesium-acetat in den Reaktionsmix einzubringen und somit den benötigten CO-Faktor der Polymerase bereitzustellen (Kück 2005). Die Messung erfolgte nach einer ein minütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Für das Fluorophor Carboxyfluorescein (FAM) wurde die Fluoreszenz in dem Wellenlängen .... bis .... und für das Fluorophor ATTO565 in den Wellenlängen ..... bis ..... detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 eingestellt. Je nach Versuch wurde die Messung für einen zusätzlichen Misch-Schritt unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 3.1.3 beschrieben.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Rehydrationsmixes

Bestandteil	Konzentration	Volumen	Modifikation
Forward Primer	0,45 $\mu\text{M}$		biomers.net GmbH
Reverse Primer	0,45 $\mu\text{M}$		biomers.net GmbH
Sonde	0,13 $\mu\text{M}$		biomers.net GmbH
RevertAid Reverse Transkriptase	10,75 U/ $\mu\text{l}$		Thermo Fisher Scientific
RNase Inhibitor, Murine	1,08 U/ $\mu\text{l}$		New England Biolabs
Rehydrations Puffer		29,5 $\mu\text{l}$	TwistDX
PCR reines Wasser		x $\mu\text{l}$ $\sum$ 46,5 $\mu\text{l}$	

\* Bei Negativkontrollen die Virus RNA mit PCR-reinem Wasser substituiert

### 3.4.3 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low volume Ansatz

Wie bereits durch Behrmann et al. (2020) und Lillis et al. (2016) gezeigt werden konnte, kann das Reaktionsvolumen der RPA verringert werden, welches Vorteile wie eine Unabhängigkeit eines zusätzlichen Mischschrittes mit sich bringt und die RPA zugänglich für mikrofluidische Anwendungen macht (Lillis et al. 2016; Behrmann et al. 2020). Um die Vorteile der “low volume” Applikation für die Influenza A und B Systeme zu übertragen, wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens untersucht.

Dazu wurde eine RPA Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen auf 8 Reaktionen aufgeteilt und so ein neues Reaktionsvolumen von 6,5  $\mu\text{l}$  erhalten. Für 8 Reaktionen wurde dabei insgesamt 40,8  $\mu\text{l}$  Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 9) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzymellet zur Resuspendierung übertragen. Die Zusammensetzung des in Tabelle 9 aufgeführten 50X PSM’s ist in Tabelle 10 gezeigt. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion wurden auf einen 8-ter Messstreifen aufgeteilt (4,8  $\mu\text{l}$  pro Kavität) und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils pro Kavität 1  $\mu\text{l}$  zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1  $\mu\text{l}$  PCR reines  $\text{H}_2\text{O}$  (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben. Darauffolgend wurden 15  $\mu\text{l}$  Mineralöl (Carl Roth), welches die Evaporation des Reaktionsmixes während der Messung verhindert, in den Deckel jeder Kavität pipettiert. Als Letztes wurden 0,64  $\mu\text{l}$  Magnesium Acetat (140mM) an die Innenseite der Kavität pipettiert. Zum Start der Messung wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert und homogenisiert um das Magnesium und das Mineralöl in den Reaktionsmix einzubringen. Es folgte eine erneute Zentrifugation, um die Öl-Phase von der wässrigen Phase zu trennen. Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Je nach Fluorophor wurde die Fluoreszenz in den Wellenlängen .... bis .... (FAM) und ..... bis .... (ATTO565) detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 eingestellt. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Mischen unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 3.1.3 beschrieben.

### 3.4.4 Primerscreening für die RT-RPA

Für die Entwicklung der RT-RPA wurden die in Kapitel 3.1.1 designten Primer/Sonden Sets auf eine positive Amplifikation getestet. Dabei wurden die für designten Primer im 50  $\mu\text{l}$  Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 40 °C getestet. Als Template-RNA wurden bei Influenza B  $10^6$  Kopien/ $\mu\text{l}$  des RNA-Standards eingesetzt. Bei Influenza A wurden  $10^7$  Kopien/ $\mu\text{l}$  (H1N1 Subtyp) des RNA-Standards verwendet.

Tabelle 9: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Volumen	Hersteller
50X PSM	1,35X		/
RNase Inhibitor, Murine	1,37 U/ $\mu$ l		Thermo Fisher Scientific
RevertAid Reverse Transkriptase	13,73 U/ $\mu$ l		New England Biolabs
Rehydrations Puffer		29,5 $\mu$ l	TwistDX
PCR reines Wasser		x $\mu$ l $\sum$ 40,8 $\mu$ l	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 10: Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
Vorwärtsprimer	21 $\mu$ M	Biomers
Rückwärtsprimer	21 $\mu$ M	Biomers
Sonde	6 $\mu$ M	Biomers

### 3.4.5 Optimierung der Reaktionstemperatur für die Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Optimierung der Temperatur erfolgte im Temperaturintervall zwischen 38 - 42 °C. Dabei wurde das Intervall auf 3 Messungen (38 °C, 40 °C, 42 °C) aufgeteilt. Für Influenza B erfolgte die Temperaturoptimierung im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3), mit einer eingesetzten RNA-Konzentration von  $10^6$  Kopien/ $\mu$ l. Das Temperaturoptimum bei Influenza A wurde im 50  $\mu$ l Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l (H1N1 Subtyp) und einer 1,5-fach erhöhten Reverseprimer-Konzentration bestimmt.

### 3.4.6 Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Einführung und Optimierung eines zusätzlichen Mischzeitpunktes während der Reaktion erfolgte bei Influenza B im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) bei 40 °C. Als Mischzeitpunkte wurde 5 min, 4 min und 3 min nach Messbeginn bei einer RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l gewählt. Zusätzlich wurde der Mischzeitpunkt von 5 Minuten bei RNA-Konzentrationen von  $10^2$  und  $10^1$  und einer 1,5X erhöhten Reverse Primer untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzliches Mischen mitgeführt. Für Influenza A erfolgte die Optimierung des Mischzeitpunktes im 50  $\mu$ l Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 42 °C und einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration. Es wurden die Mischzeitpunkte 7,5 min, 5 min, 3min, 2 min, und 1,5 min nach Messbeginn bei einer RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l (H1N1 Subtyp) untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzliches Mischen mitgeführt.

### 3.4.7 Optimierung der Primerassymetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Für die Optimierung der Primerassymetrie wurden sowohl für Influenza B als auch Influenza A die verschiedenen Reverse Primer-Konzentrationen 1-Fach, 1,5-Fach und 2-Fach untersucht. Die Messung für Influenza A erfolgte im 50  $\mu$ l Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 42 °C mit einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l (H1N1 Subtyp). Es wurde für die jeweiligen Messungen die Reverseprimer-Konzentration im hergestellten Reaktionsmix von 0,45  $\mu$ M auf 0,675  $\mu$ M und 0,9  $\mu$ M erhöht. Alle anderen Konzentrationen blieben unverändert.

Bei Influenza B erfolgte die Messung im 8tel-Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) bei 40 °C und einer RNA-Konzentration von  $10^6$  Kopien/ $\mu$ l. Hierbei wurden die Reverseprimer-Konzentrationen im Primer-Sonden-

Mix von 21  $\mu\text{M}$  auf 31,5  $\mu\text{M}$  und 42  $\mu\text{M}$  angepasst.

### 3.4.8 Einfluss der Primerassymetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Primerassymetrie, sprich die ungleiche Verteilung der benötigten Primer ist für die PCR bereits in der Literatur bekannt. Die ungleichmäßige Verteilung der Primer führt in der PCR dazu, dass spezifisch der + oder - Strang öfter Amplifiziert wird und somit einzelsträngige DNA entsteht (C. Chen, Ruff, and Halsey 2010). Dieses Phänomän kann dazu verwendet werden um spezifisch Punktmutationen zu detektieren (Lázaro, Tortajada-Genaro, and Maquieira 2021) aber auch auf die qPCR angewand werden (C. Chen, Ruff, and Halsey 2010).

Um den Einfluss einer generellen erhöhten Primer-Konzentration innerhalb der Influenza B RPA zu Untersuchen wurden die Primerkonzentrationen verdoppelt. Die Messung erfolgte bei 40 °C im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) mit einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/ $\mu\text{L}$ . Anschließend wurde eine neue Sonde, welche an gleicher Position auf an dem entgegengesetzten forward-Strang hybridisiert eingeführt (Sequenz: CCATCTTCTTCATCCTCCACTGTAAGATCA 12 A 3 GTAGCAACAAGTTTAGC, mit 1=FAM-Fluorophor, 2=a-basische Seite und 3=BMQ-535). Als Fluorophor wurde Mit dieser Sonde wurden jeweils Forward- oder Reverseprimer in doppelter Konzentration sowie eine Messung mit normalen Primer-Konzentrationen als Referenz durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 40 °C im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) mit einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/ $\mu\text{L}$ . Die erhöhung der Primer-Konzentrationen für Forward oder Reverse Primer erfolgte im Primer-Sonden-Mix.

### 3.4.9 Ermittlung der Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA

Die Ermittlung des Sensitivität erfolgte in dekadischen Verdünnungsstufen von  $2 * 10^7$  RNA-Kopien/ $\mu\text{L}$  bis  $2 * 10^0$  RNA-Kopien/ $\mu\text{L}$ . Die Amplifikationen wurden anschließend mit der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methode ausgewertet. Das Detektionslimit wurde mit der in Kapitel 3.1.5 beschriebenen Probit-Analyse berechnet. Alle RT-PCR's wurden dabei nach der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

Die InfB RT-RPA wurde jeweils im 50  $\mu\text{L}$  Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) und im 8tel-Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) bei 40 °C, 1,5-fach erhöhten Reverseprimer-Konzentration und mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min gemessen.

Bei der InfA RT-RPA wurden die Sensitivität für den H1N1-Subtyp und den H3N2-Subtyp im 50  $\mu\text{L}$  Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 42 °C, 1,5-fach erhöhten Reverseprimer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min ermittelt.



## 4 Ergebnisse

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

### 4.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza RT-RPA

#### 4.1.1 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA

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

zum Beginn der Arbeit war bereits ein mit dem Influenza B Plasmid (Plasmidkarte siehe Anhang ??) transformierter *e. coli* Stamm vorhanden. Dieser wurde kultiviert und anschließend das Influenza B Plasmid extrahiert (Kapitel 3.2.2). Durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung (Kapitel 3.2.3) der Influenza B Virussequenz auf dem extrahierten DNA-Plasmid konnten Sequenzfehler ausgeschlossen werden und die korrekte Virus-Sequenz bestätigt werden. In Vorbereitung für die *in Vitro* Transkription wurde das Plasmid durch einen Restriktionsverdau linearisiert und über ein Agarose-Gel überprüft (Kapitel 3.2.4). Das Kontrollgel (siehe Abbildung 6A) weist zwei unterschiedlich große DNA-Banden auf. Das linearisierte Plasmid in Spur 2 zeigt eine Bande bei ~3400 bp, was mit der Plasmidgröße von 3407 bp übereinstimmt (siehe Plasmidkarte 20 im Anhang). Das unverdaute Kontrollplasmid in Spur 3 weist eine Bande bei weit über 4000 bp. Daraus lässt sich schließen, dass die Linearisierung durch den Restriktionsverdau erfolgreich war. Das linearisierte Plasmid wurde von Puffer und Enzymrückständen befreit (Kapitel 3.2.5) und über eine *in vitro* Transkription mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7-Promotors (Kapitel 3.2.6) in RNA überführt. Die synthetisierte virale RNA wurde im letzten Schritt mit dem RiboGreen Assay (Kapitel 3.2.7) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 6B gezeigt. Es ergab sich eine Geradengleichung von  $y = 22 + 3,6x$  mit einem Korrelationskoeffizient R von 0,99. Mithilfe der Geradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von  $476,0 \pm 7,8$  ng/ml und somit eine Kopienanzahl von  $2,2 \cdot 10^8$  RNA-Kopien/µl berechnet werden.



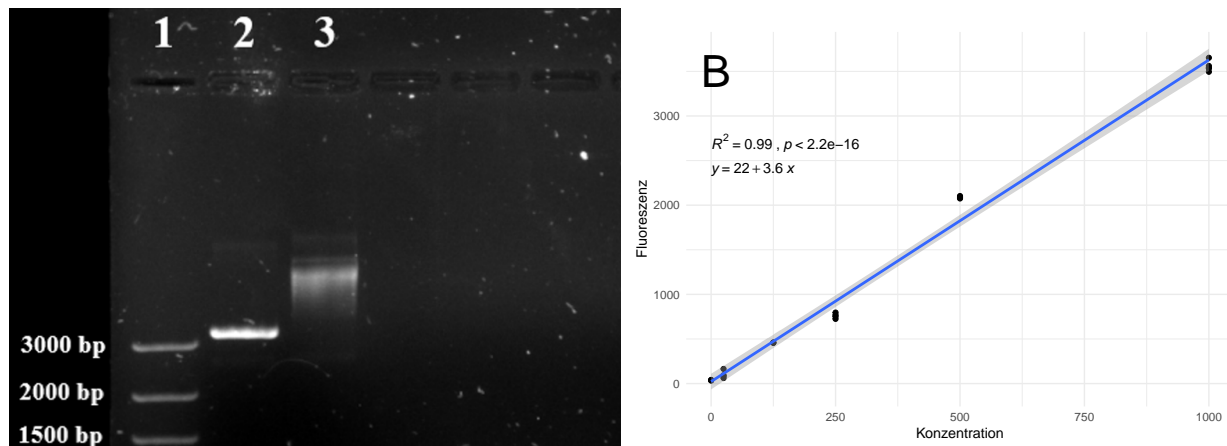


Abbildung 6: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdautem Plasmid (2), unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid 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.

#### 4.1.2 Entwicklung der InfB-RPA Primer

Für die Influenza B RT-RPA wurden mithilfe der Software PrimedRPA insgesamt 9 verschiedene Primer und 2 Sonden gefunden. Die Sequenzen sind in Tabelle 11 mit entsprechenden Modifikationen und 3'-Position auf der Virus-Sequenz gezeigt. Daraus ergeben sich insgesamt 10 Primer-Sonden-Kombinationen. Davon bestehen 2 Kombinationen aus Sonde 1.1 mit Forward 1 und Reverse 1.1 und Reverse 1.2. Die restlichen 8 Kombinationen setzten sich aus Sonde 3.1, Forward 1 oder Forward 2 und Reverse 3.3 - 3.15 zusammen.

Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Tabelle 11: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA

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

\* Y=C oder T; 1: Repoterfluorophor; 2: a-basische Seite; 3: Quencher \*\* Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Die entwickelten Primer-Sonden-Kombinationen wurden in einem Screening Verfahren mittels RT-RPA in einer Dreifachbestimmung auf Amplifikation getestet (Kapitel 3.4.2. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 7 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich durch einen steileren Anstieg und höhere

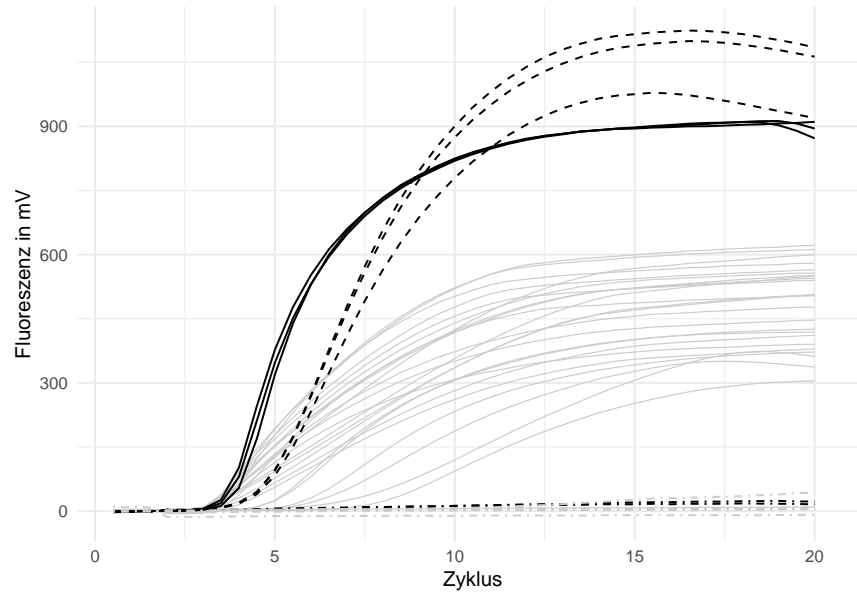


Abbildung 7: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ( $n=3$ ) für die in Tabelle 11 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 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.

Fluoreszenzwerte im Vergleich zu den Kombinationen mit Sonde 3.1 (grau) aus. Des Weiteren lässt sich bei der Kombination mit Reverse 1.1 (schwarz, durchgezogen) ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei der Kombination mit Reverse 1.2 (schwarz, gestrichelt) beobachten. Die Mittelwerte der TT-Werte für die jeweiligen Kombinationen liegen bei  $3,33 \pm 0,07$  (Reverse 1.1) und  $4,27 \pm 0,07$  (Reverse 1.2). Die Kombination mit Reverse 1.2 erreicht im Verlauf höhere Fluoreszenzintensitäten, jedoch deutet ein zeitigerer Anstieg, sprich niedrigere TT-Werte, auf eine schnellere Amplifikation. Aus diesem Grund wurde die Kombination mit Reverse 1.1 zusammen mit Forward 1 und Sonde 1.1 (schwarz, durchgezogen) als bestmöglich eingestuft und für alle nachfolgenden Versuche **Ergebnisse** in diesem Kapitel verwendet.

#### 4.1.3 Optimierung der InfB RPA

##### Verringerung des Reaktionsvolumens (8tel Ansatz)

Für die Verringerung des Reaktionsvolumens, wurden das in 4.1.2 entwickelte Primer-Sonden-Set auf den 8-tel Ansatz überführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Messung zusammen mit einer Referenz (50  $\mu$ l Ansatz) sind in Abbildung 8 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die 8tel RPA (schwarz) im Vergleich zu der 50  $\mu$ l RPA (grau) im Verlauf der Reaktion an maximaler Intensität verliert. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Anstiegszeit zwischen den beiden Reaktionvolumen festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte liegen bei  $3,36 \pm 0,01$  (50  $\mu$ l RPA) und  $3,47 \pm 0,14$  (8-tel RPA). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 13 im Anhang gezeigt.

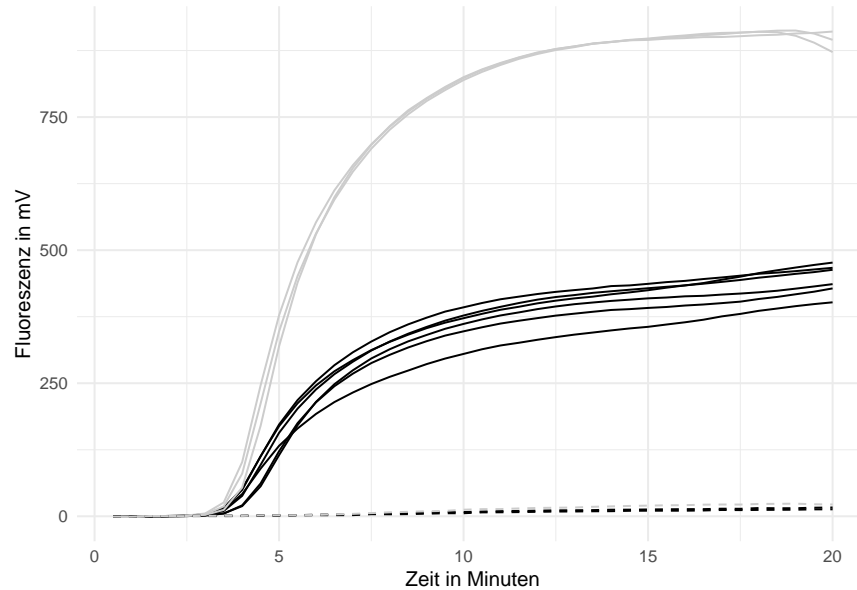


Abbildung 8: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 8tel-Ansatz (**schwarz**) bei 40 °C in n=6 (siehe ??8telRPA)) mit dem in 4.1.2 entwickeltem Primer-Sonden-Set. Als Virus\_RNA wurden  $10^7$  RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50  $\mu$ l Ansatz (**grau**) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

### Optimierung der Reaktionstemperatur

Die Optimierung der Reaktionstemperatur wurde wie in 3.4.5 beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten der Messungen bei verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 9A gezeigt. Die entwickelte Influenza B RPA zeigt bei 38 °C (hellgrau) einen signifikant späteren Anstieg und somit höhere TT-Werte, als bei 40 °C (schwarz) oder 42 °C (grau). Zwischen den Messungen bei 40 °C und 42 °C konnte hingegen keine signifikante Änderung des TT-Wertes festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte für die jeweiligen Temperaturen liegen bei  $5,26 \pm 0,06$  (38 °C),  $3,57 \pm 0,20$  (40 °C) und  $3,63 \pm 0,13$  (42 °C). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 14 im Anhang gezeigt. Zusätzlich besitzt die Reaktion bei 40 °C im Durchschnitt die höchste maximale Fluoreszenzintensität am Ende der Messung. Aus diesen Gründen wurde eine Reaktionstemperatur von 40 °C als Optimal festgelegt. Des Weiteren ist eine Abnahme der Fluoreszenz im späteren Verlauf der Reaktion (~13 min) bei 42 °C zu beobachten. Bei 40 °C ist ebenfalls bei 4/7 Reaktionen eine Fluoreszenzabnahme zu sehen, jedoch später bei ~16 min. Dieses Phänomen wird in der weiteren Arbeit als “Ditching” bezeichnet.

### Einführen einer Reverse-Primer Assymetrie

Das Einführen einer Primer-Assymetrie sowie die Optimierung dieser wurde anhand des Reverse Primers wie in 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten der variierenden Primerkonzentrationen sind in Abbildung 9B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine erhöhte reverse Primer-Konzentration mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der Referenz (keine Veränderte Reverse Primer-Konzentration, hellgrau) einhergeht. Eine signifikante Veränderung des TT-Wertes konnte nicht beobachtet werden. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs (siehe 3.1.4) sowie die Mittelwerte der TT-Werte sind in Tabelle 15 im Anhang gezeigt. Weiterhin lässt sich erkennen, dass bei einer doppelten Reverse Primer-Konzentration (grau) der

Ditching-Effekt nach ~12 min bei 4/6 Reaktionen einsetzt. Um diesen Effekt während der Messung zu vermeiden wurde eine reverse Primer-Konzentration von 1,5X (schwarz) als optimal festgelegt.

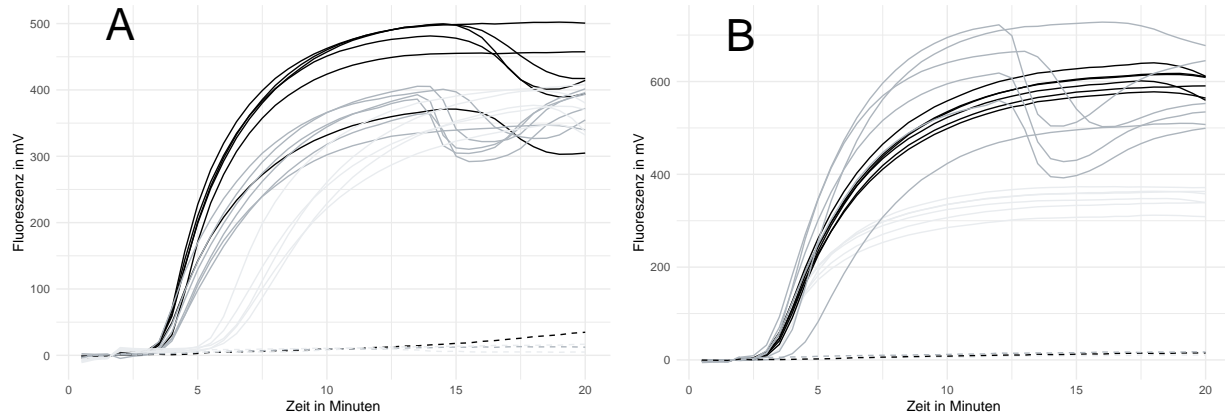


Abbildung 9: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 8tel-Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (schwarz) und 42 °C (grau). Messung in n=6 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerassymetrie mit 1,5x erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2X erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=6 pro Konzentration. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

### Optminierung der Mischzeit

Wie in 2.4.5 beschrieben kann ein zusätzlicher Mischschritt während der Reaktion zu einer erhöhten Amplifikation und somit zu einer besseren Detektion führen. Um den zusätzlichen Mischschritt für die Influenza B RT-RPA zu Optimieren wurden jeweils Mischzeitpunkte nach 3 min, 4 min und 5 min untersucht (siehe @refoptimischen). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 10A gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach drei Minuten (grau, durchgezogen) im Vergleich zu der Referenz ohne Mischen zu signifikant höheren TT-Werten führt. Die TT-Werte liegen hier bei  $5,90 \pm 0,19$  (Referenz) und  $7,21 \pm 0,70$  (Mischen nach 3 min). Weiterhin weist der Anstieg der Reaktion im Verlgleich zu Referenz mehr Linearität auf und verliert größtenteils die typische sigmoidale Kurvenform. Die Mischzeiten nach vier Minuten (grau, gestrichelt) und fünf Minuten (schwarz, gestrichelt) besitzen untereinander keine signifikant unterschiedlichen TT-werte, weisen jedoch mit zusammengefasst  $5,04 \pm 0,19$  eine signifikante Differenz zur Referenz auf. Die rechnerischen Daten des TT-Wert vergleichs (siehe 3.1.4) sowie die Mittelwerte der TT-Werte sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt. Wird der Mischzeitpunkt nach fünf Minuten betrachtet, besitzt dieser zusammen mit der Referenz die höchste Fluoreszenzintensität am Ende der Messung und im vergleich zu dem Mischzeitpunkt nach vier Minuten den steilsten Anstieg der Fluoreszenz während der Messung. Aus diesem Gründen wurde der Mischzeitpunkt nach 5 Minuten als Optimal festgelegt.

Damit der Effekt des Mischens bei niedriger Konzentration untersucht werden kann, wurden RT-RPA's mit einem Mischschritt nach fünf Minuten bei eingestzten RNA-Konzentration von  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l (siehe Abbildung 10B) und  $10^1$  Kopien/ $\mu$ l (siehe Abbildung 10B) durchgeführt (siehe @refoptimischen). Bei  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l besitzten die Reaktionen mit einem Mischschritt (schwarz) signifikant niedrigere TT-werte ( $6,53 \pm 0,25$ ) als die Referenz (grau) ohne zusätzlichen Mischschritt ( $7,35 \pm 0,58$ ). Des Weiteren ist bei der Messung mit Mischschritt ein Ditching nach ~16 Minuten bei 6/7 Reaktionen zu beobachten.

Bei dem Versuch mit  $10^1$  Kopien/ $\mu$ l ist bei der Messung mit Mischschritt (schwarz) eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der Referenz (grau) ohne Mischen zu erkennen. In diesem Versuch ist der positive Effekt des Mischen auf die RT-RPA am deutlichsten zu sehen. Der eingeführte Mischschritt erhöhte die Sensitivität der Reaktion von 3/7 positiv (Referenz) auf 7/7 Positiv.

Zusammengefasst lassen sich für die Influenza B RT-RPA eine Reaktionstemperatur von  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , eine 1,5X asymmetrisch erhöhte reverse Primer-Konzentration und ein zusätzlicher Mischschritt nach fünf Minuten als optimal festlegen.

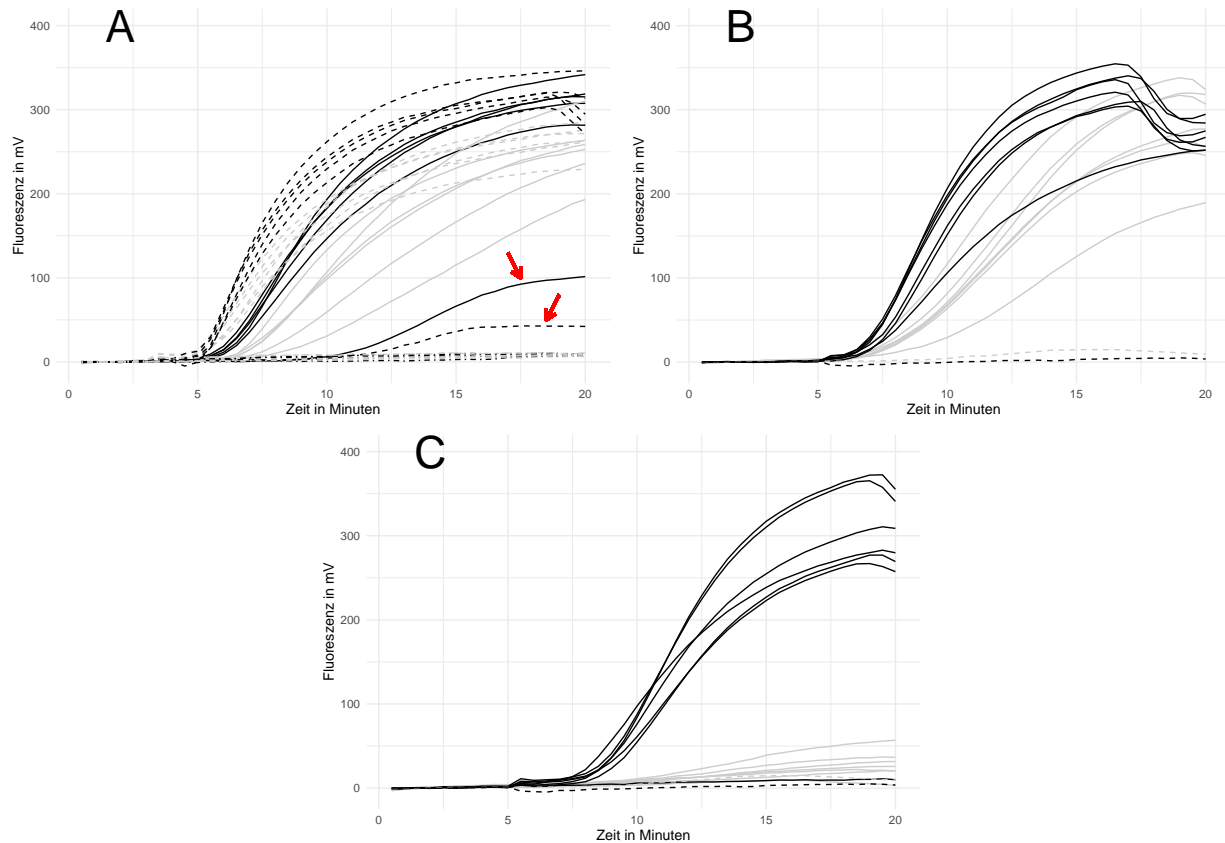


Abbildung 10: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Messung. **A:** RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (grau, durchgezogen), 4 min (grau, gestrichelt), 5 min (schwarz gestrichelt) sowie der Referenz ohne Mischen (schwarz, durchgezogen) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Alle Messungen wurden in  $n=6$  durchgeführt. Negativkontrollen sind mit  $(\cdot - \cdot)$  dargestellt. **B** Vergleich zwischen der Influenza B RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min (schwarz) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (grau) bei eingesetzten  $10^2$  RNA-Kopien/ $\mu$ l. Messung in  $n=7$  durchgeführt. Negativkontrollen sind mit  $(- - -)$  gekennzeichnet. **C:** Vergleich zwischen der Influenza B RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min (schwarz) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (grau) bei eingesetzten  $10^1$  RNA-Kopien/ $\mu$ l. Messung in  $n=6$  durchgeführt. Negativkontrollen sind mit  $(- - -)$  gekennzeichnet.

#### 4.1.4 Einfluss der Primerassymetrie auf die RT-RPA

Wie in 4.1.3 gezeigt wurde, führt eine asymmetrische Erhöhung des Reverse Primers zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Um den Einfluss der generellen Primer-Konzentration auf die RPA zu untersuchen wurde

eine RT-RPA mit doppelter forward und reverse Primer-Konzentration (siehe 3.4.8) durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 11A gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine generelle Erhöhung von Forward und Reverse Primer (grau) wieder zu einer niedrigeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer asymmetrischen Reverse Primer-Konzentration (schwarz) führt. Eine signifiante Veränderung der TT-Werte konnte nicht ermittelt werden. So liegen die TT-Werte für die Messung mit 2X-Reverse Primer bei  $3,40 \pm 0,14$  und bei der Messung mit doppelter Primer-Konzentration bei  $3,48 \pm 0,21$ . Die markierte Amplifikationskurve (roter Pfeil) konnte als Ausreißer identifiziert werden und wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

Eine Vermutung war, dass die Hybridisation der Sonde an den Sense oder Anti-Sense Strang den DNA in Verbindung mit der Primer-Assymetrie und der daraus resultierenden erhöhten Fluoreszenzintensität steht. Um dies zu Überprüfen wurde eine erneute Messreihe mit einer am entgegengesetzten Strang hybridisierenden Sonde durchgeführt (siehe 3.4.8). Die Fluoreszenzdaten der Messungen sind in Abbildung 11B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass hier die erhöhte Reverse Primer-Konzentration (hellgrau) die niedrigste Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (grau) und der erhöhten Forward Primer-Konzentration (schwarz) zeigt. Die assymetrisch erhöhte Forward Primer-Konzentration zeigt hingegen die höchsten Fluoreszenzwerte und dementsprechend die beste Signalgenerierung. Des Weiteren besitzt die erhöhte Forward Primer-Konzentration signifikant niedrigere TT-Werte mit  $3,25 \pm 0,05$  als die Referenz ( $3,63 \pm 0,19$ ) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration ( $3,76 \pm 0,34$ ).

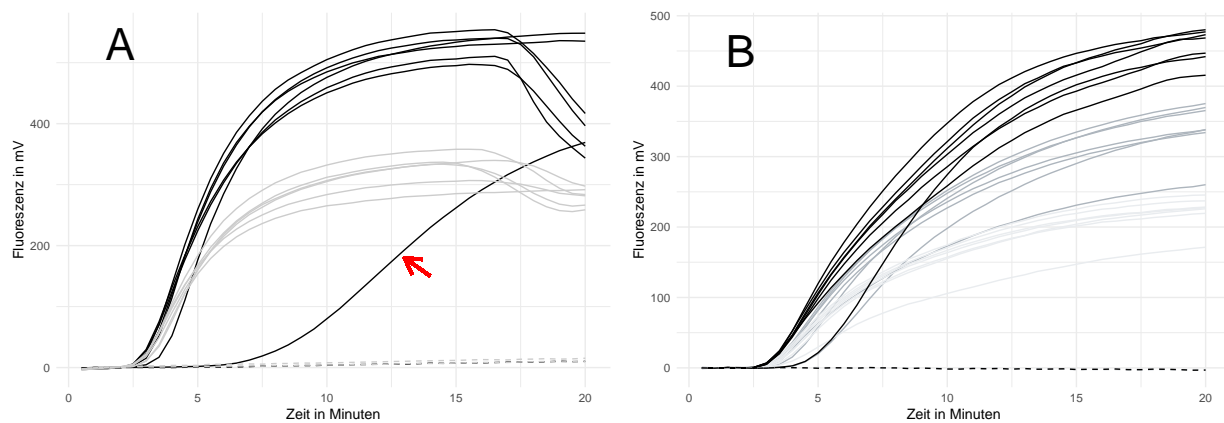


Abbildung 11: **Einfluss der Primerassymetrie auf der RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA. **A:** Einfluss einer generellen Primererhöhung auf die Influenza B Rt-RPA. Die doppelte Primerkonzentration (jeweils  $42 \mu\text{M}$  im PSM, siehe 3.4.3) ist in Grau dargestellt, 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 3.4.8 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.

#### 4.1.5 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA

Die Ermittlung der Sensitivität für die Influenza B RT-RPA erfolgte mit den im Kapitel 4.1.3 ermittelten optimalen Reaktionsparametern nach beschriebener Methode (siehe 3.4.9). Die Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung sowie das mithilfe der Probit-Analyse (siehe 3.1.5) ermittelte Detektionslimit sind in Abbil-

dung 12 gezeigt. Für die Influenza B RT-RPA konnte berechnet werden, dass das System mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit 14,6 Virus RNA-Kopien detektieren kann. Des Weiteren konnte eine Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit mit einem  $R^2 = 0,92$  und einer Geradengleichung von  $y = 9,4 - 0,95x$  ermittelt werden. Die über den Boxplot-Test (siehe 3.1.4) ermittelten Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 12A) wurden innerhalb der Kalibriergerade nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert ist »0,05 was einen signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Zusätzlich wurde die Sensitivität für den 50 µl Ansatz der Influenza B RT-RPA mit den gleichen Reaktionsparametern ermittelt und ein Vergleich zu dem 8tel-Ansatz gezogen. Die Messung erfolgte nach der beschriebenen Methode (siehe 3.4.9). Es konnte ein Detektionslimit von 31,6 Kopien ermittelt werden. Dementsprechend konnte für die RT-RPA im 8tel-Ansatz eine Verbesserung des Detektionslimits um 46 % nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzdaten sowie die Probit-Analyse des 50 µl Ansatzes sind im Anhang unter Abbildung @ref(fig:...) gezeigt.

Damit ein Vergleich zur PCR als Standardmethode in der Diagnostik herangezogen werden kann wurde die in 3.4.1 beschriebene RT-PCR für das Influenza B Virus auf die Sensitivität getestet (Kapitel 3.4.9). Die Fluoreszenzdaten sowie der Probit-Analyse sind in Abbildung @ref(fig:...) im Anhang gezeigt. Das Detektionslimit der RT-PCR liegt bei 11,4 Kopien. Somit liegt die Detektionsgrenz des PCR-Systems 22 % bzw. 3,2 Kopien unter der optimierten RPA. Da sowohl die RPA als auch die PCR mit dem artifiziellen RNA-Standard, jedoch nicht mit realen Patientenproben getestet wurden, kann das ermittelte Detektionslimit nicht auf Patientenproben angewendet werden. Um eine eventuelle Veränderung des Detektionslimits mit klinischen Proben zu untersuchen wurden simulierte Kontrollproben (extrahierte humane RNA mit zugesetztem RNA-Standard) erstellt (Kapitel 3.3) und mit diesen eine erneute Sensitivitätsanalyse durchgeführt (Kapitel 3.4.9). Zusätzlich zu der Negativkontrolle wurde eine Kontrollprobe ohne zugesetzte virale RNA mitgeführt um auf unspezifische Reaktionen zu kontrollieren. Innerhalb der Kontrollproben konnten alle Proben mit einer RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/µl detektiert werden, jedoch keine der Proben mit  $10^2$  RNA-Kopien. Dementsprechend liegt das Detektionslimit bei 1397 Kopien.

Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle ?? dargestellt.



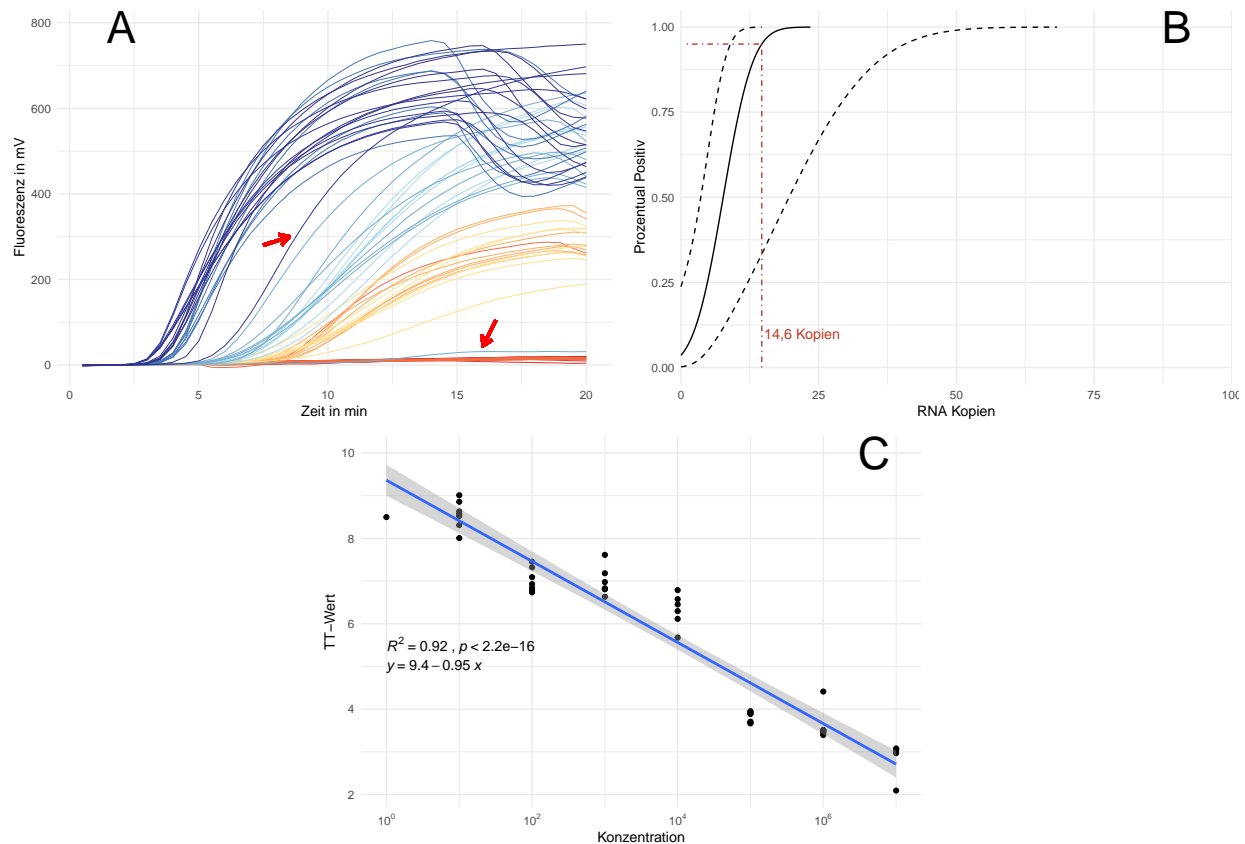


Abbildung 12: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA:** **A:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  und  $10^0$  RNA-Kopien pro Messung sowie **Negativkontrollen**. Jede Verdünnung wurde mit  $n=7$  gemessen. Ausreißer bei  $10^7$  und  $10^4$  (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. **B:** Probit-Analyse der Amplifikationsdaten. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt die Probit-Regression der RT-RPA. Die schwarzen 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. **C:** Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte der Ausreißer sowie von negativen Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht gezeigt.



## 4.2 Influenza A

### 4.2.1 Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA

Damit die Gruppe der Influenza A Viren ausreichend abgedeckt werden kann, wurden RNA-Standards von den akutell vorherrschenden Subtypen H1N1 und H3N2 erstellt. Alle nachfolgenden Schritte dieses Kapitels wurden für beide RNA-Standards gleich durchgeführt.

Für die Erstellung der viralen Standard-RNA's wurden im ersten Schritt die entsprechenden Virus DNA-Sequenzen als teil eines DNA-Plasmids in *E. coli* transformiert (siehe 3.2.1). Anschließend wurden die transformierten Bakterien kultiviert und die Plasmid-DNA extrahiert (siehe 3.2.2). Durch eine anschließende Sequenzierung (siehe 3.2.3) konnten Sequenzfehler durch Mutationen ausgeschlossen und die Integrität der Sequenz bestätigt werden. Im nächsten Schritt wurden die extrahierte Plasmide-DNA durch einen Restriktionsverdau linearisiert (siehe 3.2.4) und somit für die *in vitro* Transkription vorbereitet. Das zur Überprüfung der Linearisierung durchgeführte Agarose-Gel ist in Abbildung 13 gezeigt. Die verdauten Plasmide zeigen eine DNA-Bande bei ~ 3300 bp. Dieses stimmt mit der Plasmidgröße von 3343 bp für beide Plasmide überein (siehe Plasmidkarten 21, 22 im Anhang). Die ungeschnittenen, mitgeführten Kontrollplasmide aus der vorherigen Plasmid-DNA isolation weisen hingegen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf. Dies lässt auf eine erfolgreiche Linearisierung der Plasmide schließen. Zur Weiteren Vorbereitung der linearisierten Plasmid-DNA für die *in vitro* Transkription und als Nachbehandlung von den Restriktionsverdau wurden aus der DNA Enzym- und Pufferrückständen entfernt (siehe 3.2.5). Die gereinigte DNA wurde im nächsten Schritt mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7-Promotors zu RNA *in vitro* Transkribiert und die Ausgangs-DNA durch eine DNase-Behandlung beseitigt (siehe 3.2.6). In der nachfolgenden Aufreinigung wurde die Nukleinsäure abermals von störenden Puffer und Enzymrückständen befreit. Die reine, artifiziell erstellte virale RNA wurde im letzten Schritt nach mithilfe des Ribogreen-Assays quantifiziert (siehe 3.2.7).

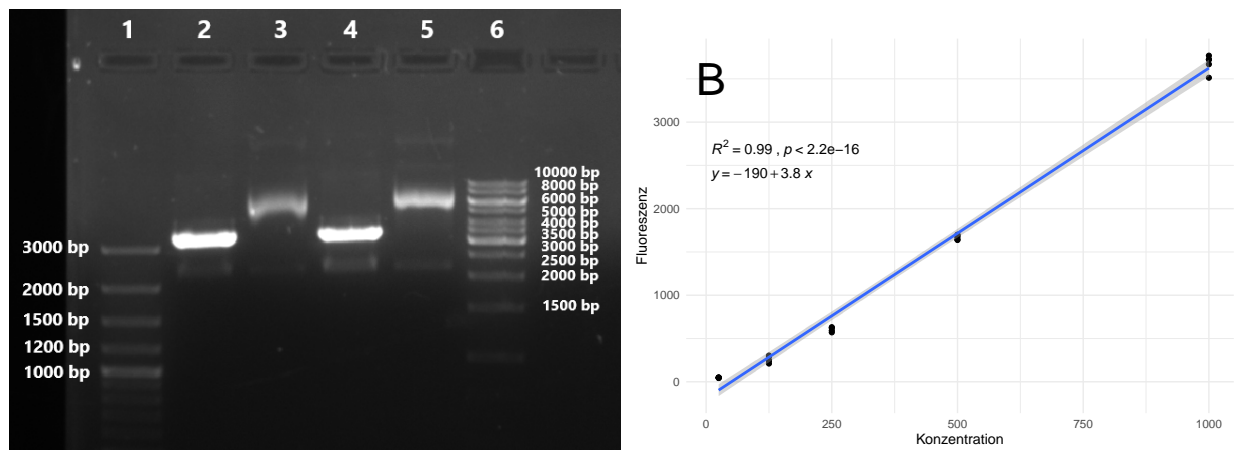


Abbildung 13: **Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdauten Plasmids des H3N2 Standards (2) mit unbehandelter Kontrolle (3) sowie verdautem Plasmid des H1N1 Standards (4) mit 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.

#### 4.2.2 Entwicklung der InfA-RPA Primer

Mithilfe des PrimedRPA-Programms (siehe 3.1.1) konnten für die Influenza A RT-RPA insgesamt 8 Primer und 2 Sonden entwickelt werden. Die Sequenzen sowie die Position auf des 3'-Endes auf der Referenzsequenz (H3N2-Subtyp; GenBank Nr.: MT244214) sind in Tabelle 12 angegebenen. Dabei 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 ermittelt werden.

Tabelle 12: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA

Name	Sequenz (5'→3')	3'-Position	Modifikation
<b>Mit PrimedRPA designte Primer (siehe 3.1.1)</b>			
Sonde 1.2	GGCTCTCATGGAATGGTTAAAGACAAGACCAAT 12 T 3 GTCACCTYTGACTA	182 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 3.1	GGRAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATG 12 A 3 TGGCTAAAGACAA	158 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Forward 1	CCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTKG	98 bp	
Forward 2	CTTCTTACCGAGGTGCGAAACGTATGTTCT	48 bp	
Forward 3	GGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCAGAGACT	96 bp	
Reverse 1.1	GCACGGTGAGCGTGAACACAAACCCTAAAA	189 bp	
Reverse 1.4	TGGGCACGGTGAGCGTGAACAAAMCCTA	192 bp	
Reverse 1.8	AGCGTCTACGCTGCAGCCCTCGCTCACTGG	219 bp	
Reverse 3.1	AAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACARAATTGG	161 bp	
Reverse 3.2	CCTAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACAAARAT	164 bp	
<b>Primer/Sonden modifiziert nach Ehnts (2013)</b>			
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 3.1.2 beschrieben.

Die insgesamt 8 Kombinationen wurden mittels eines Primerscreenings (siehe 3.4.4) auf Amplifikation getestet. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 14 in Grau gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die entwickelten Primer/Sonden-Kombinationen einen linearen Fluoreszenzverlauf mit einem Anstieg zwischen 7-10 Minuten aufweisen. Die maximale Fluoreszenzintensität am Ende der Reaktion liegt um die 100-150 Fluoreszenzeinheiten. Bei der anschließenden Analyse (siehe 3.1.3) konnten 3 der 8 Kombinationen keine positiven Amplifikationen aufweisen. Da die Fluoreszenzdaten aller Primer/Sonden-kombinationen ähnlichkeiten aufweisen wurde keine der Kombination als passen gewählt. Alternativ wurde die Primer/Sonden-Kombination von Ehnts (2013) mit degenerierten Basen modifiziert und auf amplifikation getestet. Zusätzlich wurden die Kombination um zwei weitere alternative Forward Primer (Forward E.2 und Forward E.3) ergänzt (siehe Tabelle 12). Die Fluoreszenzdaten der drei neuen Primer/Sonden-Kombinationen sind in Schwarz in Abbildung 14 gezeigt. Dabei zeigen die Kombination mit den alternativen Forward Primer (schwarz, gestrichelt und schwarz, gepunktet) leicht niedrigere Fluoreszenzintensitäten am Ende der Messung als die Kombination mit dem Forward E Primer (schwarz,durchezogen). Ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten konnte nicht festgestellt werden. Somit liegt der Mittelwert der TT-Werte der Kombinationen bei  $3,18 \pm 0,08$ . Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

Die Primer/Sonden-Kombination bestehend aus Forward E, Reverse E und Sonde E wurde infolgedessen als bestmöglich eingestuft und für alle weiteren Versuch in diesem Kapitel verwendet.

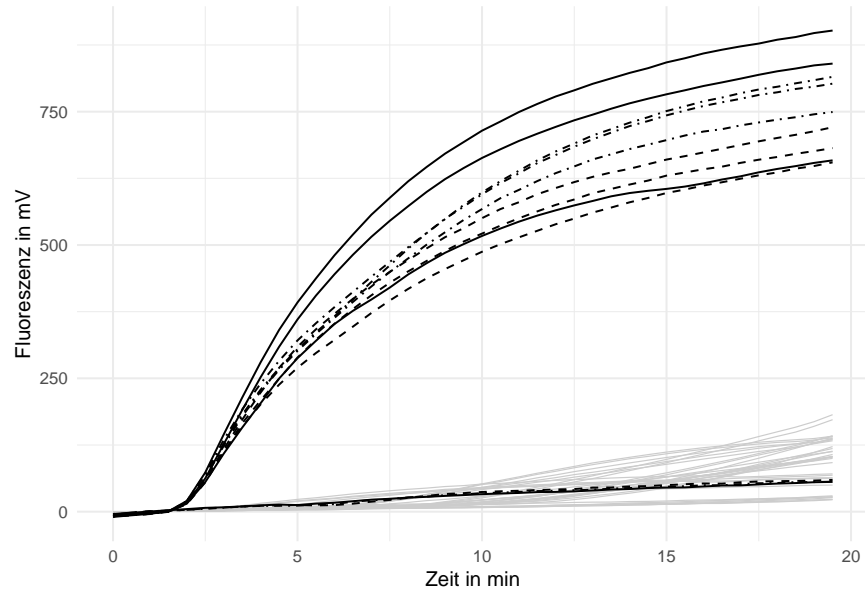


Abbildung 14: **Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ( $n=3$ ) für die in Tabelle 12 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen der mit PrimedRPA designten Primer und Sonden sind in **grau** dargestellt. 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.

#### 4.2.3 Optimierung InfA

##### Verringerung des Reaktionsvolumen (8tel Ansatz)

Für die Optimierung des Reaktionsvolumen wurde das modifizierte Ehnts Primer/Sonden-Set (siehe 4.2.2) auf Amplifikation im 8tel-Ansatz getestet (siehe 3.4.3). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 15 gezeigt. Zum Vergleich wurde eine RT-RPA mit dem Primer/Sonden-Set im 50  $\mu$ l Ansatz (siehe 3.4.2) mitgeführt. Es ist zu erkennen, dass im 8tel-Ansatz die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum 50  $\mu$ l Ansatz niedriger ausfällt. Des Weiteren geht im 8tel-Ansatz die Sigmoidalität der Amplifikationskurve verloren und die Fluoreszenzverlauf nimmt größtenteils einen linearen Anstieg an. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten des 50  $\mu$ l Ansatzes ( $3,17 \pm 0,12$ ) und des 8tel-Ansatzes ( $4,19 \pm 0,43$ ) ermittelt werden. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt. Somit besitzt der 50  $\mu$ l Ansatz höhere Fluoreszenzwerte, einen zeitigeren Anstieg und eine typischere Amplifikationskurve als der 8tel-Ansatz. Aus diesem Grund konnten wurde eine Reaktion im 50  $\mu$ l Ansatz als optimaler gewählt.

##### Optimierung der Reaktionstemperatur

Die Optimierung der Reaktionstemperatur (siehe 3.4.5) wurde im Temperaturintervall von 38 °C bis 42 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 16A gezeigt. Generell ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einem niedrigeren TT-Wert führt. So besitzt die RT-RPA bei 42 °C (schwarz) mit einem TT-Mittelwert von  $3,69 \pm 0,11$  einen signifikant zeitigeren Anstieg als die Reaktion bei 40 °C mit einem TT-Mittelwert von  $4,28 \pm 0,12$ . Die signifikant höchsten TT-Werte mit  $4,76 \pm 0,11$  wurden für die RT-RPA bei 38 °C ermittelt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang

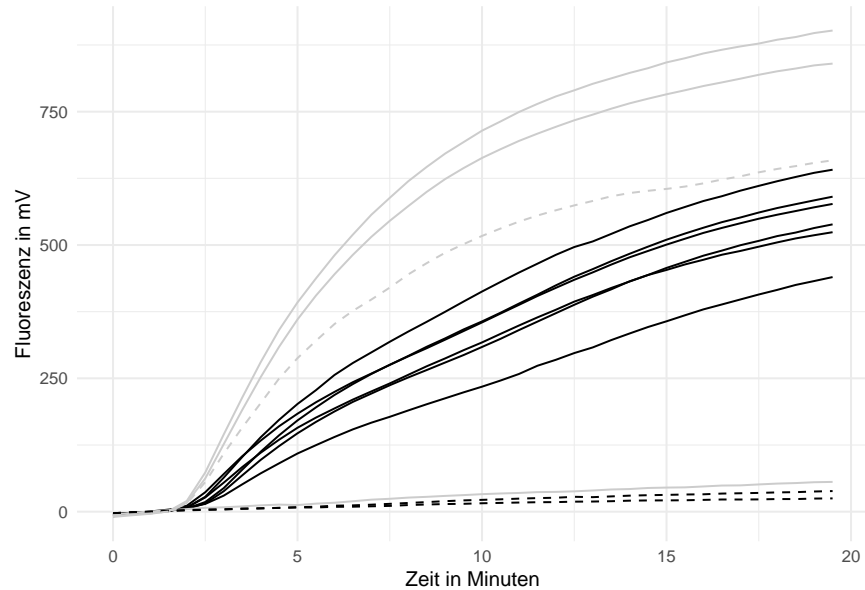


Abbildung 15: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 8tel-Ansatz (**schwarz**) bei 42 °C in n=6 (siehe ??8telRPA)) mit dem in 4.2.2 angegebenen Primer-Sonden-Set. Als Virus\_RNA wurden  $10^8$  RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 µl Ansatz (**grau**) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

gezeigt. Des Weiteren zeigt die Reaktion bei 38 °C einen Verlust an maximaler Fluoreszenzintensität am Ende der Messung im Vergleich zu den Reaktionen bei 40 °C und 42 °C. Im Umkehrschluss zeigt sich, dass eine Erhöhung der Temperatur zu zeitigeren Anstiegen und höheren Fluoreszenzintensitäten führt. Aus diesem Grund wurde 42 °C als optimale Reaktionstemperatur festgelegt.

### Optimierung der Primer-Konzentration

Wie in den Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 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 Reverse-Primerkonzentration mit den Parametern 1,5X- und 2X-Erhöht durchgeführt (siehe 3.4.7). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 16B 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 Reversekonzentration zu sehen. Ein Vergleich der TT-Werte war durch die begrenzte Probenanzahl der Doppelbestimmung nicht möglich. Jedoch liegen alle TT-Werte um ... und keine markanten Unterschiede sind zu erkennen. Des Weiteren lässt sich bei der 2X erhöhten reverse Primer-Konzentration ein anfängliches Dichtungsbeobachten (markiert durch den roten Pfeil). Um dieses Phänomen bei zukünftigen Messungen zu vermeiden wurden eine 1,5X erhöhte Reverse Primer-Konzentration als Optimal festgelegt.

### Optimierung Mischen

Für die Optimierung des Mischschrittes für die Influenza A RT-RPA wurden 5 Messungen bei den Misch-

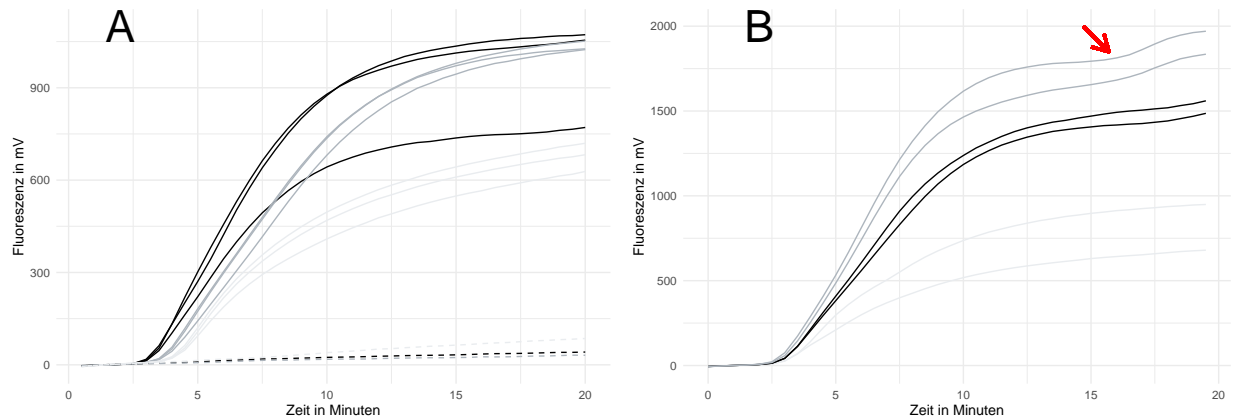


Abbildung 16: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 50 µl Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (grau) und 42 °C (schwarz). Messung in n=3 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerassymetrie mit 1,5x erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2X erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=2 pro Konzentration. Der rote Pfeil zeigt anfängliches Ditching bei der 2x erhöhten Reverse Primer-Konzentration.

zeitpunkten 7 min, 5 min, 3 min, 2 min und 90 sek durchgeführt (siehe 3.4.6). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung ?? gezeigt. Wie in Abbildung ??A 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 3.1.3) 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  $15,04 \pm 1,53$  signifikant höhere TT-Werte als die Referenz ( $9,05 \pm 0,58$ ) 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 Messung mit einem Mischen 5 min beziehungsweise 7 min ähnliche Fluoreszenzwerte wie die Referenz. Ein signifikanter Unterschied zwischen der TT-Werten konnte nicht festgestellt werden. Werden die Mittelwerte der beiden Messreihen mit  $9,05 \pm 0,58$  (Referenz) und  $8,00 \pm 0,73$  (Mischen nach 3 min) einzeln betrachtet ist ein zeiterer jedoch nicht signifikanter Anstieg bei der Messreihe mit Mischen nach 3 min zu erkennen. In Abbildung ??B 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.

#### 4.2.4 InfA Sensitivität

#### 4.2.5 Einfluss der des Sondengesigns auf die RT-RPA

## 5 Diskussion

- R-Programm

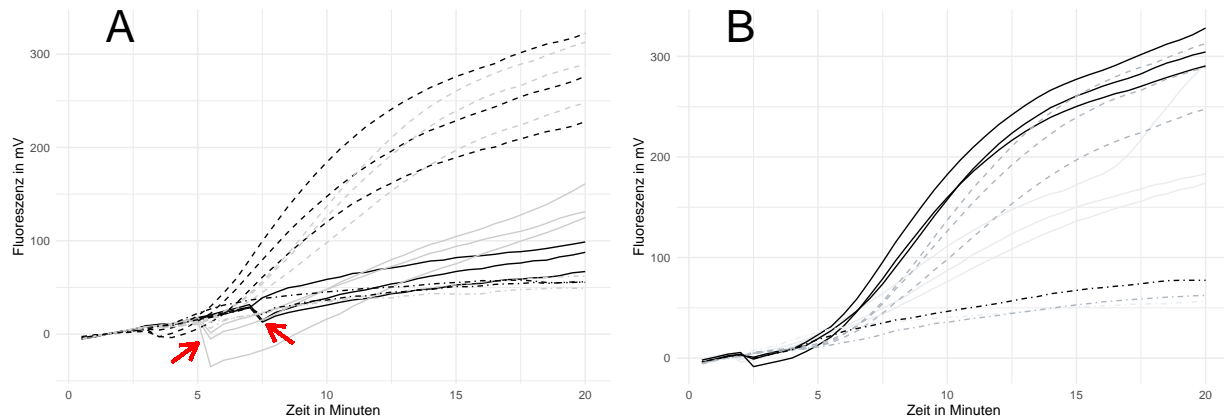


Abbildung 17: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschritts während der Messung. **A:** RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (schwarz, gestrichelt), 5 min (grau, durchgezogen), 7 min (schwarz, durchgezogen) sowie der Referenz ohne Mischen (grau, gestrichelt) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l. Alle Messungen wurden in  $n=3$  durchgeführt. Der spontane Abfall 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/ $\mu$ l. Alle Messungen wurden in  $n=3$  durchgeführt. Negativkontrollen sind mit  $(\cdot - \cdot)$  dargestellt.

- 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)
  - > resid growth test
- mögliche Lösungen
  - > algorithmus für ditching
  - > normalverteilung anpassen
  - > threshold diskutieren
- 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 ) -> mismatches durch H1N1 und H3N2 (evtl. anderes Target diskutieren, polymerase oder so)
    - > alternativen diskutieren (gleiche sonde aber 2 Primer paare, wie die PCR das gemacht hat)
- Optimierungen (warum wurden die Parameter so gewählt)

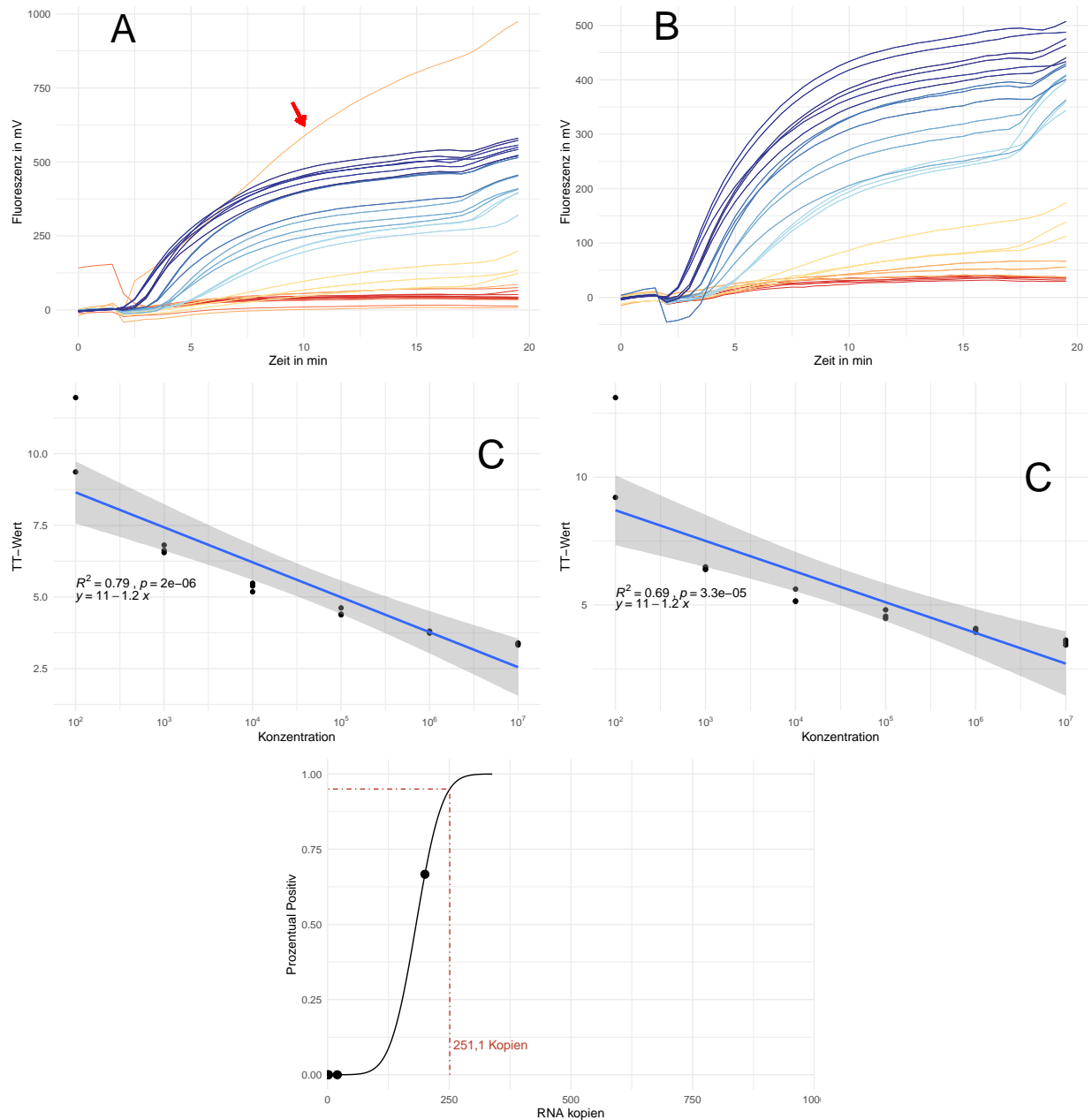


Abbildung 18: **Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA: A,B:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> und 10<sup>0</sup> RNA-Kopien pro Messung mit dem H1N1-Standard (A) und dem H3N2-Standard (B) sowie **Negativkontrollen**. Jede Verdünnung wurde mit n=3 gemessen. Ausreißer bei 10<sup>7</sup> und 10<sup>4</sup> (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.

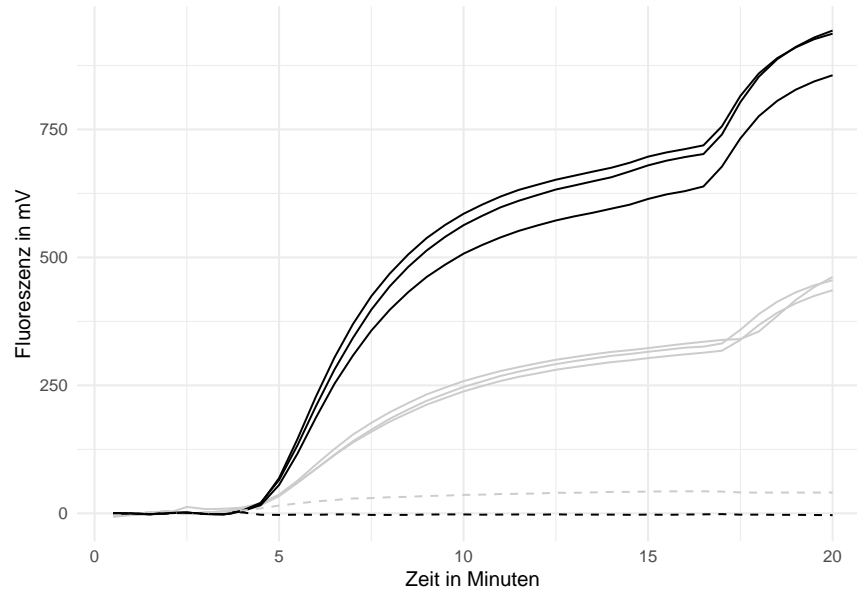


Abbildung 19: **Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Vergleichs zwischen der *internally Quenched* Sonde (grau) und der *dT-quenched* Sonde (schwarz, Modifikationen siehe Abbildung 5) mithilfe der Influenza A RT-RPA. Die Messung wurde dabei mit den in Kapitel 4.2.3 festgelegten optimalen Reaktionsparametern bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l (H1N1-Standard) in n=3 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

- Influenza A
- Influenza B
- wie wichtig ist Mischen am Beispiel in InfB
- Sensitivitätsanalysen
  - Vergleich mit PCR
  - Vergleich 50 $\mu$ l und 8tel-Ansatz -> welche Vorteile hat 8tel-Ansatz
  - Sensitivität im Klinischen Background reicht das für klinische Proben
- Spezifität



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

## 6 Anhang

Tabelle 13: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
Reverse 1.1	n=3	$3,33 \pm 0,07$	p = 0,79	p = 0,85	p = $1 \cdot 10^{-4}$	s***
Reverse 1.2	n=3	$4,27 \pm 0,07$	p = 0,24			

*Notiz:* ns = nicht Signifikant; s = signifikant

\* p = <0.05 \*\* p = <0.01 \*\*\* p = <0.001

Tabelle 14: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
50 µl RPA	n=3	$3,36 \pm 0,01$	p = 0,20	p = 0,008	p = 0,11	ns
8 µl RPA	n=6	$3,47 \pm 0,14$	p = 0,13			

*Notiz:* ns = nicht Signifikant; s = signifikant

\* p = <0.05 \*\* p = <0.01 \*\*\* p = <0.001

Tabelle 15: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
38 °C	n=5	5,26 ± 0,06	p = 0,93	p = 0,10	p = 2,89 *10 <sup>-10</sup>
40 °C	n=6	3,57 ± 0,20	p = 0,44		
42 °C	n=6	3,63 ± 0,13	p = 0,16		
Vergleich der Gruppen					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
38 °C	40 °C	−1,94	−1,43	p = 6,29 *10 <sup>-10</sup>	s ***
38 °C	42 °C	−1,89	−1,38	p = 9,13 *10 <sup>-10</sup>	s ***
40 °C	42 °C	−0,18	0,28	p = 0,81	ns

*Notiz:* ns = nicht Signifikant; s = signifikant; untr.Konfid. = unteres Konfidenzintervall; obrs.Konfid. = oberes Konfidenzintervall \* p = <0.05 \*\* p = <0.01 \*\*\* p = <0.001

Tabelle 16: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung ??A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referenz	n=6	$3,39 \pm 0,07$	p = 0,46	p = 0,11	p = 0,62
1,5X Rev.	n=5	$3,43 \pm 0,07$	p = 0,39		
2X Rev.	n=6	$3,45 \pm 0,17$	p = 0,64		

*Notiz:* ns = nicht Signifikant; s = signifikant

\* p = <0.05 \*\* p = <0.01 \*\*\* p = <0.001

Tabelle 17: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung ??B

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referez	n=5	6,00 ± 0,15	p = 0,13		
Mischen (3 min)	n=6	5,13 ± 0,21	p = 0,15	p = 0,21	p = 2 *10 <sup>-3</sup>
Mischen (4 min)	n=5	5,11 ± 0,30	p = 0,92		
<b>Vergleich der Gruppen</b>					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
Mischen (3 min)	Mischen (4 min)	-1,02	0,32	p = 0,38	ns
Mischen (3 min)	Referez	0,16	1,51	p = 0,02	s *
Mischen (4 min)	Referez	0,48	1,89	p = 1,74 *10 <sup>-3</sup>	s **
<i>Notiz:</i> ns = nicht Signifikant; s = signifikant; untr.Konfid. = unteres Konfidenzintervall; obrs.Konfid. = oberes Konfidenzintervall * p = <0.05    ** p = <0.01    *** p = <0.001					

Tabelle 18: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
Referenz	n=7	7,35 ± 0.58	p= 0,59	p= 0,25	p= 0,005	s**
Mischen (5 min)	n=7	6,53 ± 0.25	P= 0,29			
<i>Notiz:</i> ns = nicht Signifikant; s = signifikant * p = <0.05    ** p = <0.01    *** p = <0.001						

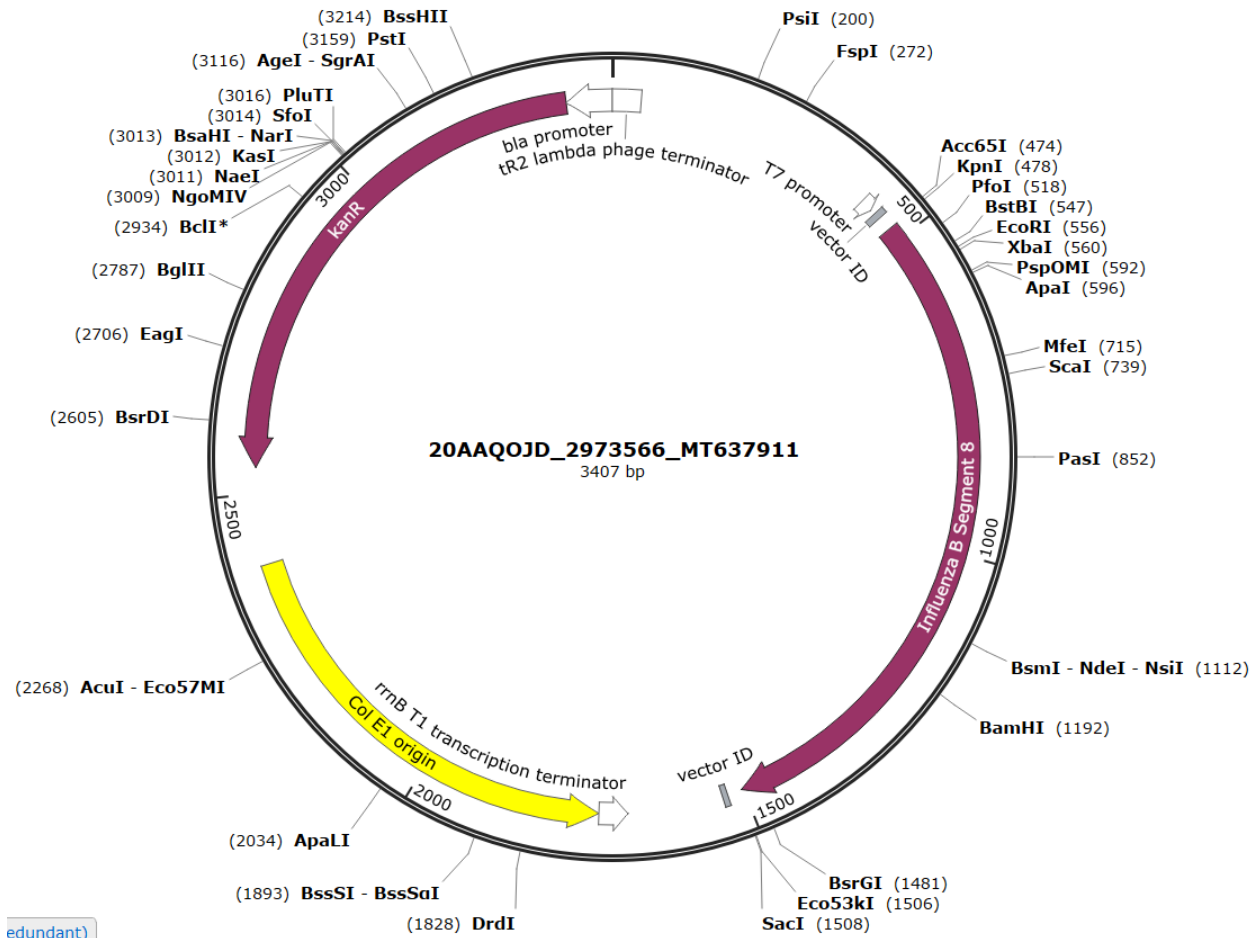


Abbildung 20: Plasmidkarte des Influenza B Plasmides für den Influenza B RNA-Standard

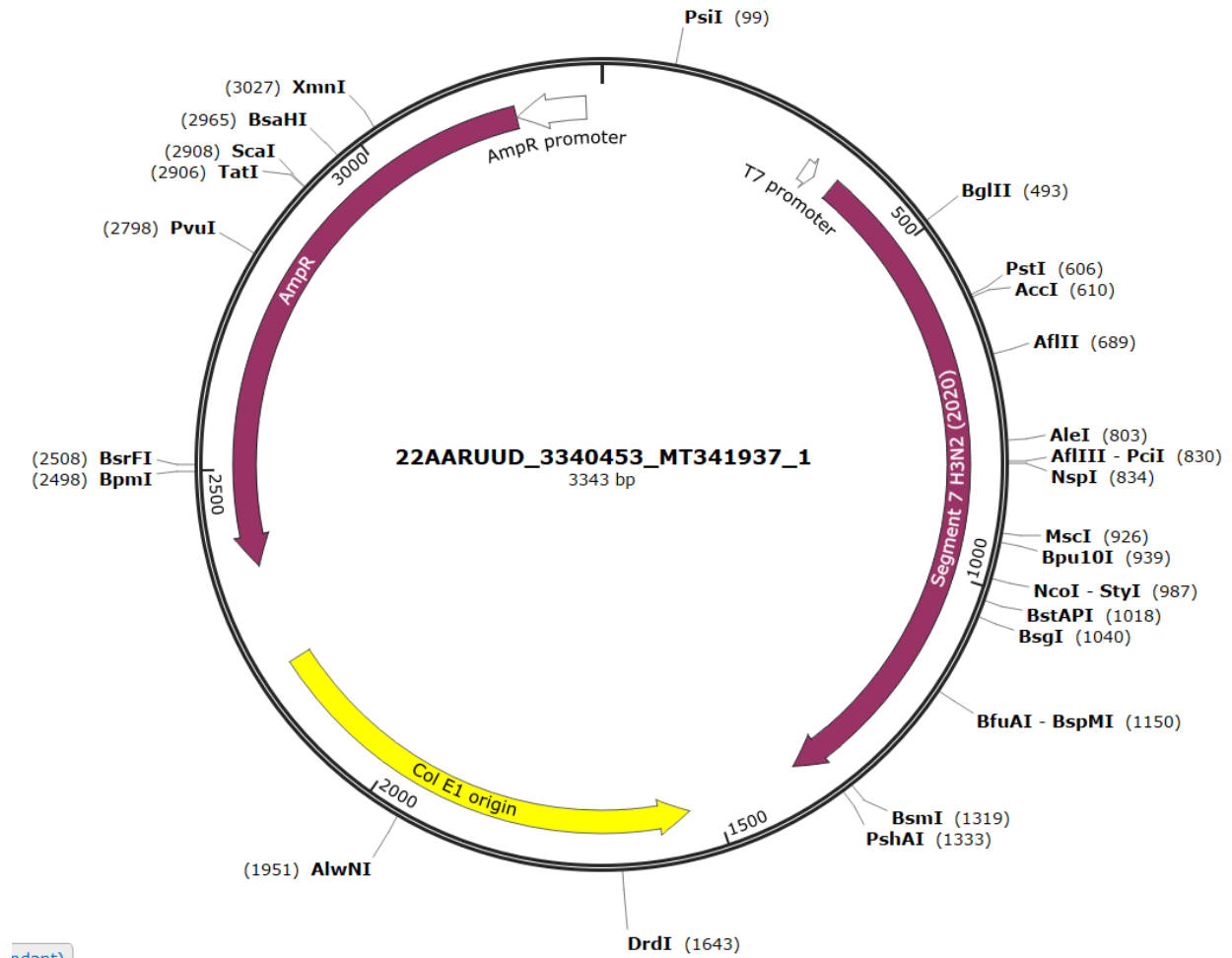


Abbildung 21: Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard

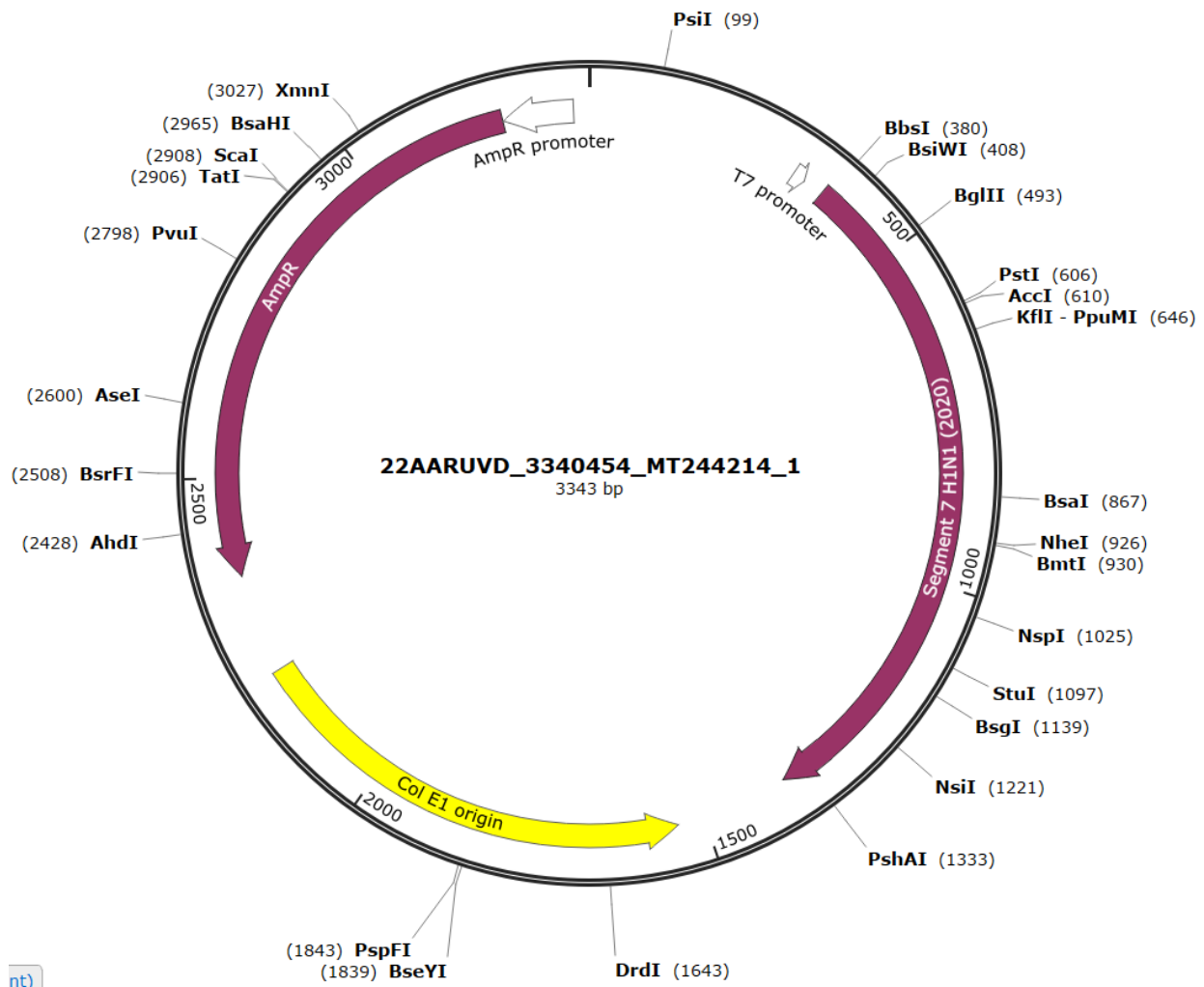


Abbildung 22: Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard

# Literaturverzeichnis

- Ableitner, Oksana. 2018. *Einführung in Die Molekularbiologie*. Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-20624-6>.
- Aranha, Clara, Vainav Patel, Vikrant Bhor, and Dimpu Gogoi. 2021. "Cycle Threshold Values in RT-PCR to Determine Dynamics of SARS-CoV-2 Viral Load: An Approach to Reduce the Isolation Period for COVID-19 Patients." *Journal of Medical Virology* 93 (12): 6794–97. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>.
- Arranz, Rocío, Rocío Coloma, Francisco Javier Chichón, José Javier Conesa, José L. Carrascosa, José M. Valpuesta, Juan Ortín, and Jaime Martín-Benito. 2012. "The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins." *Science* 338 (6114): 1634–37. <https://doi.org/10.1126/science.1228172>.
- Axelsen, Jacob Bock, Rami Yaari, Bryan T. Grenfell, and Lewi Stone. 2014. "Multiannual Forecasting of Seasonal Influenza Dynamics Reveals Climatic and Evolutionary Drivers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (26): 9538–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321656111>.
- Babu, Binoy, Francisco M. Ochoa-Corona, and Mathews L. Paret. 2018. "Recombinase Polymerase Amplification Applied to Plant Virus Detection and Potential Implications." *Analytical Biochemistry* 546 (April): 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>.
- Bachman, Julia. 2013. "Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)." In *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*, 67–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6>.
- Bai, Chongzhi, Qiming Zhong, and George Fu Gao. 2021. "Overview of SARS-CoV-2 Genome-Encoded Proteins." *Science China Life Sciences* 65 (2): 280–94. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>.
- 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>.
- Bergkessel, Megan, and Christine Guthrie. 2013. "Colony PCR." In *Methods in Enzymology*, 299–309. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00025-2>.
- Biggerstaff, Matthew, Simon Cauchemez, Carrie Reed, Manoj Gambhir, and Lyn Finelli. 2014. "Estimates of the Reproduction Number for Seasonal, Pandemic, and Zoonotic Influenza: A Systematic Review of the Literature." *BMC Infectious Diseases* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-480>.
- Bingham, N. H., and John M. Fry. 2010. *Regression*. Springer London. <https://doi.org/10.1007/978-1-84882-969-5>.
- BioEcho. 2022. "EchoCLEAN DNA & RNA Cleanup Kits Produkt Brochüre." *Online Verfügbar Unter*. [https://doi.org/https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/d0/9e/c1/1655465490/Cleanup-Brochure\\_ENG.pdf](https://doi.org/https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/d0/9e/c1/1655465490/Cleanup-Brochure_ENG.pdf).
- Biomers. 2023a. "PCR-Blocker." *Biomers.net the Biopolymer Factory*. [https://www.biomers.net/de/Produkte/DNA/Real-time\\_PCR/PCR\\_Blocker.html](https://www.biomers.net/de/Produkte/DNA/Real-time_PCR/PCR_Blocker.html).
- . 2023b. "REAL-TIME PCR PROBES." *Biomers.net the Biopolymer Factory*. [https://www.biomers.net/de/Produkte/Real\\_Time\\_PCR\\_Probes.html](https://www.biomers.net/de/Produkte/Real_Time_PCR_Probes.html).
- Bliss, C. I. 1934. "The Method of Probits." *Science* 79 (2037): 38–39. <https://doi.org/10.1126/science.79.2037.38>.
- Boyle, David S., Dara A. Lehman, Lorraine Lillis, Dylan Peterson, Mitra Singhal, Niall Armes, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, and Julie Overbaugh. 2013. "Rapid Detection of HIV-1 Proviral DNA for Early Infant Diagnosis Using Recombinase Polymerase Amplification." Edited by Gary J. Nabel. *mBio* 4 (2).

- <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>.
- Brendish, Nathan J., Hannah F. Schiff, and Tristan W. Clark. 2015. “Point-of-Care Testing for Respiratory Viruses in Adults: The Current Landscape and Future Potential.” *Journal of Infection* 71 (5): 501–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008>.
- Bustin, S A, V Benes, T Nolan, and M W Pfaffl. 2005. “Quantitative Real-Time RT-PCR – a Perspective.” *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3): 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>.
- Bustin, SA. 2000. “Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays.” *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–93. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.” *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Chander, Yogesh, Jim Koelbl, Jamie Puckett, Michael J. Moser, Audrey J. Klingele, Mark R. Liles, Abel Carrias, David A. Mead, and Thomas W. Schoenfeld. 2014. “A Novel Thermostable Polymerase for RNA and DNA Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).” *Frontiers in Microbiology* 5 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>.
- Charrel, Rémi N., Xavier de Lamballerie, and Didier Raoult. 2007. “Chikungunya Outbreaks — the Globalization of Vectorborne Diseases.” *New England Journal of Medicine* 356 (8): 769–71. <https://doi.org/10.1056/nejmp078013>.
- Chen, Caifu, David Ruff, and Jason Halsey. 2010. “Asynchronous PCR.” In *Methods in Molecular Biology*, 231–43. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4_16).
- Chen, Rubing, and Edward C. Holmes. 2008. “The Evolutionary Dynamics of Human Influenza b Virus.” *Journal of Molecular Evolution* 66 (6): 655–63. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>.
- Chen, Xiaoyong, Shasha Liu, Mohsan Ullah Goraya, Mohamed Maarouf, Shile Huang, and Ji-Long Chen. 2018. “Host Immune Response to Influenza a Virus Infection.” *Frontiers in Immunology* 9 (March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>.
- Chlanda, Petr, and Joshua Zimmerberg. 2016. “Protein-Lipid Interactions Critical to Replication of the Influenza a Virus.” *FEBS Letters* 590 (13): 1940–54. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118>.
- Compton, J. 1991. “Nucleic Acid Sequence-Based Amplification.” *Nature* 350 (6313): 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>.
- Daher, Rana K, Gale Stewart, Maurice Boissinot, and Michel G Bergeron. 2016. “Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications.” *Clinical Chemistry* 62 (7): 947–58. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>.
- Deiman, Birgit, Pierre van Aarle, and Peter Sillekens. 2002. “Characteristics and Applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA).” *Molecular Biotechnology* 20 (2): 163–80. <https://doi.org/10.1385/mb.20:2:163>.
- Dharmapalan, Dhanya. 2020. “Influenza.” *The Indian Journal of Pediatrics* 87 (10): 828–32. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1>.
- Diagne, Cheikh Tidiane, Martin Faye, Benjamin Lopez-Jimena, Ahmed Abd El Wahed, Cheikh Loucoubar, Cheikh Fall, Giulia Mencatelli, et al. 2020. “Comparative Analysis of Zika Virus Detection by RT-qPCR, RT-LAMP, and RT-RPA.” In *Methods in Molecular Biology*, 165–79. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3_14).



- 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>.
- Fahrmeir, Ludwig, Christian Heumann, Rita Künstler, Iris Pigeot, and Gerhard Tutz. 2016. *Statistik*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50372-0>.
- Firth, Andrew E., and Ian Brierley. 2012. “Non-Canonical Translation in RNA Viruses.” *Journal of General Virology* 93 (7): 1385–1409. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0>.
- Fisher, R. A. 1992. “Statistical Methods for Research Workers.” In *Springer Series in Statistics*, 66–70. Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_6).
- Foni, Emanuela, Chiara Chiapponi, Laura Baioni, Irene Zanni, Marianna Merenda, Carlo Rosignoli, Constantinos S. Kyriakis, et al. 2017. “Influenza d in Italy: Towards a Better Understanding of an Emerging Viral Infection in Swine.” *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12012-3>.
- Frey, Andreas, James Di Canzio, and David Zurakowski. 1998. “A Statistically Defined Endpoint Titer Determination Method for Immunoassays.” *Journal of Immunological Methods* 221 (1-2): 35–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7).
- Gaňová, Martina, Haoqing Zhang, Hanliang Zhu, Marie Korabečná, and Pavel Neužil. 2021. “Multiplexed Digital Polymerase Chain Reaction as a Powerful Diagnostic Tool.” *Biosensors and Bioelectronics* 181 (June): 113155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155>.
- Gastwirth, Joseph L., Yulia R. Gel, and Weiwen Miao. 2009. “The Impact of Levene’s Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice.” *Statistical Science* 24 (3). <https://doi.org/10.1214/09-sts301>.
- Gautam, Akash. 2022. *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4>.
- Gehrau, Volker, Katharina Maubach, and Sam Fujarski. 2022. “Mittelwertvergleiche.” In *Einfache Datenauswertung Mit r*, 319–83. Springer Fachmedien Wiesbaden. [https://doi.org/10.1007/978-3-658-34285-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-658-34285-2_12).
- Goble, Joseph A., and Patrick T. Rocafort. 2016. “Point-of-Care Testing.” *Journal of Pharmacy Practice* 30 (2): 229–37. <https://doi.org/10.1177/0897190015587696>.
- González-Estrada, Elizabeth, José A. Villaseñor, and Rocío Acosta-Pech. 2022. “Shapiro-Wilk Test for Multivariate Skew-Normality.” *Computational Statistics* 37 (4): 1985–2001. <https://doi.org/10.1007/s00180-021-01188-y>.
- Guatelli, J C, K M Whitfield, D Y Kwok, K J Barringer, D D Richman, and T R Gingeras. 1990. “Isothermal, in Vitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (5): 1874–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>.
- Hampson, Alan W, and John S Mackenzie. 2006. “The Influenza Viruses.” *Medical Journal of Australia* 185 (S10). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00705.x>.
- Hatta, Masato, Hideo Goto, and Yoshihiro Kawaoka. 2004. “Influenza b Virus Requires BM2 Protein for Replication.” *Journal of Virology* 78 (11): 5576–83. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5576-5583.2004>.
- Hause, Ben M., Mariette Ducatez, Emily A. Collin, Zhiguang Ran, Runxia Liu, Zizhang Sheng, Anibal Arminen, et al. 2013. “Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza c Viruses.” Edited by Ron A. M. Fouchier. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>.
- Higgins, Matthew, Matt Ravenhall, Daniel Ward, Jody Phelan, Amy Ibrahim, Matthew S Forrest, Taane G Clark, and Susana Campino. 2018. “PrimedRPA: Primer Design for Recombinase Polymerase Amplifica-

- tion Assays.” Edited by John Hancock. *Bioinformatics* 35 (4): 682–84. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>.
- Higgins, Matthew, Oliver W. Stringer, Daniel Ward, Jennifer M. Andrews, Matthew S. Forrest, Susana Campino, and Taane G. Clark. 2022. “Characterizing the Impact of Primer-Template Mismatches on Recombinase Polymerase Amplification.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–16. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005>.
- Huang, Tianzeng, Linzhi Li, Xing Liu, Qi Chen, Xueen Fang, Jilie Kong, Mohamed S. Draz, and Hongmei Cao. 2020. “Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique: Principle, Development and Wide Application in Food Safety.” *Analytical Methods* 12 (46): 5551–61. <https://doi.org/10.1039/d0ay01768j>.
- Islam, Md Mamunul, and Dipak Koirala. 2022. “Toward a Next-Generation Diagnostic Tool: A Review on Emerging Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques for the Detection of SARS-CoV-2 and Other Infectious Viruses.” *Analytica Chimica Acta* 1209 (May): 339338. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338>.
- Iwamoto, Tomotada, Toshiaki Sonobe, and Kozaburo Hayashi. 2003. “Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex, *M. Avium*, and *M. Intracellulare* in Sputum Samples.” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>.
- Jagger, B. W., H. M. Wise, J. C. Kash, K.-A. Walters, N. M. Wills, Y.-L. Xiao, R. L. Dunfee, et al. 2012. “An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response.” *Science* 337 (6091): 199–204. <https://doi.org/10.1126/science.1222213>.
- Javanian, Mostafa, Mohammad Barary, Sam Ghebrehewet, Veerendra Koppolu, Veneela Krishna Rekha Vasisigala, and Soheil Ebrahimpour. 2021. “A Brief Review of Influenza Virus Infection.” *Journal of Medical Virology* 93 (8): 4638–46. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>.
- Johnston, Andrew D., Jennifer Lu, Ke-lin Ru, Darren Korbie, and Matt Trau. 2019. “PrimerROC: Accurate Condition-Independent Dimer Prediction Using ROC Analysis.” *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36612-9>.
- Jones, Laurie J., Stephen T. Yue, Ching-Ying Cheung, and Victoria L. Singer. 1998. “RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization.” *Analytical Biochemistry* 265 (2): 368–74. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914>.
- Kang, Tongjia, Jingming Lu, Tian Yu, Yi Long, and Guozhen Liu. 2022. “Advances in Nucleic Acid Amplification Techniques (NAATs): COVID-19 Point-of-Care Diagnostics as an Example.” *Biosensors and Bioelectronics* 206 (June): 114109. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109>.
- Kim, Hyunsuh, Robert G. Webster, and Richard J. Webby. 2018. “Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen.” *Viral Immunology* 31 (2): 174–83. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>.
- Kordyukova, Larisa V., Eleonora V. Shtykova, Lyudmila A. Baratova, Dmitri I. Svergun, and Oleg V. Batishev. 2018. “Matrix Proteins of Enveloped Viruses: A Case Study of Influenza A Virus M1 Protein.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (3): 671–90. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089>.
- Koutsakos, Marios, Thi HO Nguyen, Wendy S Barclay, and Katherine Kedzierska. 2016. “Knowns and Unknowns of Influenza B Viruses.” *Future Microbiology* 11 (1): 119–35. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>.
- Krammer, Florian, Gavin J. D. Smith, Ron A. M. Fouchier, Malik Peiris, Katherine Kedzierska, Peter C. Doherty, Peter Palese, et al. 2018. “Influenza.” *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). <https://doi.org/>

10.1038/s41572-018-0002-y.

- Kück, Ulrich. 2005. "PCR-Analytik." In *Praktikum Der Molekulargenetik*, 221–45. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-26469-8\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-26469-8_4).
- Kuckartz, Udo, Stefan Rädiker, Thomas Ebert, and Julia Schehl. 2010. "T-Test: Zwei Mittelwerte Vergleichen." In *Statistik*, 147–66. VS Verlag für Sozialwissenschaften. [https://doi.org/10.1007/978-3-531-92033-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-531-92033-7_7).
- Lázaro, Ana, Luis A. Tortajada-Genaro, and Ángel Maquieira. 2021. "Enhanced Asymmetric Blocked qPCR Method for Affordable Detection of Point Mutations in KRAS Oncogene." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (11): 2961–69. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03229-3>.
- Lee, Sangseok, and Dong Kyu Lee. 2018. "What Is the Proper Way to Apply the Multiple Comparison Test?" *Korean Journal of Anesthesiology* 71 (5): 353–60. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>.
- 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>.
- Lobato, Ivan Magriñá, and Ciara K. OSullivan. 2018. "Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98 (January): 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
- Louie, Richard F., Tyler Kitano, T. Keith Brock, Robert Derlet, and Gerald J. Kost. 2009. "Point-of-Care Testing for Pandemic Influenza and Biothreats." *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3 (S2): S193–202. <https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4>.
- Luo, Ming. 2011. "Influenza Virus Entry." In *Viral Molecular Machines*, 201–21. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9).
- Ma, Haiyan, Kristin N. Bell, and Rossi N. Loker. 2021. "qPCR and qRT-PCR Analysis: Regulatory Points to Consider When Conducting Biodistribution and Vector Shedding Studies." *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 20 (March): 152–68. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>.
- Malek, Larry, Roy Sooknanan, and Jean Compton. 1994. "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™)." In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, 253–60. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253>.
- Mann, H. B., and D. R. Whitney. 1947. "On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other." *The Annals of Mathematical Statistics* 18 (1): 50–60. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>.
- McCauley, J W, and B W J Mahy. 1983. "Structure and Function of the Influenza Virus Genome." *Biochemical Journal* 211 (2): 281–94. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>.
- Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5>.
- Mori, Yasuyoshi, Kentaro Nagamine, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. 2001. "Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 150–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.

- Mülhardt, Cornel. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0): 263–73. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- Muramoto, Yukiko, Takeshi Noda, Eiryo Kawakami, Ramesh Akkina, and Yoshihiro Kawaoka. 2013. "Identification of Novel Influenza a Virus Proteins Translated from PA mRNA." *Journal of Virology* 87 (5): 2455–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12>.
- Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. "Accelerated Reaction by Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Loop Primers." *Molecular and Cellular Probes* 16 (3): 223–29. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
- Nayak, Debi P., Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou, and Subrata Barman. 2009. "Influenza Virus Morphogenesis and Budding." *Virus Research* 143 (2): 147–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>.
- NCIRD. 2021. "National Center for Immunization and Respiratory Diseases (u.s.)." *Research Use Only CDC Flu Sc2 Multiplex Assay Primers and Probes*, July. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/107944>.
- Nicholson, Karl G, John M Wood, and Maria Zambon. 2003. "Influenza." *The Lancet* 362 (9397): 1733–45. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14854-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14854-4).
- Njouom, Richard, Gwladys Chavely Monamele, Burcu Ermetel, Serge Tchatchouang, Sylvie Moyo-Tetang, John W. McCauley, and Rodney S. Daniels. 2019. "Detection of Influenza c Virus Infection Among Hospitalized Patients, Cameroon." *Emerging Infectious Diseases* 25 (3): 607–9. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181213>.
- Notomi, T. 2000. "Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA." *Nucleic Acids Research* 28 (12): 63e–63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- Omran, Qusay Q, Olga Fedorova, Tianshuo Liu, and Anna M Pyle. 2022. "A Molecular Beacon Assay for Monitoring RNA Splicing." *Nucleic Acids Research* 50 (13): e74–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac242>.
- Özay, Burcu, and Stephanie E McCalla. 2021. "A Review of Reaction Enhancement Strategies for Isothermal Nucleic Acid Amplification Reactions." *Sensors and Actuators Reports* 3 (November): 100033. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100033>.
- Pabinger, Stephan, Stefan Rödiger, Albert Kriegner, Klemens Vierlinger, and Andreas Weinhäusel. 2014. "A Survey of Tools for the Analysis of Quantitative PCR (qPCR) Data." *Biomolecular Detection and Quantification* 1 (1): 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002>.
- Parida, Manmohan, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao, and Kouichi Morita. 2008. "Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A New Generation of Innovative Gene Amplification Technique; Perspectives in Clinical Diagnosis of Infectious Diseases." *Reviews in Medical Virology* 18 (6): 407–21. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
- Park, Jee-Woong. 2022. "Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests." *Biosensors* 12 (10): 857. <https://doi.org/10.3390/bios12100857>.
- Paterson, Reay G, Makoto Takeda, Yuki Ohigashi, Lawrence H Pinto, and Robert A Lamb. 2003. "Influenza b Virus BM2 Protein Is an Oligomeric Integral Membrane Protein Expressed at the Cell Surface." *Virology* 306 (1): 7–17. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00083-1).
- Paules, Catharine, and Kanta Subbarao. 2017. "Influenza." *The Lancet* 390 (10095): 697–708. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30129-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30129-0).

- Piepenburg, Olaf, Colin H Williams, Derek L Stemple, and Niall A Armes. 2006. "DNA Detection Using Recombination Proteins." Edited by James Haber. *PLoS Biology* 4 (7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- Prazeres, Duarte Miguel F, Thomas Schlupe, and Charles Cooney. 1998. "Preparative Purification of Supercoiled Plasmid DNA Using Anion-Exchange Chromatography." *Journal of Chromatography A* 806 (1): 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01254-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01254-5).
- Pumford, Elizabeth A., Jiakun Lu, Iza Spaczai, Matthew E. Prasetyo, Elaine M. Zheng, Hanxu Zhang, and Daniel T. Kamei. 2020. "Developments in Integrating Nucleic Acid Isothermal Amplification and Detection Systems for Point-of-Care Diagnostics." *Biosensors and Bioelectronics* 170 (December): 112674. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112674>.
- QIAGEN. 2021. "QIAGEN® PlasmidPurification Handbook." *QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega, and Giga Kits. For Purification of Ultrapure, Transfection-Grade Plasmid DNA Online Verfügbar Unter: <https://www.qiagen.com/Us/Resources/Download.aspx?id=0bd0c5fb-C271-43e7-Af43-32d539374fa9&lang=en>*.
- Ranasinghe, Rohan T., and Tom Brown. 2005. "Fluorescence Based Strategies for Genetic Analysis." *Chemical Communications*, no. 44: 5487. <https://doi.org/10.1039/b509522k>.
- Rasch, Björn, Malte Frieze, Wilhelm Hofmann, and Ewald Naumann. 2014. "Einfaktorielle Varianzanalyse." In *Springer-Lehrbuch*, 1–34. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43548-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43548-9_1).
- Ritz, C., and A.-N. Spiess. 2008. "qpcR: An r Package for Sigmoidal Model Selection in Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis." *Bioinformatics* 24 (13): 1549–51. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn227>.
- RKI. 2019. "Infektionsepidemiologisches Jahrbuch Meldepflichtiger Krankheiten Für 2018." *Robert-Koch-Institut*. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2018.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile).
- Rödiger, Stefan, Michał Burdukiewicz, and Peter Schierack. 2015. "chipPCR: An r Package to Pre-Process Raw Data of Amplification Curves: Fig. 1." *Bioinformatics* 31 (17): 2900–2902. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv205>.
- Rödiger, Stefan, Michał Burdukiewicz, Andrej-Nikolai Spiess, and Konstantin Blagodatskikh. 2022. "PC-Redux204 Package - an Overview [Vignette]." *Comprehensive R Archive Network*, 1–104. <https://cran.r-project.org/web/packages/PCRedux/vignettes/PCRedux.pdf>.
- Sandt, Carolien E van de, Rogier Bodewes, Guus F Rimmelzwaan, and Rory D de Vries. 2015. "Influenza b Viruses: Not to Be Discounted." *Future Microbiology* 10 (9): 1447–65. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.65>.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Sanjuán, Rafael, and Pilar Domingo-Calap. 2016. "Mechanisms of Viral Mutation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4433–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.
- Schmidt, Torsten, Karl Friehe, Martin Schleef, Carsten Voss, and Erwin Flaschel. 1999. "Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Gel Electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 274 (2): 235–40. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4291>.
- Selman, Mohammed, Samar K Dankar, Nicole E Forbes, Jian-Jun Jia, and Earl G Brown. 2012. "Adaptive Mutation in Influenza a Virus Non-Structural Gene Is Linked to Host Switching and Induces a Novel Protein by Alternative Splicing." *Emerging Microbes & Infections* 1 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1>



038/emi.2012.38.

- Shao, Wenhan, Xinxin Li, Mohsan Goraya, Song Wang, and Ji-Long Chen. 2017. "Evolution of Influenza a Virus by Mutation and Re-Assortment." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>.
- SHAPIRO, S. S., and M. B. WILK. 1965. "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)." *Biometrika* 52 (3-4): 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.
- Sharma, Aarjoo, Sanjeev Balda, Mansi Apreja, Kirti Kataria, Neena Capalash, and Prince Sharma. 2021. "COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques." *International Journal of Biological Macromolecules* 193 (December): 1835–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016>.
- Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. 2017. "Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences." *Protein Science* 27 (1): 135–45. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
- Silva, Severino Jefferson Ribeiro da, Keith Pardee, and Lindomar Pena. 2019. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review." *Viruses* 12 (1): 19. <https://doi.org/10.3390/v12010019>.
- Smith, Duncan R. n.d. "Restriction Endonuclease Digestion of DNA." In *Transgenesis Techniques*, 427–32. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:427>.
- Soroka, Marianna, Barbara Wasowicz, and Anna Rymaszewska. 2021. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?" *Cells* 10 (8): 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>.
- Sreejith, Kamalalayam Rajan, Chin Hong Ooi, Jing Jin, Dzung Viet Dao, and Nam-Trung Nguyen. 2018. "Digital Polymerase Chain Reaction Technology – Recent Advances and Future Perspectives." *Lab on a Chip* 18 (24): 3717–32. <https://doi.org/10.1039/c8lc00990b>.
- Stahel, Werner A. 1999. "Multivariate Statistik." In *Statistische Datenanalyse*, 304–21. Vieweg+Teubner Verlag. [https://doi.org/10.1007/978-3-663-11500-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-663-11500-7_15).
- Takeuchi, K, and R A Lamb. 1994. "Influenza Virus M2 Protein Ion Channel Activity Stabilizes the Native Form of Fowl Plague Virus Hemagglutinin During Intracellular Transport." *Journal of Virology* 68 (2): 911–19. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.2.911-919.1994>.
- Tan, Meiying, Chuan Liao, Lina Liang, Xueli Yi, Zihan Zhou, and Guijiang Wei. 2022. "Recent Advances in Recombinase Polymerase Amplification: Principle, Advantages, Disadvantages and Applications." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (November). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1019071>.
- Thornton, Brenda, and Chhandak Basu. 2011. "Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software." *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145–54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- To, Janet, Wahyu Surya, and Jaume Torres. 2016. "Targeting the Channel Activity of Viroporins." In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 307–55. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.12.003>.
- To, Janet, and Jaume Torres. 2019. "Viroporins in the Influenza Virus." *Cells* 8 (7): 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>.
- Tomita, Norihiro, Yasuyoshi Mori, Hidetoshi Kanda, and Tsugunori Notomi. 2008. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products." *Nature Protocols* 3 (5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>.
- Uyeki, Timothy M, David S Hui, Maria Zambon, David E Wentworth, and Arnold S Monto. 2022. "Influenza." *The Lancet* 400 (10353): 693–706. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5).
- Valera, Enrique, Aaron Jankelow, Jongwon Lim, Victoria Kindratenko, Anurup Ganguli, Karen White, James

- Kumar, and Rashid Bashir. 2021. "COVID-19 Point-of-Care Diagnostics: Present and Future." *ACS Nano* 15 (5): 7899–7906. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981>.
- Vasin, A. V., O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova, and O. I. Kiselev. 2014. "Molecular Mechanisms Enhancing the Proteome of Influenza a Viruses: An Overview of Recently Discovered Proteins." *Virus Research* 185 (June): 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>.
- Velthuis, Aartjan J. W. te, and Ervin Fodor. 2016. "Influenza Virus RNA Polymerase: Insights into the Mechanisms of Viral RNA Synthesis." *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 479–93. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>.
- WELCH, B. L. 1947. "THE GENERALIZATION OF 'STUDENT's' PROBLEM WHEN SEVERAL DIFFERENT POPULATION VARLANCES ARE INVOLVED." *Biometrika* 34 (1-2): 28–35. <https://doi.org/10.1093/biomet/34.1-2.28>.
- Wise, Helen M., Edward C. Hutchinson, Brett W. Jagger, Amanda D. Stuart, Zi H. Kang, Nicole Robb, Louis M. Schwartzman, et al. 2012. "Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza a Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain." Edited by Andrew Pekosz. *PLoS Pathogens* 8 (11): e1002998. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998>.
- Wood, Gary S., Rosnn M. Tung, Andreas C. Heaffner, Carol F. Crooks, Shaoyi Liao, Rachaci Orozco, Hendrik Veelken, et al. 1994. "Detection of Clonal t-Cell Receptor  $\gamma$  Gene Rearrangements in Early Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome by Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR/DGGE)." *Journal of Investigative Dermatology* 103 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12389114>.
- Yoo, Hee Min, Il-Hwan Kim, and Seil Kim. 2021. "Nucleic Acid Testing of SARS-CoV-2." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6150. <https://doi.org/10.3390/ijms22116150>.
- Yoo, Sung J., Taeyong Kwon, and Young S. Lyoo. 2018. "Challenges of Influenza a Viruses in Humans and Animals and Current Animal Vaccines as an Effective Control Measure." *Clinical and Experimental Vaccine Research* 7 (1): 1. <https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1>.
- Zaraket, Hassan, Aeron C. Hurt, Barry Clinch, Ian Barr, and Nelson Lee. 2021. "Burden of Influenza b Virus Infection and Considerations for Clinical Management." *Antiviral Research* 185 (January): 104970. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104970>.
- Zhang, Wei S., Jianbin Pan, Feng Li, Min Zhu, Mengting Xu, Hongyan Zhu, Yanyan Yu, and Gaoxing Su. 2021. "Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Coupled with CRISPR-Cas12a for Facile and Highly Sensitive Colorimetric SARS-CoV-2 Detection." *Analytical Chemistry* 93 (8): 4126–33. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013>.
- Zhao, Yongxi, Feng Chen, Qian Li, Lihua Wang, and Chunhai Fan. 2015. "Isothermal Amplification of Nucleic Acids." *Chemical Reviews* 115 (22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>.
- Zhong, Junliang, and Xihong Zhao. 2018. "Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Food-borne Pathogens." *Food Analytical Methods* 11 (6): 1543–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>.