

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Diskussion</b>	<b>2</b>
1.1	Einfluss von Basenfehlpaarung in Primern und Sonden auf die RT-RPA . . . . .	2
1.2	Mischzeitpunkt und Sensitivität in der RT-RPA mit reduzierten Reaktionsvolumen . . . . .	4
1.3	Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays . . . . .	5
1.4	Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA . . . . .	7
1.5	Einfluss von Modifikationen der Exo-Sonde auf die RT-RPA . . . . .	8
1.6	Der “Ditching”-Effekt innerhalb der RT-RPA . . . . .	10
1.7	Automatische Auswertung der Amplifikationen mittels Statistik . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>12</b>

# 1 Diskussion

Influenza Viren sind eine der bedeutendsten viralen Atemwegs-Infektionserkrankungen mit mehr als 300.000 jährlichen Todesfällen weltweit. Die medikamentöse Behandlung sollte zeitnah erfolgen und muss spezifisch für die verschiedenen Viren-Typen angepasst werden, was eine frühzeitige, spezifische Detektion für den Behandlungserfolg unerlässlich macht.

Ein isothermes Nachweissystem von Influenza A und B Viren sollte entwickelt werden. Da Influenza Viren ein RNA-Genom besitzen wurde die RPA mit einem reversen Transkriptionsschritt kombiniert und so das Nachweissystem als RT-RPA implementiert. Eine Vorgabe der Detektion war das die Influenza B RT-RPA als Pan-Influenza B Nachweis dienen und die Influenza A RT-RPA die Subtypen H1N1 und H3N2 detektieren sollte. Die Systeme wurden bezüglich Sensitivität für einen späteren Einsatz in einer kommenden Lab-on-a-chip Umgebung als Point-of-care Diagnostik optimiert. Dabei wurden Parameter, welche die Amplifikation beeinflussen können, wie die Standardparameter Reaktionstemperatur, Mischzeiten aber auch wie versch. Primerkonzentrationen und verschiedene Sondenmodifikationen untersucht.

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

Bei der Wahl eines Amplifikationsbereiches, welcher zur Verwendung als Influenza B Pan RT-RPA geeignet ist, wurde sich aufgrund der hohen Homologie von 97,7 % für das Genomsegment 8 entschieden (Vodeiko *et al.* 2003). Dabei ist die Verwendung des gleichen Genomsegmentes in der Literatur für andere Amplifikationssysteme wie die RT-PCR beschrieben (Goffard *et al.* 2008; NCIRD 2021). Bei Influenza B liegt im Vergleich zu Influenza A eine geringere Mutationsrate vor und es wurden keine größeren Antigenenveränderungen der Oberflächenproteine beobachtet (Paterson *et al.* 2003; Chen & Holmes 2008). Im ausgewählten Genomsegment 8 konnten über den selektierten Detektionsbereich starke Homologien (98,5 %) gefunden werden. Dementsprechend ist der gewählte Amplifikationsbereich wahrscheinlich geeignet alle Viruslinien zu detektieren und kann dadurch für das Pan-Influenza-B Virusdetektionssystem verwendet werden.

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

Eine Strategie, um Basenfehlpaarungen auszugleichen, kann die Verwendung von degenerierten Basen, d.h. einem Gemisch ähnlicher Primersequenzen in den entsprechenden Primern und Sonden sein. Dieses erleichtert die Hybridisierung, verbessert somit die Amplifikation und wurde in dieser Arbeit gewählt um die Basenfehlpaarungen zu kompensieren (Linhart & Shamir 2005). Einen anderen Ansatz verfolgten Liang *et al.* (2022), die zur Detektion der beiden Subtypen innerhalb einer RT-RPA zwei verschiedene Genomsegmente wählten (Liang *et al.* 2022). Jedoch verwendeten Liang *et al.* (2022) zwei getrennte Reaktionen zum Nachweis der Influenza A Viren und ein Multiplex-Ansatz wäre nötig um eine Detektion innerhalb einer Reaktion durchzuführen. Im Gegensatz dazu benötigt die in dieser Arbeit entwickelte Influenza A RT-RPA nur eine Reaktion ohne Multiplex-Ansatz zur Detektion und kann so einfacher mit anderen Systemen als Multiplex kombiniert werden.

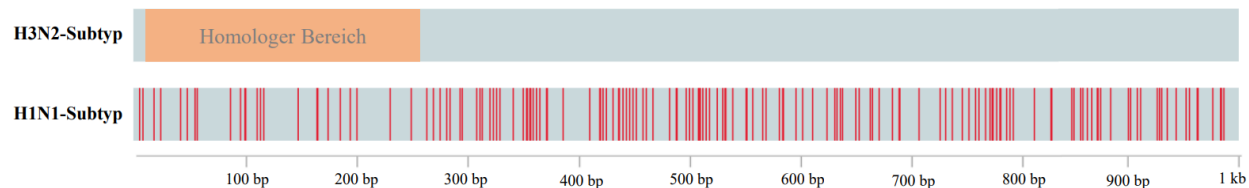


Abbildung 1: **Alignment des Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyps:** Alignment des Genomsegmentes 7 zwischen dem H1N1 Subtyp (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2 Subtyp (GenBank Nr.: MT244214). Die Skala gibt die Sequenzlänge in bp an. Die roten Striche stehen für Basenfehlpaarungen im H1N1 Subtyp im Vergleich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

Wie in Abbildung ?? zu erkennen, sind die ausgewählten Primer-Sonden-Kombinationen des PrimedRPA Programms unbrauchbar. Bei der Influenza B RT-RPA (Abbildung ??) konnten hingegen alle ausgewählten Primer-Sonden-Kombinationen zumindest klar positive Amplifikationen zeigen. Somit ist eine deutliche Differenz hinsichtlich der Funktionalität des PrimedRPA Programms für die Entwicklung von Primer-Sonden-Kombinationen zu beobachten. Dies könnte an den verwendeten Sequenzvorlagen liegen, da bei Influenza A im Gegensatz zu Influenza B etliche Basenfehlpaarungen in den Sequenzen vorhanden waren. Die entwickelten Primer wiesen jeweils bis zu Basenfehlpaarungen über den Primer verteilt je nach Subtyp auf. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass bis zu 6 Fehlpaarungen in RPA-Primern eine RPA nicht vollständig inhibieren (Boyle *et al.* 2013). Somit kann die unfunktionalität der Primer nicht durch die Anzahl der Basenfehlpaarungen erklärt werden. Des Weiteren konnten Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015) zeigen, dass vor allem Fehlpaarungen am 3' und 5'-Ende des Primers die RPA entscheidend inhibieren (Boyle *et al.* 2013; Higgins *et al.* 2022). Dabei besaßen sowohl der von Ehnts (2013) entwickelte Forward E Primer als auch der vom Programm designte Primer Forward 1 eine Basenfehlpaarung am 3'-Ende. Bei beiden Primern wurde die Fehlpaarung durch ein generierte Basen ausgeglichen, jedoch nicht komplett vermieden, da innerhalb der Primergemischs die Hälfte der Primer immer noch die Fehlpaarung aufweisen (Liang *et al.* 2022). Um die Basenfehlpaarung des Forward E Primers gänzlich zu vermeiden, wurden zwei alternative Primer (Forward E.2 und E.3) entwickelt, welche um eine Position verschoben waren (Tabelle ??). Jedoch zeigte sich, dass die alternativen Primer ohne 3'-Mismatch leicht schlechtere Fluoreszenzauslenkungen aufwiesen, als der Forward E Primer (Abbildung ??). Dies spricht gegen die Beobachtungen Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015), welche beschreiben, dass gerade Fehlpaarungen am 3'-Ende großen negativen Einfluss auf die RPA nehmen und somit die Primer ohne Fehlpaarung bessere Amplifikationen zeigen müssten. Jedoch bezogen sich beide Studien nur auf die Primer und ließen die Sonde außer Acht, welche jedoch ebenfalls Fehlpaarungen bei der Influenza A RT-RPA aufwies (Boyle *et al.* 2013; Higgins *et al.* 2022). Liu *et al.* (2019) konnte zeigen, dass Fehlpaarungen in der Sonde bis hin zu einer vollständigen Inhibierung und sogar zu falsch positiven Amplifikationen der RPA führen können (Liu *et al.* 2019). Das könnte eine mögliche Erklärung zur großen Diskrepanz, zwischen dem von Ehnts (2013) entwickelten RPA-System und dem mit PrimedRPA designten Primer-Sonden-Kombinationen innerhalb der Influenza A RT-RPA sein. Zwar besitzt die von Ehnts (2013) entickelte Sonde (Sonde E) ebenfalls Basenfehlpaarungen, diese könnten jedoch die RT-RPA nur teilweise inhibieren, während die Fehlpaarungen der PrimedRPA-Sonden (Sonde 3.1 und Sonde 1.1) zu einer unfunktionellen RT-RPA führen.

Des Weiteren ist bei der Primerauswahl der Influenza B RT-RPA (Abbildung ??) am Beispiel der beiden getesteten Sonden zu erkennen, dass nicht nur Basenfehlpaarungen sondern auch andere Einflüsse zu unter-

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

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

Durch geringe thermische Konvektion und durch den eingesetzten „crowding agent“ wird die Diffusion der Reagenzien während der RT-RPA erschwert und es kommt zu lokaler Reagenzien-Knappheit (Lillis *et al.* 2016). Deshalb wird ein zusätzlicher Mischschritt vor allem bei niedrigen template-Konzentrationen empfohlen, welcher zu einer erneuten Homogenisierung der Reaktion führt (Piepenburg *et al.* 2006; Lillis *et al.* 2016). Lillis *et al.* (2016) konnten jedoch zeigen, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens auf 5  $\mu$ l die Notwendigkeit des zusätzlichen Mischschrittes eliminiert (Lillis *et al.* 2016). Wie in Kapitel ?? gezeigt, wurde das klassische Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l auf 6,5  $\mu$ l reduziert, was einem leicht höheren Volumen als dem vom Lillis *et al.* (2016) entspricht. Beim Vergleich der Mischzeit in Bezug auf das unterschiedliche Volumen stellt sich heraus, dass der Mischschritt bei der low-volume RPA einen deutlichen Einfluss bei erst  $10^1$  RNA-Kopien ausübt (siehe Abbildung ??) und die maximale Fluoreszenz und die Anzahl der positiven Amplifikationen von 3/7 auf 7/7 verbessert. Im 50  $\mu$ l Ansatz hingegen kann schon eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenz und eine signifikante Verbesserung des TT-Wertes bei  $10^4$  RNA-Kopien beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden dass eine Volumenreduzierung, den Einfluss des Mischschrittes minimiert, dieser jedoch entgegen der Beobachtungen von Lillis *et al.* (2016) bei niedrigen RNA-Konzentrationen ( $10^1$  und  $10^0$ ) immer noch essentiell ist und zu deutlichen Verbesserungen der RPA führt. Lillis *et al.* (2016) arbeiteten allerdings mit einer geringeren Volumen (5  $\mu$ l zu 6,5  $\mu$ l) und ohne Mineralöl-Überschichtung, welches die Vergleichbarkeit schwierig macht. Es kann jedoch anhand den Daten in der vorliegenden Arbeit und den von Lillis *et al.* (2016) festgestellt werden, dass eine Verringerung des Reaktionsvolumen die Notwendigkeit des Mischschrittes bei höheren Konzentrationen ( $10^4$  und  $10^3$ ) vermutlich eliminiert (Lillis *et al.* 2016). Eine mögliche Begründung liegt darin, dass einerseits durch das verringerte Volumen ein größeres Verhältnis zwischen hinzugefügter Probe und Reaktionsmix besteht und dadurch eine bessere Diffusion zwischen Probe und Reaktionsmix stattfindet. Andererseits führt das geringere Volumen zu einem größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis, welches zu einer besseren Wärmeübertragung und dementsprechend einer stärkeren Konvektion führt (Böckh & Wetzel 2017).

Des Weiteren zeigt die low-volume Influenza B RT-RPA, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens zu einer Sensitivitätserhöhung von über 50 % führt. Ein ähnlicher Effekt konnte, wenn auch nicht in dieser

Ausprägung, ebenfalls durch Lillis *et al.* (2016) nachgewiesen werden (Lillis *et al.* 2016). Die Sensitivitätsverbesserung lässt sich eventuell durch das erhöhte Verhältnis zwischen eingesetzter Probe und RPA-Reaktion sowie der erhöhten Konvektion erklären. Diese führen zu einer besseren Diffusion innerhalb der Reaktion und können somit die Amplifikation positiv beeinflussen.

Der low-volume RT-RPA Ansatz bietet den Vorteil einer Kostenreduzierung, da mit einer kommerziell erhältlichen RT-RPA-Reaktion acht Tests durchgeführt werden können. Dies macht die low-volume RPA gerade für Ressourcen limitierte Umgebungen attraktiv, da sie geringe Kosten pro Test zusammen mit einer möglichen Sensitivitätserhöhung kombiniert (Lillis *et al.* 2016; Jiang *et al.* 2021). Zusätzlich eignet sich das verringerte Reaktionsvolumen von 6,5 µl für den Einsatz in mikrofluidischen Lab-on-a-chip Systemen, die mit 3D-gedruckten Detektionschips kombiniert werden könnten (Behrmann, Hügler, *et al.* 2020). Dadurch erweitern sich ihre Applikationsmöglichkeiten in der POCT und Testsysteme können vereinfacht und verbessert werden (Behrmann, Bachmann, *et al.* 2020).

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

Bisher konnten der low-Volume Ansatz nur bei der Influenza B RT-RPA im Zusammenhang mit der eingeführten Primerasymmetrie optimiert werden. Ein Transfer des low-volume RPA-Ansatzes auf die Influenza A RT-RPA konnte im ersten Herangehen nicht erreicht werden, da höhere TT-Werte und einen linear erscheinenden Amplifikationsverlauf, welcher auf eine schlechte Kinetik deutet, als nachteilig eingestuft wurden. Dementsprechend lässt sich vermuten, dass die low-volume RPA nicht für alle RT-RPA-Assays adaptierbar ist und somit die Applikation eingeschränkt werden könnte. Des Weiteren wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens in der Literatur nur bei RT-RPA's zur Detektion von RNA-Viren beschrieben (Lillis *et al.* 2016; Behrmann, Bachmann, *et al.* 2020), wodurch eine Adaption auf DNA basierte RPA's noch nicht untersucht ist.

### 1.3 Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays

Das analytische Detektionslimit der optimierten RT-RPA für den Influenza B Virus liegt in der klassischen RPA (50 µl) bei 31,6 bzw. im low-volume Ansatz (6,5 µl) bei 14,6 RNA-Kopien (Tabelle ??). Im Vergleich zu der getesteten RT-PCR vom NCIRD (2021) konnte eine Differenz von nur 3 Kopien zum low-volume Ansatz festgestellt werden. Somit liegen beide Detektionslimits in der gleichen Größenordnung. Bei dem Vergleich mit anderen RT-PCR Systemen, welche in der Literatur beschrieben sind, liegt das analytische Detektionslimit der RT-RPA eine Größenordnung unter den der RT-PCR (Wu *et al.* 2008; Ni *et al.* 2021). Somit besitzt die entwickelte und für den low-volume Ansatz optimierte Influenza B RT-RPA eine vergleichbare bzw. niedrigere analytische Sensitivität wie die RT-PCR als Goldstandard in der Diagnostik. Beim Vergleich mit einer RT-RPA von Liang *et al.* (2022) konnte ein ähnliches Detektionslimit ermittelt werden, da beide Systeme einzelne RNA-Moleküle detektieren können (Abbildung ??D) (Liang *et al.* 2022).

Die optimierte Influenza A RT-RPA differenziert im Vergleich zur Influenza B RT-RPA in *puncto* Sensitivität mit der untersuchten Influenza A RT-PCR (siehe Tabelle ??). Sie zeigt eine deutlich höhere analytische Sensitivität und liegt im Vergleich zur Literatur rund 10 - 100 mal über den Detektionslimits von PCR- und

RPA-Assays (Wu *et al.* 2008; Ni *et al.* 2021; Liang *et al.* 2022). Die vergleichsweise niedrige Sensitivität der hier weiterentwickelten Influenza A RT-RPA lässt sich möglicherweise wie in 1.1 diskutiert durch die erhöhte Anzahl an Basenfehlpaarungen in Primern und Sonde oder die eventuelle Bildung von Sekundärstrukturen erklären.

Bei der Zugabe sogenannter „background“ Nukleinsäure (Abschnitt ??) zum Reaktionsgemisch, zur Simulation einer potentiellen Patientenprobe, konnte eine deutlichen Verringerung in der low-volume Influenza B RT-RPA (siehe Tabelle ??) beobachtet werden, während die Influenza A RT-RPA keine Reduktion aufweist (siehe Tabelle ??). Eine Erklärung könnte die unterschiedlichen Reaktionsvolumina der verschiedenen RT-RPA-Assays zusammen mit dem eingeführten humanen Hintergrund liegen. Wie in 1.2 erwähnt, können große Mengen an genomischer DNA die RPA inhibieren. Dabei hängt die Inhibierung neben der Konzentration der genomischen DNA auch von der Konzentration des eingesetzten zu amplifizierenden Materials ab (Rohrman & Richards-Kortum 2015). Da innerhalb der verwendeten Nukleinsäure-Extraktionsmethode kein DNase-Verdau Schritt durchgeführt wird (QIAGEN 2020) bleibt die genomische DNA in den Extrakten erhalten. Durch das geringere Volumen des low-volume Ansatzes (6,5 µl) und dem gleichbleibendem Volumen der eingesetzten Probe könnte durch das höhere Proben-Reaktions-Verhältnis (1 µl Probe auf 5,5 µl Reaktion) eine geringere Menge an Hintergrund-DNA benötigt werden um die Reaktion zu inhibieren. Im Gegensatz dazu ist bei der klassischen RPA ein deutlich geringeres Proben-Reaktions-Verhältnis (1 µl Probe auf 49 µl Reaktion) vorhanden, wodurch im Endeffekt eine geringere Hintergrund-DNA Konzentration in dem 50 µl Ansatz-Volumen vorhanden ist. Der Arbeit von Rohrman & Richards-Kortum (2015) zufolge sorgt eine eingebrachte DNA-Konzentration von 500 ng in der klassischen RPA bei einer Template-Konzentrationen von  $10^2$  RNA-Kopien für eine komplette Inhibierung der Detektion (Rohrman & Richards-Kortum 2015). Rechnet man die für die Inhibierung benötigte Konzentration der genomischen DNA auf das Reaktionsvolumen des low-volume Ansatz runter, würden 62,5 ng ausreichen, um eine vollständige Inhibierung auszulösen. Die ermittelte DNA-Konzentration der Referenzproben liegt bei rund 45 ng/µl (Kapitel ??) und somit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Eine Inhibierung der RPA im low-volume Ansatz bei niedrigen Kopien-Anzahlen scheint daher plausibel.

Eine mögliche Erklärung für die Inhibierung bzw. Reduktion der RPA-Reaktion bei hohen Hintergrund-DNA Konzentrationen wären unspezifische Primer- oder Sonden-Hybridisierungen. Da die RPA an sich mit moderaten Temperaturen von 38 °C - 44 °C funktioniert, welche deutlich unter den Hybridisierungstemperaturen der PCR liegen, begünstigt das unspezifische Hybridisierungen der Primer bzw. Sonden (Ruiz-Villalba *et al.* 2017). Dadurch würden diese für die eigentliche Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Dieser Effekt würde dabei stark von der Konzentration der Ziel-DNA abhängig sein, da höhere Template-Konzentrationen bei gleichbleibenden genomischen Hintergrund zu einer höheren Wahrscheinlichkeit einer spezifische Primer-Bindung führen. Dieser Zusammenhang wurde von Rohrman & Richards-Kortum (2015) beobachtet, welches die Hypothese bekräftigt. Eine Erhöhung der Primer- bzw. Sonden-Konzentration könnte für spezifischere Bindungen und somit bessere Amplifikation auch in hohen genomischen DNA-Konzentration sorgen, jedoch müsste dies in einer weiteren Versuchsreihe untersucht werden und war nicht Teil dieser Arbeit.

Die in der Literatur beschriebenen Viruslasten für die Ziel-Influenza A Subtypen liegen bei allen Altersgruppen im Mittelwert bei rund  $3,2 \cdot 10^3$  Virus Kopien/µl VTM (Virus Transport Medium, H1N1) und  $2,0 \cdot 10^3$  Virus Kopien/µl VTM (H3N2) (Ngaosuwanikul *et al.* 2010; Alves *et al.* 2020) wobei eine Ausnahme die Patientengruppe unter zwei Jahren mit  $4,7 \cdot 10^2$  Virus Kopien/µl VTM (H1N1) bildet (Alves *et al.* 2020). Die beste Entnahmemethode sind dabei Nasopharyngeal-Abstriche, welche im Durchschnitt  $1,0 \cdot 10^5$  Virus Kopien/µl VTM enthalten, während Nasal-Abstriche mit  $6,3 \cdot 10^3$  Virus Kopien/µl VTM und Rachen-Abstriche mit



$2,5 \cdot 10^3$  Virus Kopien/ $\mu$ l VTM deutlich geringere Viruslasten aufweisen Ngaosuwanikul *et al.* (2010). Die für die Influenza A ermittelte Sensitivität in den simulierten Referenzproben könnte mit einem Detektionslimit von 147,5 RNA-Kopien für beide Subtypen (Tabelle ??) laut Literatur alle Proben Detektieren. Eventuelle Komplikationen könnten bei Patienten unter zwei Jahren aufkommen, da die Viruslast nahe an der Detektionsgrenze liegt. Für eine sichere Detektion ist generell ein nasopharyngealer Abstrich zu empfehlen, da dieser die größte Viruslast aufweist und damit falsch negative Ergebnisse am ehesten vermieden werden können. Für Influenza B konnte in einer Studie von Alves *et al.* (2020) eine durchschnittliche Viruslast in allen Altersgruppen von rund  $3,2 \cdot 10^3$  Virus Kopien/ $\mu$ l VTM festgestellt werden. Ausnahme bildeten dabei Patienten über 59 Jahren, da hier nur ein Datensatz verfügbar war und somit keine einheitliche Aussage getätigt werden konnte (Alves *et al.* 2020). Eine andere Studie von Tsou *et al.* (2012) untersuchte die Viruslast speziell bei Kindern und konnte im Durchschnitt sehr geringe Werte von 3,9 Virus Kopien/ $\mu$ l VTM feststellen. Jedoch wurden innerhalb dieser Studie große Schwankungen innerhalb der Viruslast festgestellt (zwischen 45 und  $2 \cdot 10^6$  Virus Kopien/ml VTM) sowie eine negative Korrelation zwischen Viruslast und Zeitpunkt der Probenentnahme (Tsou *et al.* 2012). Das ermittelte Detektionslimit für die Influenza B RT-RPA unter Verwendung der reinen, artifiziellen Standard RNA wäre mit 14,6 RNA-Kopien (Tabelle ??) in der Lage die meisten Patientenproben zu detektieren. Betrachtet man jedoch den starken Verlust der Sensitivität bei den Referenzproben mit genomischer humaner Hintergrund DNA könnten mögliche falsch Negative gerade bei Kinderpatienten auftreten. Hier liegt das ermittelte Detektionslimit von 1397 RNA-Kopien (Tabelle ??) weit über der von Tsou *et al.* (2012) ermittelten Viruslast für das Influenza B Virus. Nach Alves *et al.* (2020) könnten zwar alle Patienten, inklusive der Patienten unter zwei Jahren, detektiert werden, jedoch befindet sich hier die Viruslast am Detektionslimit. Generell lässt sich sagen, dass die entwickelte Influenza B RT-RPA laut Literatur ein zu hohes Detektionslimit besitzt um zuverlässig Influenza B detektieren zu können. Um trotzdem eine eventuelle Detektion zu ermöglichen, sollte eine zeitnahe Probenentnahme erfolgen, um so möglichst hohe Viruslasten zu erreichen (Tsou *et al.* 2012).

## 1.4 Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA

Eine asymmetrische Erhöhung der reverse Primer-Konzentration bei einer gleichbleibenden Forward Primer-Konzentration führt zu einer erhöhten Fluoreszenz (Kapitel ??). Wie bereits beschrieben, sorgt die asymmetrische Verteilung der Primer vermutlich dazu, dass im Verlauf der Reaktion mehr einzelsträngige DNA in sense entsteht, wenn der reverse-Primer (antisense) in deutlich höheren Konzentration der Reaktion zur Verfügung steht. Der asymmetrische Ansatz innerhalb RPA wurde bereits von Wang *et al.* (2019) genutzt, um mittels eines enzymkatalysiertem Farbumschlags *Fusarium proliferatum* nachzuweisen (Wang *et al.* 2019). Kersting *et al.* (2014) kombinierte die asymmetrische RPA, um mit der entstandenen einzelsträngigen DNA ein Nachweis mittels Microarray durchzuführen (Kersting *et al.* 2014). Derzeit ist die Verwendung einer asymmetrischen Primerverteilung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sonden in der Literatur nur innerhalb der qPCR bekannt. So konnte Poddar (2000) mithilfe von „*molecular beacon*“ nachweisen, dass durch eine 50-fache Primerasymmetrie, die zur Sonde komplementäre DNA-Sequenz zusätzlich als einzelsträngige DNA in höheren Mengen vorliegt. Dadurch konnten die „*molecular beacon*“ häufiger hybridisieren und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen (Poddar 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte vermutlich, dass das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RPA mittels Exo-Sonden angewendet werden. Die Experimente mit der RT-RPA für Influenza B legen dies nahe (Kapitel ??). So kann durch die asymmetrische Erhöhung des Reverse-Primers eine höhere Fluoreszenzauslenkung beobachtet werden. Die Erhöhung des Forward Primers (sense) (Abbildung ??A) führte wieder

zu einer aequimolaren, jedoch im Vergleich zur Standard-RPA erhöhten Primerkonzentration. Dadurch wurde vermutlich keine einzelsträngige sense DNA in der Reaktion gebildet und die Hybridisierungskinetik der Sonde wurde nicht erhöht. Dementsprechend ist auch ein Rückgang an Fluoreszenzsignal zu beobachten, da die Sonde zur Spaltung durch die Exonuklease ein Hybridisierungs-Event benötigt, welches nur noch während der Amplifikations-Reaktion der RPA stattfindet (Lobato & OSullivan 2018). In diesem Versuchsansatz muss jedoch noch zusätzlich die Reaktion der reversen Transkriptase betrachtet werden, da diese mit einer eigenen Enzymkinetik zur Bildung einer komplementären DNA bei einer sense RNA den antisense (reverse) Primer für seine Reaktion nutzt. Um diesen Einfluss auszuschließen wurde ein *vice versa* Versuch den sense Primer betreffend durchgeführt (Abbildung ??B). In diesem konnte durch die Verwendung der antisense Sonde (Tabelle ??), welche komplementär zum antisense Strang ist, gezeigt werden, dass nun eine Fluoreszenzsignalerhöhung stattfindet, wenn der forward (antisense) Primer asymmetrisch Erhöht wird. Des Weiteren konnte ein schwächeres Fluoreszenzsignal beobachtet werden wenn eine reverse Primerasymmetrie vorhanden ist. Dementsprechend liegt vermutlich bei der Erhöhung des forward primers der komplementäre antisense Strang vermehrt und einzelsträngig vor, wodurch die Hybridisationskinetik der Sonde begünstigt wird und mehr Sonde bei erfolgreicher Hybridisation gespalten wird. Dabei sind die Ergebnisse der Fluoreszenzerhöhung bezüglich der Primerasymmetrie für die beiden getesteten Sonden umgekehrt. So führt bei der sense Sonde eine reverse Primerasymmetrie und bei der antisense Sonde eine forward Primerasymmetrie zu einem erhöhtem Fluoreszenzsignal. Daraus lässt sich Ableiten, dass die Hybridisierungsposition der Sonde (sense oder antisense) mit der Primerasymmetrie zusammenhängt.

Die Primerasymmetrie konnte auf die Influenza A RT-RPA übertragen werden, wo ebenfalls eine Fluoreszenzerhöhung zu beobachten war. Dementsprechend besitzt die Primerasymmetrie das Potenzial auch auf andere Systeme angewendet zu werden.

## 1.5 Einfluss von Modifikationen der Exo-Sonde auf die RT-RPA

Die Sondenmodifikation der Exo-Sonde für die RPA unterliegt hinsichtlich Fluorophor- und Quencher-Position bestimmten Sequenz-Limitationen. So ist eine Kopplung des Fluorophors beziehungsweise des Quenchers an die Purin-Basen (Adenin A, Guanin G) ungünstig, da die Kopplung theoretisch an der 8'-Position der Base erfolgt und so das Nukleosid in eine Syn-Konformation gezwungen würde. Dadurch kommt es zu einer Störung der Watson und Crick Basenpaarung, was die Hybridisierung der Sonde erschwert (Wagenknecht 2008). Eine Kopplung an die Purin-Basen (Cytosin C, Thymin T) ist vorzuziehen, da es hier zu einer geringeren Beeinträchtigung kommt. Hierbei erfolgt die Kopplung an die 5'-Position, wodurch die Konformation des Nukleosids weitestgehend nicht beeinträchtigt wird. Sterische Hinderung zwischen Fluorophor und DNA können jedoch bei beiden Kopplungspositionen nicht ausgeschlossen werden (Wagenknecht 2008). Der Stand der Technik beschränkt sich im Moment auf T-gekoppelte Quencher und Sonden (TwistDx 2018; Faye *et al.* 2021; Guo *et al.* 2022). Die Nutzung des FRET-Mechanismus zur Detektion hängt sehr stark von der Distanz zwischen Quencher und Fluorophor ab (Johansson & Cook 2003). Daher benötigt die klassische RPA Sondensequenz dementsprechend zwei dicht nebeneinander liegende Thymin-Nukleotide. Die Anforderungen an die Sondensequenz ist weiterhin erhöht durch das zusätzliche Einbringen einer a-basische Seite und der Fluorophorposition. Letztere sollte nach der Literatur bei rund 30+ bp liegen (Lobato & OSullivan 2018). So benötigt die Sonde bei rund 30 bp eine T-N-T Sequenz (N = beliebiges Nukleotid), wodurch die Auswahl der Sondenposition in den meisten Fällen deutlich eingeschränkt wird. Um diesem Problem zu entgehen, entwickelten Behrmann, Bachmann, *et al.* (2020) die *iQ*-Sonde, bei der das Quencher-Molekül an das Phosphat-Rückgrat der DNA gekoppelt wird (Abbildung ??) und somit die starke Abhängigkeit von der



T-N-T Sequenz umgangen wird. Somit können Exo-Sonden variabler an die Zielsequenz angepasst werden (Behrmann, Bachmann, *et al.* 2020). In dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede innerhalb der asymmetrischen Influenza A RT-RPA zwischen den beiden Sondentypen *iQ*-Sonde und *dT-Quenched*-Sonde ermittelt werden (Kapitel ??). So führt die *dT-Quenched*-Sonde im Vergleich zu der *iQ*-Sonde zu einer Sensitivitätserhöhung von 50 % für beide Subtypen sowie ein erhöhte Fluoreszenzauslenkung. Des Weiteren besitzt die *iQ*-Sonde nach der Normalisierung der Daten ein niedriges Hintergrundrauschen um den Wert 0, während die *iQ*-Sonde ein stetiges Hintergrundrauschen um die 50 Fluoreszenzeinheiten zeigte. Das unspezifische Hintergrundrauschen der *iQ*-Sonde ist dabei bei allen durchgeführten RT-RPA's in dieser Arbeit zu beobachten. Eine weitere Versuchsreihe mit der Influenza B RT-RPA war durch die speziellen Sequenz-Anforderungen der *dT-Quenched*-Sonde nicht durchführbar.

Eine mögliche Hypothese für die höhere Fluoreszenzauslenkung und der Sensitivität der *dT-Quenched*-Sonde könnte im Zusammenhang mit der verwendeten Primerasymmetrie liegen. Durch die eingeführte Primerasymmetrie liegt der zur Sonde komplementäre DNA-Strang einzelsträngig vor (Kersting *et al.* 2014). Dementsprechend könnte die Sonde unabhängig von der Strangverdrängungsaktivität der Polymerase hybridisieren und im hybridisierten Zustand von der Exonuklease gespalten werden (Lobato & OSullivan 2018). Nach der Spaltung würde keine Verdrängung durch die Polymerase stattfinden und die Sonden-Fragmente müssen sich durch Diffusion voneinander trennen. Durch den dT-gekoppelten Quencher könnte im hybridisierten Zustand der Sonde eine sterische Abstoßung zwischen Quencher, Fluorophor und gegenüberliegender A Base bestehen. Bei der Spaltung der Sonde könnte diese sterische Abstoßung für eine bessere Diffusion des Quenchers von dem Fluorophor sorgen was möglicherweise zu einem erhöhtem Signal und zu einer besseren Detektion führt. Laut dieser Hypothese würde bei der von Behrmann, Bachmann, *et al.* (2020) entwickelten *iQ*-Sonde keine solche Abstoßung vorliegen, da der Quencher über das Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA gekoppelt ist und somit eventuell außerhalb der Doppelhelix liegt. Betrachtet man die mittlere Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Quencher-Fragments der Influenza A Sonde (Sonde E, Tabelle ??) liegt diese bei 53 °C (berechnet mittels Promega  $T_m$ -Rechner<sup>1</sup>). Dementsprechend würde nach der Spaltung der Sonde die Diffusion des Quencher-Fragments ohne weitere Abstoßungseffekte bei der gewählten Reaktionstemperatur von 42 °C geringer sein.

Das beobachtete geringere Signal-Rauschen der Wasserkontrolle der *dT-Quenched*-Sonde lässt sich vermutlich auf den erhöhten Abstand zwischen Fluorophor und Quencher zurückführen. Wie in der von Förster (1948) entwickelten Formel zu sehen, ist die Energie-Übertragungsrate ( $F_{kl}$ ) von der Fluoreszenzabklingzeit ( $\tau_0$ ), dem Förster-Radius ( $R_0$ ) und dem Abstand zwischen Fluorophor und Quencher ( $R_{kl}$ ) abhängig (siehe Formel (1)).  $R_0$  ist dabei für verschiedene Fluorophorpaare unterschiedlich und wird zur Vereinfachung  $R_0 = 1$  gesetzt (Förster 1948).

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

Dadurch wird die sehr starke Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Fluorophor und Quencher verdeutlicht. Dementsprechend können kleine Veränderungen des Abstandes zu einem deutlich schlechteren Energietransfer, also zu einem schlechteren Fluoreszenz-Quenching führen. Da die *dT-Quenched*-Sonde durch die dT-Kopplung von Fluorophor und Quencher eventuell beide Moleküle näher zusammenbringt als es bei der *iQ*-Sonde der Fall ist, könnte demnach ein besseres Quenching des Fluoreszenzsignals stattfinden. Dieses

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

drückt sich in dem in Abbildung ?? beobachteten geringeren Hintergrund-Signal aus.

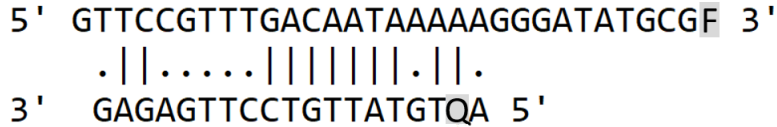
## 1.6 Der “Ditching”-Effekt innerhalb der RT-RPA

Die spontane Abnahme des Fluoreszenzsignals ab im späteren Verlauf der Messung konnte an mehreren Stellen dieser Arbeit beobachtet werden (Abbildungen ??, ??B, ??A, ??B, ??B). Dabei scheint dieses Phänomen speziell innerhalb der RPA aufzutreten und wurde, laut aktueller Literaturlage, weder bei der PCR noch innerhalb anderen isothermen Amplifikationen (LAMP, NASBA etc.) beobachtet. Lutz *et al.* (2010) beschrieben dieses Phänomen innerhalb der RPA als Ditching, lieferten jedoch keine weiteren Erklärungen zu dem Sachverhalt (Lutz *et al.* 2010). Das Ditching scheint dem theoretisch ablaufendem Reaktionsverlauf zu widersprechen. Durch die Spaltung der Fluoreszenzsonden werden immer mehr Quencher-Fragmente von den Fluorophor-Fragmenten räumlich voneinander getrennt wodurch mehr Fluoreszenz-Signal detektierbar ist. Nach einiger Zeit sind wichtige Substrate verbraucht, die Reaktion kommt zum Erliegen und das Fluoreszenz-Signal erreicht ein Plateau (Moody *et al.* 2016). Beim Ditching hingegen scheint sich das Fluoreszenz-Signal sogar zu verringern, d.h die Fluoreszenz sinkt unterhalb des Levels der zuvor gemessenen Intensität, und steigt nach kurzer Zeit darauf wieder an.

Eine mögliche Erklärung für die Verminderung des Fluoreszenz-Signals könnten die erneute räumliche Annäherung von Fluorophor und Quencher sein. Dadurch würde der FRET-Effekt wieder einsetzen, welcher das Fluoreszenzsignal unterbindet. Dies könnte einerseits durch die erschwerte Diffusion, hervorgerufen durch den im Reaktionsmix enthaltenen “*crowding-agent*”, zu erklären sein. Dieses könnte den Effekt haben, dass die Diffusion zwischen Fluorophor und Quencher eingeschränkt wird und dadurch im späteren Reaktionsverlauf eine erneute Annäherung zwischen den Quencher- und Fluorophor-Molekülen stattfindet.

Andererseits könnte eine Hybridisierung des Fluorophor-Fragmentes mit dem Quencher-Fragmente der Sonde erfolgen (Abbildung 2), welche das Fluorophor-Molekül mit dem Quencher-Molekül wieder in räumliche Nähe bringt. Jedoch besitzt dieses Dimer eine Bindungsenergie ( $\Delta G$ ) von nur -2,48 kcal/mol bei 37 °C und ist demnach bei 40 °C nicht sonderlich stabil (Abbildung 2). Des Weiteren liegen Quencher und Fluorophor innerhalb des Dimers etliche Nukleotide voneinander entfernt, welches die Energie-Übertragungsrate durch die Entfernung verringert und somit das Quenching erschwert. Eine weitere Eigenart liegt in der erneuten Steigung der Fluoreszenz. Dies könnte bedeuten, dass die Zusammenlagerung von Quencher und Fluorophor reversibel und zeitabhängig, für nur einen kurzen Zeitraum stattfindet.

Des Weiteren wurde das Ditching innerhalb der Variation der Reaktionsparameter nur bei den höheren Temperaturen, einer höheren Primerasymmetrie und den als optimal ermittelten Mischschritt beobachtet (Kapitel ??, ?? und ??). Wie in Kapitel 1.4 erklärt, führt die Primerasymmetrie dazu, dass mehr Sonde gespalten wird. Ähnlich wie bei der Primerasymmetrie sorgt eine höhere Temperatur, durch die verbesserte Enzymkinetik (Jaeger *et al.* (Anon. 2018)) vermutlich zu einer schnelleren Amplifikation und somit zu einer erhöhten Spaltung der Sonde. Der zusätzliche Mischschritt beschleunigt durch die Homogenisierung ebenfalls die Reaktion und führt wie die anderen Parameter zu einer schnelleren Sondenspaltung. Dementsprechend könnte es einen Zusammenhang zwischen der Menge der gespaltenen Sonde und dem Ditching zu geben.



$$\Delta G \text{ } 37^{\circ}\text{C} \text{ } -2,48 \text{ kcal/mol}$$

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

## 1.7 Automatische Auswertung der Amplifikationen mittels Statistik

Anahnd der Untersuchung der Primer und Sonden-Kandidaten für die Influenza A RT-RPA (Abbildung ??) und der Influenza B RT-RPA Mischschritt-Optimierung (Abbildung ??C) konnte aufgezeigt werden, dass die manuelle Einschätzung, ob Amplifikationen qualitativ positiv bzw. negativ sind, schwierig ist. Dies kann zu Komplikationen führen, da je nach Anwender Grenzfälle ein- bzw. ausgeschlossen werden und somit falsch positive und falsch negative Testergebnisse entstehen. Eine automatisierte statistische Auswertung soll die Anwendung unterstützen und für einheitliche Ergebnisse sorgen. Innerhalb der qPCR und RPA wird dafür zumeist ein Schwellenwert verwendet, wobei Reaktionen als positiv gelten, wenn sie diesen Schwellenwert überschreiten (Bustin *et al.* 2009). Jedoch hängt diese Auswertungsmethode stark von der Wahl des Schwellenwerts ab, welcher je nach verwendetem Gerät und Hersteller anders berechnet bzw. bestimmt wird (Waidi Folorusno Sule 2020). Zusätzlich kann die Fluoreszenzkurve einer Amplifikation von weiteren Zufallsfaktoren wie beispielsweise verschieden starke Fluorophore oder Sensorfehlern beeinflusst werden (Spiess *et al.* 2015). Dies kann dazu führen, dass starke Veränderungen des Schwellenwertes entstehen und aufgrund dessen je nach Gerät und Test unterschiedliche Ergebnisse entstehen und keine Vergleichbarkeit der Daten untereinander gegeben ist. In dieser Arbeit wurde dazu eine automatische Auswertung der Fluoreszenzdaten mit weiteren statistischen Tests, unabhängig vom Schwellenwert ergänzt und damit eine einheitliche, vergleichbare und nachvollziehbare Auswertung ermöglicht. Dazu wurde das chipPCR package von Rödiger *et al.* (2015) verwendet, das ursprünglich für eine qPCR entwickelt wurde, jedoch auch für isotherme Amplifikationen beschrieben wurde (Rödiger *et al.* 2015). Eine Anwendungslimitierung wurde Moody *et al.* (2016) festgestellt, die bewiesen, dass sich die Kinetik der RPA von der der PCR unterscheidet (Moody *et al.* 2016). Demnach ist die Kinetik der Fluoreszenzgenerierung ebenfalls unterschiedlich zur PCR und die mathematischen Modelle, angepasst auf die PCR, lassen sich nur bedingt auf die RPA adaptieren. So konnte die Berechnung des Hintergrundrauschens nicht mit dem chipPCR package durchgeführt werden, da der zeitigere Anstieg der RPA bei hohen Template-Konzentrationen dazu führte, dass das Hintergrundrauschen zu hoch berechnet wurde und über der maximalen Fluoreszenzauslenkung lag. Deshalb wurde die Methode von Ritz & Spiess (2008) als Alternative verwendet. Der im chipPCR package enthaltene *lineare Regressions-Test*, welcher viele lineare Regressionen über die jeweilige Amplifikationskurve spannt und diese auswertet, lieferte fehlerhafte Ergebnisse und konnte deshalb hier nicht verwendet. Für die Berechnung eines geeigneten Schwellenwertes wurde auf eine Methode aus dem Immuno-Assay-Bereich von Frey *et al.* (1998) zurückgegriffen, da sie die gesamten Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle zur Berechnung benutzt und somit das in Kapitel 1.5 beschriebene steigende Hintergrundsignal der *iQ*-Sonde mit einberechnet (Frey *et al.* 1998).

## 2 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Pan-Influenza B RT-RPA sowie eine RT-RPA für den Nachweis der H1N1 und H3N2 Influenza A Subtypen entwickelt werden. Dabei konnte die Influenza B RT-RPA auf den low-volume Ansatz adaptiert werden, während dies bei der Influenza A RT-RPA aufgrund der überwiegenden Nachteile nicht möglich war. Es konnten anhand der Influenza RT-RPA einige Vorteile des low-Volume Ansatzes wie eine gesteigerte Unabhängigkeit des Mischschrittes sowie eine analytische Sensitivitätserhöhung beobachtet werden. Jedoch zeigte der low-volume Ansatz eine starke Reduzierung des Detektionslimits bei den eingeführten Referenzproben, welches eventuell an der erhöhten Hintergrund DNA-Konzentration in dem geringeren Ansatzvolumen liegt. Dementsprechend müsste der Einsatz des low-volume Ansatz für die POCT innerhalb eines *lab on a chip* System weiter untersucht werden und die Vorteile und Nachteile des geringeren Reaktionsvolumen in systematischen Versuchsreihen weiter bestätigt werden. Diese Beobachtungen könnten aufgrund eines höheren Volumenverhältnis zwischen Probe und Reaktion sowie einer gesteigerten Konvektion zurückzuführen sein. Allerdings müsste die aufgestellten Hypothesen in weiteren Experimenten bestätigt oder entkräftet werden.

Aufgrund des hohen Sensitivitätsverlusts der Influenza B RT-RPA bei Referenzproben im low-volume Ansatz könnte es zu Komplikationen bei der Detektion der Influenzaviren in Patientenproben kommen. Hier ist eine weitere Optimierung nötig, sowie eine weitere Sensitivitätsmessung im 50  $\mu$ l Ansatz um eine eventuelle Sensitivitätserhöhung innerhalb der Referenzproben zu erreichen. Des Weiteren müssten Tests mit realen Patientenproben erfolgen, um die Leistung der Influenza B RT-RPA zu evaluieren.

Die entwickelte Influenza A RT-RPA liegt in der analytischen Sensitivität hinter der Influenza B RT-RPA unterliegt jedoch keiner Sensitivitätsminderung innerhalb von Referenzproben und könnte somit vermutlich die meisten Patientenproben detektieren. Komplikationen könnten bei Kindern unter zwei Jahren auftreten, da diese laut Literatur die geringste Viruslast aufwiesen. Dieses müsste jedoch mit realen Patientenproben bestätigt werden und die Influenza A RT-RPA unter klinischen Bedingungen getestet werden. Als mögliche Verbesserung der Influenza A RT-RPA könnten jeweils ein Primerpaar für den H1N1 und H3N2 Subtyp mit der Sonde E kombiniert werden um die Basenfehlpaarungen in den Primern zu vermeiden und somit höhere Sensitivitäten zu erreichen. Des Weiteren könnte eine Adaption auf den low-volume Ansatz weitere Vorteile bringen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Primerasymmetrie zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führt und dabei Abhängig von der Hybridisierungsposition der Sonde ist. Eine mögliche Erklärung könnte die erhöhte Hybridisierungskinetik der Sonde an die, durch die asymmetrie vorliegende, einzelsträngige DNA sein. Jedoch müsste diese Hypothese in weiteren Experimenten bestätigt werden. Die Primerasymmetrie konnte ebenfalls auf die Influenza A RT-RPA angewendet werden und könnte somit potenziell auch auf andere RPA-Systeme zur Fluoreszenzerhöhung übertragen werden. Um dies zu bestätigen müssten weitere Messreihen mit anderen RPA-Systemen durchgeführt werden um eine generelle Aussage treffen zu können. Innerhalb der RT-RPA wurde in verschiedenen Messreihen in dieser Arbeit ein Ditching beobachtet. Die Beobachtungen legen nahe, dass das Ditching im Zusammenhang der Menge der gespaltenen Sonde steht. Jedoch müsste dies in weiteren Experimenten bestätigt werden und generell die Faktoren, welche das Ditching beeinflussen genauer untersucht werden. Der genaue physikalische und molekulare Mechanismus des Ditching bleibt weiterhin unbekannt und müsste weiter untersucht werden. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit ein Unterschied zwischen der *iQ*- und der *dT-quenched*-Sondenmodifikation am Beispiel der Influenza A RT-RPA festgestellt werden. So führte die *dT-quenched*-Sonde zu einer erhöhten Sensitivität und Fluoreszenzauslenkung. Um die festgestellten Sondenunterschiede weiter zu beurteilen müssten weitere Vergleich

der beiden Sondentypen durchgeführt werden, um eine generelle Aussage treffen zu können.

- Alves V.R.G., Perosa A.H., Souza Luna L.K. de, Cruz J.S., Conte D.D. & Bellei N. 2020. Influenza a(H1N1)pdm09 infection and viral load analysis in patients with different clinical presentations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200009>
- Behrmann O., Bachmann I., Spiegel M., Schramm M., Wahed A.A.E., Dobler G., Dame G. & Hufert F.T. 2020. Rapid detection of SARS-CoV-2 by low volume real-time single tube reverse transcription recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (exo-IQ). *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–1054. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>
- Behrmann O., Hügler M., Eckardt F., Bachmann I., Heller C., Schramm M., Turner C., Hufert F. & Dame G. 2020. 3D printed monolithic microreactors for real-time detection of *klebsiella pneumoniae* and the resistance gene blaNDM-1 by recombinase polymerase amplification. *Micromachines* 11 (6): 595. <https://doi.org/10.3390/mi11060595>
- Böckh P. von & Wetzel T. 2017. [Freie konvektion](#). In: *Wärmeübertragung*: 141–154. Springer Berlin Heidelberg.
- Boyle D.S., Lehman D.A., Lillis L., Peterson D., Singhal M., Armes N., Parker M., Piepenburg O. & Overbaugh J. 2013. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. & Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chen R. & Holmes E.C. 2008. The evolutionary dynamics of human influenza b virus. *Journal of Molecular Evolution* 66 (6): 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>
- Clancy E., Higgins O., Forrest M.S., Boo T.W., Cormican M., Barry T., Piepenburg O. & Smith T.J. 2015. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of *streptococcus pneumoniae* in whole blood. *BMC Infectious Diseases* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1212-5>
- Daher R.K., Stewart G., Boissinot M., Boudreau D.K. & Bergeron M.G. 2015. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology. *Molecular and Cellular Probes* 29 (2): 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.11.005>
- Daum L.T., Canas L.C., Arulanandam B.P., Niemeyer D., Valdes J.J. & Chambers J.P. 2007. Real-time RT-PCR assays for type and subtype detection of influenza a and b viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1 (4): 167–175. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2007.00024.x>
- Ehnts K.I. 2013. Entwicklung von rekombinase-polymerase-amplifikations-nachweisverfahren für virale erregere von atemwegsinfektionen. *Dissertation der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen*. <https://doi.org/10.53846/goediss-3943>
- Faye M., Wahed A.A.E., Faye O., Kissenkötter J., Hoffmann B., Sall A.A. & Faye O. 2021. A recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of rabies virus. *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82479-8>
- Förster Th. 1948. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437 (1-2):



- 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
- Frey A., Canzio J.D. & Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 221 (1-2): 35–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7)
- Goffard A., Beugin A.-S., Hober D., Ogiez J. & Dewilde A. 2008. Mise au point d’une technique de RT-PCR duplex en temps réel pour la détection des virus influenza a et b. *Pathologie Biologie* 56 (7-8): 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.07.030>
- Guo M., Feng P., Zhang L., Feng C., Fu J., Pu X. & Liu F. 2022. Rapid detection of *Clostridium tetani* by recombinase polymerase amplification using an exo probe. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (1): 91–98. <https://doi.org/10.4014/jmb.2109.09022>
- Higgins M., Stringer O.W., Ward D., Andrews J.M., Forrest M.S., Campino S. & Clark T.G. 2022. Characterizing the impact of primer-template mismatches on recombinase polymerase amplification. *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–1216. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005>
- Jaeger K.-E., Liese A. & Syldatk C. (eds) Anon. 2018. *Einführung in die Enzymtechnologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Jiang N., Tansukawat N.D., Gonzalez-Macia L., Ates H.C., Dincer C., Güder F., Tasoglu S. & Yetisen A.K. 2021. Low-cost optical assays for point-of-care diagnosis in resource-limited settings. *ACS Sensors* 6 (6): 2108–2124. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00669>
- Johansson M.K. & Cook R.M. 2003. Intramolecular dimers: A new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry - A European Journal* 9 (15): 3466–3471. <https://doi.org/10.1002/chem.200304941>
- Keresting S., Rausch V., Bier F.F. & Nickisch-Rosenegk M. von 2014. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Microchimica Acta* 181 (13-14): 1715–1723. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1198-5>
- Li J., Macdonald J. & Stetten F. von 2019. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *The Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>
- Liang L.-G., Zhu M., He R., Shi D.-R., Luo R., Ji J., Cheng L.-F., Lu X.-Y., Lu W., Liu F.-M., Wu Z.-G., Wu N.-P., Chen H., Chen Z. & Yao H.-P. 2022. Development of a multi-recombinase polymerase amplification assay for rapid identification of COVID-19, influenza a and b. *Journal of Medical Virology* 95 (1). <https://doi.org/10.1002/jmv.28139>
- Lillis L., Siverson J., Lee A., Cantera J., Parker M., Piepenburg O., Lehman D.A. & Boyle D.S. 2016. Factors influencing recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>
- Linhart C. & Shamir R. 2005. The degenerate primer design problem: Theory and applications. *Journal of Computational Biology* 12 (4): 431–456. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>
- Liu X., Yan Q., Huang J., Chen J., Guo Z., Liu Z., Cai L., Li R., Wang Y., Yang G. & Lan Q. 2019. Influence of design probe and sequence mismatches on the efficiency of fluorescent RPA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (6). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2620-2>
- Lobato I.M. & OSullivan C.K. 2018. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent

- advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
- Lutz S., Weber P., Focke M., Faltin B., Hoffmann J., Müller C., Mark D., Roth G., Munday P., Armes N., Piepenburg O., Zengerle R. & Stetten F. von 2010. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab on a Chip* 10 (7): 887. <https://doi.org/10.1039/b921140c>
- Marshall O.J. 2004. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20 (15): 2471–2472. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
- McCauley J.W. & Mahy B.W.J. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochemical Journal* 211 (2): 281–294. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>
- Modrow S., Falke D., Truyen U. & Schätzl H. 2010. *Molekulare virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moody C., Newell H. & Viljoen H. 2016. A mathematical model of recombinase polymerase amplification under continuously stirred conditions. *Biochemical Engineering Journal* 112: 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.017>
- NCIRD 2021. [National center for immunization and respiratory diseases \(u.s.\)](#). *Research use only CDC flu SC2 multiplex assay primers and probes*.
- Ngaosuwankul N., Noisumdaeng P., Komolsiri P., Pooruk P., Chokephaibulkit K., Chotpitayasunondh T., Sangsajja C., Chuchottaworn C., Farrar J. & Puthavathana P. 2010. Influenza a viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virology Journal* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/1743-422x-7-75>
- Ni M., Xu H., Luo J., Liu W. & Zhou D. 2021. Simultaneous detection and differentiation of SARS-CoV-2, influenza a virus and influenza b virus by one-step quadruplex real-time RT-PCR in patients with clinical manifestations. *International Journal of Infectious Diseases* 103: 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.027>
- Paterson R.G., Takeda M., Ohigashi Y., Pinto L.H. & Lamb R.A. 2003. Influenza b virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology* 306 (1): 7–17. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00083-1)
- Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L. & Armes N.A. 2006. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology* 4 (7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Poddar S. 2000. Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus. *Molecular and Cellular Probes* 14 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0278>
- QIAGEN 2020. [QIAamp® viral RNA mini handbook](#). *For purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids, and culture supernatants*.
- Ritz C. & Spiess A.-N. 2008. qpcR: An R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* 24 (13): 1549–1551. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn227>
- Rödiger S., Burdukiewicz M. & Schierack P. 2015. chipPCR: An R package to pre-process raw data of amplification curves: Fig. 1. *Bioinformatics* 31 (17): 2900–2902. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv205>

- Rohrman B. & Richards-Kortum R. 2015. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: A lateral flow-based method for enriching target DNA. *Analytical Chemistry* 87 (3): 1963–1967. <https://doi.org/10.1021/ac504365v>
- Ruiz-Villalba A., Pelt-Verkuil E. van, Gunst Q.D., Ruijter J.M. & Hoff M.J. van den 2017. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification* 14: 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>
- Saisuk W., Srisawat C., Yoksan S. & Dharakul T. 2019. Hybridization cascade plus strand-displacement isothermal amplification of RNA target with secondary structure motifs and its application for detecting dengue and zika viruses. *Analytical Chemistry* 91 (5): 3286–3293. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03736>
- Spiess A.-N., Deutschmann C., Burdukiewicz M., Himmelreich R., Klat K., Schierack P. & Rödiger S. 2015. Impact of smoothing on parameter estimation in quantitative DNA amplification experiments. *Clinical Chemistry* 61 (2): 379–388. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230656>
- Suwannakarn K., Payungporn S., Chieochansin T., Samransamruajkit R., Amonsin A., Songserm T., Chaisingh A., Chamnanpood P., Chutinimitkul S., Theamboonlers A. & Poovorawan Y. 2008. Typing (a/b) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza a viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods* 152 (1-2): 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.002>
- Tsou T.-P., Shao P.-L., Lu C.-Y., Chang L.-Y., Kao C.-L., Lee P.-I., Yang P.-C., Lee C.-Y. & Huang L.-M. 2012. Viral load and clinical features in children infected with seasonal influenza b in 2006/2007. *Journal of the Formosan Medical Association* 111 (2): 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2010.10.001>
- TwistDx 2018. TwistAmp assay desing manual. online Verfügbar unter: <https://www.twistdx.co.uk/support/manuals-and-software/twistamp/twistamp-assay-design-manual-v2-5/>.
- Vodeiko G.M., McInnis J., Chizhikov V. & Levandowski R.A. 2003. Genetic and phenotypic analysis of reassortants of high growth and low growth strains of influenza b virus. *Vaccine* 21 (25-26): 3867–3874. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00312-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00312-8)
- Wagenknecht H.-A. 2008. <I>fluorescent DNA base modifications and substitutes: Multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept</i>. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1130 (1): 122–130. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.001>
- Waidi Folorusno Sule D.O.O. 2020. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: Challenges and prospects. *The Pan African Medical Journal*. <https://doi.org/10.11604/pamj.suppl.2020.35.24258>
- Wang Y., Li X., Xi D. & Wang X. 2019. Visual detection of <i>fusarium proliferatum</i> based on asymmetric recombinase polymerase amplification and hemin/g-quadruplex DNazyme. *RSC Advances* 9 (64): 37144–37147. <https://doi.org/10.1039/c9ra05709a>
- Wei S. & To S.S.T. 2003. Influence of RNA secondary structure on HEV gene amplification using reverse-transcription and nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology* 27 (2): 152–161. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00170-1](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00170-1)
- Wu C., Cheng X., He J., Lv X., Wang J., Deng R., Long Q. & Wang X. 2008. A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types a and b and subtypes H5 and N1. *Journal of*

*Virological Methods* 148 (1-2): 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023>