

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

24. 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

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einleitung	8
2.1	Viren - Die Gefahr aus dem nichts	8
2.2	Die Influenza Viren - Pandemieversucher Nr. 1	9
2.2.1	Influenza A	9
2.2.2	Influenza B	11
2.3	Nachweismethoden von Influenza	13
2.4	Nukleinsäure amplifizierende Methoden - NAAT	13
2.4.1	Die Polymerase Kettenreaktion	14
2.4.2	Isotherme Amplifikation	15
2.4.3	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation	15
2.4.4	Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation	17
2.4.5	Rekombinase Polymerase Amplifikation	18
2.5	Ziel der Arbeit	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Bioinformatische Methoden	21
3.1.1	Primer- und Sondendesign für die Rekombinase Polymerase Amplifikation	21
3.1.2	Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen	21
3.1.3	Statistische Auswertung der Amplifikationen	22
3.1.4	Vergleich von Anstiegszeiten	24
3.1.5	Probit-Analyse	25
3.2	Herstellung synthetischer RNA-Standards	25
3.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	25
3.2.2	Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen	26
3.2.3	Sequenzierung der extrahierten Plasmide	26
3.2.4	Restriktionsverdau zur Plasmidlinearisierung	27
3.2.5	DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus	27
3.2.6	<i>In Vitro</i> Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards	27
3.2.7	RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA	28
3.3	Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem RNA-Hintergrund	28
3.4	Nukleinsäure Amplifikation	29
3.4.1	Reverse Transkription Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)	29
3.4.2	Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz	29
3.4.3	Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz	31
3.4.4	Primerscreening für die RT-RPA	32
3.4.5	Optimierung der Reaktionstemperatur für die Rekombinase Polymerase Amplifikation	32
3.4.6	Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation	32
3.4.7	Optimierung der Primerassymetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation	32
3.4.8	Einfluss der Primerassymetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation	32
3.4.9	Ermittlung der Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA	33

4	Ergebnisse	34
4.1	Entwicklung und Optimierung der Influenza B RT-RPA	34
4.1.1	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA	34
4.1.2	Entwicklung der Influenza B RT-RPA Primer und Sonden	35
4.1.3	Optimierung der Influenza B RT-RPA	36
4.1.4	Einfluss der Primerasymmetrie auf die RT-RPA	39
4.1.5	Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA	41
4.2	Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA	44
4.2.1	Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA	44
4.2.2	Entwicklung der Influenza A RT-RPA Primer und Sonden	45
4.2.3	Optimierung der Influenza A RT-RPA	47
4.2.4	Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA	50
4.2.5	Einfluss des Sondendesigns auf die RT-RPA	52
5	Diskussion	53
5.1	Design der Primer und deren Einfluss auf die RT-RPA	53
5.2	Vorteile der low-Volume RPA hinsichtlich Mischzeitpunkt und Sensitivität	55
5.3	Diskussion Sensitivitäten	56
5.4	Diskussion Asymmetrie	56
5.5	Diskussion Sondeneinfluss	56
5.6	Diskussion ditch	56
6	Anhang	59
	Literaturverzeichnis	66

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung eines behüllten Virus	8
2	Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus	10
3	Reaktionsmechanismus der PCR.	15
4	Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP	16
5	Schematischer Reaktionsmechanismus der Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (NAS-BA)	18
6	Schematischer Reaktionsmenismus der RPA	19
7	Schematischer Aufbau der RPA-Sonden	22
8	Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung	35
9	Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen.	36
10	Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA	37
11	Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie.	39
12	Optimierung der Mischzeit für die Influenza B RT-RPA.	40
13	Einfluss der Primerassymetrie auf der RT-RPA	41
14	Etablierung der Influenza B RPA im Original- und low-volume -Ansatz.	43
15	Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide.	45
16	Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen.	46
17	Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA	47
18	Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie der Influenza A RT-RPA.	48
19	Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA.	49
20	Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA.	51
21	Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA.	52
22	Alignment zwischen den Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyp:	54
23	Einfluss eines Mischschrittes nach 5 min auf die Influenza B 50 µl RT-RPA	59
24	Plasmidkarte des Influenza B Plasmides	61
25	Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard	62
26	Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard	63

Tabellenverzeichnis

2	Übersicht und Vergleich der Proteine von Influenza A und B (Modifiziert nach Sandt <i>et al.</i> (2015))	12
3	Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm	21
4	Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR	26
5	Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes	29
6	Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes	29
7	Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes	30
8	Temperaturprotokoll für die Influenza PCR	30
9	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes	30
10	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz	31
11	Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz	31
12	Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA	35
13	Vergleich der verschiedenen Sensitivitätsmessungen der Influenza B RT-RPA	42
14	Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA	45
15	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 9	59
16	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 10	59
17	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 11A	60
18	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 11B	60
19	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 12A	60
20	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 12B	64
21	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 16	64
22	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 17	64
23	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 18A	64
24	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 19	65
25	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 21	65
26	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 13A	65
27	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 13B	66

1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mirkromolar
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	complimentary Desoxyribonukleinsäure
ct	cycle threshold
Cy5	Cyanine 5
DdRp	T7 DNA ab- hängigen RNA-Polymerase
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DFA	Direkter fluoreszenz Antikörper Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	Carboxyfluorescein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEX	Hexachlorofluorescein
IHRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
LAMP	Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation
LB-Medium	Lysogenic broth-Medium
MAD	mean-absolut deviation
ml	milliliter
mM	millimolar
NA	Neuraminidase
NAAT	Nukleinsäure amplifizierende Methoden
NASBA	Nucleinsäure sequenz-basierte Amplifikation
NCIRD	Nationale Center für Immunisierung und Respiratorische Krankheiten
ng	nanogramm
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
ORF	offenen Leserahmen

(fortgesetzt auf der nächsten Seite...)

(fortgesetzt)

PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylen Glucol
POCT	Point-of-care testing
PSM	Primer-Sonden Mix
qPCR	quantitative Polymerase Ketten Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Rekombinase Polymerase Amplifikation
RPM	Rounds per minute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
RT-qPCR	reverse Transkriptase quantitative Polymerase Ketten Reaktion
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
SSB	single stranded binding Protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT-Wert	threshold time-Wert
U	unit
vRNP	viral ribonucleoprotein

bonucleoprotein* \end{longtable}

2 Einleitung

2.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Keime sind eine ernstzunehmende Bedrohung für Menschen und staatliche Systeme. Dabei sorgen virale Epidemien und Pandemien wie die Spanische Grippe mit über 50 Millionen Toten (Dharmapalan 2020), das Chikungunya Virus mit mehr als 1,3 Millionen Infizierten (Charrel *et al.* 2007), und die aktuelle SARS-CoV-2 Pandemie mit weit über 140 Millionen Infizierten (Bai *et al.* 2021) für weltweite Krisen und Milliarden Schäden (Louie *et al.* 2009).

Viren lassen sich näherungsweise als ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, mit einem DNA oder RNA-Genom beschreiben. Dieses ist von einer Virushülle umgeben, welche aus einer Proteinmatrix, dem sogenannten Capsid und je nach Virusart aus einer zusätzlichen Phospholipid-Doppelschicht mit eingebetteten Hüllproteinen besteht.

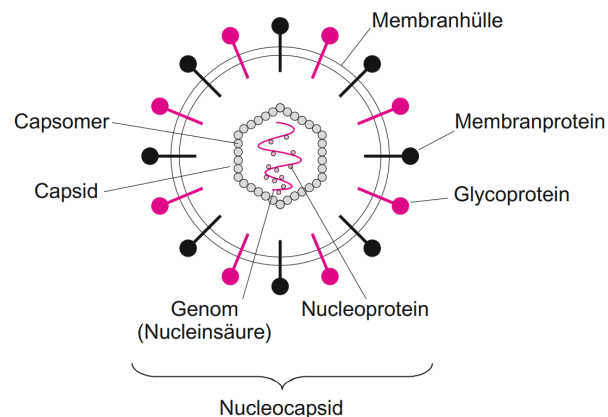


Abbildung 1: **Schematische Darstellung eines behüllten Virus** Typischer Aufbau eines behüllten Virus mit Capsid, Membranhülle und Hüllproteinen. Das Virus-Genom wird von angelagerten Nucleoproteinen stabilisiert (Modrow *et al.* 2010).

Da Viren keinen eigenen Reproduktionsmechanismus besitzen, sind sie auf die Infizierung von Zellen angewiesen, damit sie mittels der Reproduktions-Maschinerie des Wirtes die viralen Komponenten vervielfältigen können (Modrow *et al.* 2010). Eine beeindruckende Fähigkeit der Viren ist die Anpassung an neue Umgebungen und Wirte. Diese hängt in von ihrer hohen genetischen Variabilität und Mutationsrate ab, welche es ihnen erlaubt eine große Vielfalt zu erschaffen (Sanjuán & Domingo-Calap 2016). Dadurch bilden einige Viren ständig neue Varianten, welche durch ihre veränderten Infektionsstrukturen Immunlücken besetzen und dadurch Infektionsherde und Pandemien hervorrufen (Lyons & Luring 2018; Cosar *et al.* 2022). Die vorherrschende SARS-Cov-2 Pandemie hat zeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um Gesundheitssysteme zu entlasten und Infektionsketten schnell zu unterbrechen (Valera *et al.* 2021). Dabei ist die Polymerase Ketten Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) die vorherrschende Testmethode in der medizinischen Diagnostik, da sie durch die Amplifikation von Nukleinsäuren hohe Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht. Jedoch benötigt die PCR spezialisierte Laboratorien und geschultes Personal (Brendish *et al.* 2015), sowie energieintensive Gerätschaften wodurch eine dezentrale Diagnostik erschwert wird (Behrmann, Bachmann, Hufert, *et al.* 2020). Durch Transportwege oder aufwendige Protokolle besitzt die PCR oft eine Turnaround-Zeit von mehr als 24 Stunden (Brendish *et*

al. 2015; Augustine *et al.* 2020). 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 mit das sogenannten *Point of care testing* (POCT) (Goble & Rocafort 2016). Für das POCT werden isotherme Nukleinsäureamplifikationstechniken zur Detektion der Erreger immer interessanter, da sie im Vergleich zur PCR keine komplexen Geräte erfordern sowie kürzere Testzeiten anbieten. Diese werden dezentral für die Diagnostik verwendet, was zu einer schnelleren Detektion vor Ort und möglicherweise zu einer Unterbrechung von Infektionsketten führen kann (Pumford *et al.* 2020; Islam & Koirala 2022).

2.2 Die Influenza Viren - Pandemieversucher Nr. 1

Die “echte” Grippe, verursacht durch die Influenza Viren, als bekannteste Vertreter der Orthomyxoviren, ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit mehr als 300000 Todesfällen weltweit (RKI 2019; Uyeki *et al.* 2022). Die Influenza Viren lassen sich, aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und ihrer serologischen Charakteristika in die Typen A, B, C und D einteilen. Sie 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). 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 (Yoo *et al.* 2018) und ist für die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verantwortlich. Dieser wird abermals in viele Subtypen anhand von den Oberflächenproteinen Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) 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 Influenza A Virus Das ca. 13.5 kb große, segmentierte Genom codiert 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; Chen *et al.* 2018). Von den 17 codierten Proteinen sind zehn essentiell, während der Rest als sogenannte Accessoire-Proteine bezeichnet werden (Vasin *et al.* 2014). Der Aufbau des Virus sowie die essentiellen Proteine sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Accessoire-Proteinen sind, im Gegensatz zu den essentiellen Proteinen, auf alternativen offenen Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) codiert, welche es Viren erlauben eine größere Protein-Vielfalt auf engen genomischen Raum, durch die “mehrfachverwendung” einer Nukleotid-Sequenz, zu exprimieren. Die alternativen ORF’s entstehen dabei durch verschiedene molekularbiologische Mechanismen, wie beispielsweise *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 & Brierley 2012). Die bekannten Accessoire-Proteine, wie beispielsweise die dem PA zugehörigen Proteine PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger *et al.* 2012; Muramoto *et al.* 2013) sind in Tabelle 2 angegeben.

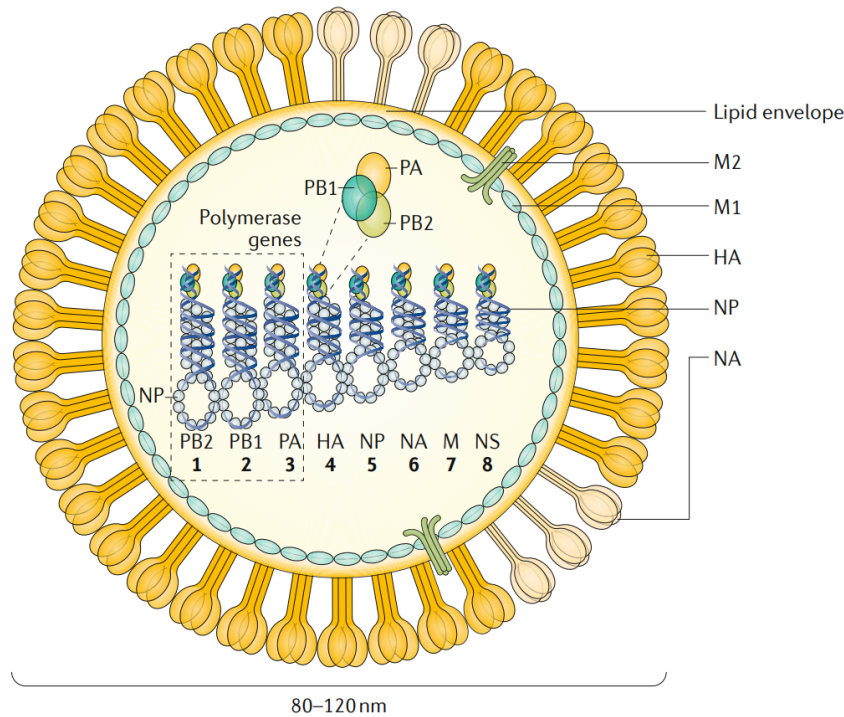


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den acht Genom-Segmenten. Das ca. 13.5 kb große, segmentierte Genom codiert dabei für 10 essentielle Proteine. Zu diesen zählen die Neuraminidase (NA), welche im Verlauf der Infektion für 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). Modifiziert nach Krammer *et al.* (2018).

Die RNA-abhängige RNA Polymerase des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 2 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 einzelnen Genomsegmentenden. Die verbleibende RNA wird von oligomeren NP's gebunden, welches auf Segment 5 codiert ist. Der resultierende RNA-Protein-Komplex ist in der Literatur als vRNP-Komplex (engl.: *viral ribonucleoprotein*) beschrieben (Velthuis & Fodor 2016; Krammer *et al.* 2018). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des vRNP-Komplex zeigten eine doppel-helikale 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 aus einer äußeren cholesterolphaltigen doppel-Lipid Schicht, in welche die Glykoproteine NA, HA und M2 integriert sind (Modrow *et al.*

2010; To & Torres 2019). 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 Glykoproteine, sowie die Lipidmembran durch seine positive Polarität (Chlanda & Zimmerberg 2016; Kordyukova *et al.* 2018). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essenzielle 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-Proteins am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley & 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 mediert und andererseits durch den pH-Wert Regulierung um den Golgi-Apparat das *Budding* durch Konformationsänderung des HA zu vermitteln (Takeuchi & Lamb 1994; To *et al.* 2016). Die Oberflächenproteine 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 *et al.* 2003). Die hohe Variabilität der HA und NA-Proteine lässt sich durch die spezielle RNA-Polymerase der Viren erklären. Diese besitzt eine hohe Fehlerrate, 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 *et al.* 2018).

Abschluss satz 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 Begleiter 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 (Koutsakos *et al.* 2016; Zaraket *et al.* 2021). Nichtsdestotrotz 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 & 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 2 gezeigt.

Tabelle 2: 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.

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 essenziell für die Virus-Replikation ist (Paterson *et al.* 2003; Hatta *et al.* 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 $0,14 \cdot 10^{-3}$ bis $3,32 \cdot 10^{-3}$ Substitutionen/Jahr/untersuchter Sequenz als Influenza A mit einer Mutationsrate von rund $2,68 \cdot 10^{-3}$ bis $12,50 \cdot 10^{-3}$ Substitutionen/Jahr/untersuchter Sequenz (Chen & 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 Antigen shift mit den Influenza A Viren möglich ist (Paterson *et al.* 2003).

2.3 Nachweismethoden von Influenza

Trotz guter Impfungen und einem sich immer weiterentwickelndem Gesundheitssystem bleiben respiratorische Erkrankungen hervorgerufen durch die Influenza Viren ein ernst zu nehmendes Problem. So liegen die geschätzten jährlichen Todesfälle im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen verursacht durch Influenza Viren zwischen 290.000 und 650.000 (Iuliano *et al.* 2018). Die Behandlung ist dabei zeitabhängig und Medikamente müssen spezifisch und rechtzeitig verabreicht werden (Whitley 2007; Świerczyńska *et al.* 2022). Aus diesem Grund ist eine zeitige Diagnostik entscheidend um eine rechtzeitige Behandlung zu gewährleisten (Vemula *et al.* 2016). Die Detektion der Influenzaviren kann über Antikörpertest, Serologischen Methoden, Zellkultur, und Nukleinsäure basierte Testverfahren wie Nukleinsäureamplifikation oder Sequenzierung erfolgen (Vemula *et al.* 2016). Bei serologischen Testverfahren wird auf entwickelte Antikörper im Serum des Patienten gegenüber den speziellen Virusproteinen wie HA oder NA getestet. Dadurch ist es möglich, zwischen einzelnen Subtypen des Influenza A Virus zu unterscheiden (Woźniak-Kosek A 2014). Jedoch sind serologische Tests für die klinische Diagnostik nicht empfehlenswert, da für ein Ergebnis mehrere Serien zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen werden müssen, was eine schnelle Diagnostik verhindert (Chow *et al.* 2019). Ebenso ist die Zellkultur, bei welcher spezielle Zelllinien mit der Patientenprobe inkubiert und über markierte Antikörper nachgewiesen werden, nicht für die Diagnostik geeignet, da sie trotz hoher Spezifität und Sensitivität längere Inkubationszeiten zur Folge hat (Vemula *et al.* 2016; Chow *et al.* 2019). Bei den Antikörpertests wie dem direkten Fluoreszenz Antikörper Assay (engl.: *direct fluorescence antibody assay*, DFA) wird die dem Patienten entnommene Probe mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper auf Influenza spezifische Antigene untersucht. Diese kostengünstige Testmethode liefert bei kurzen Testzeiten von 2-4 h ein Ergebnis mit Sensitivitäten ab 70 % aufwärts (Kim & Poudel 2013). Sie sind zusammen mit Nukleinsäure amplifizierende Methoden (engl.: *nucleic acid amplification techniques*, NAAT), welche als Goldstandard in der klinischen Diagnostik gelten, die empfohlenen Methoden zur Detektion von Influenzaviren (Uyeki *et al.* 2018).

2.4 Nukleinsäure amplifizierende Methoden - NAAT

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 (Özay & McCalla 2021; Kang *et al.* 2022). NAAT liefern dabei im Vergleich zu anderen Diagnostik-Methoden schnelle Resultate und können zwischen Subtypen unterscheiden (Uyeki *et al.* 2018). So können für die Influenza Diagnostik RT-PCR, LAMP (engl.: *loop mediated isothermal amplification*) oder NASBA (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*) verwendet werden (Vemula *et*

al. 2016).

2.4.1 Die Polymerase Kettenreaktion

Die PCR, entwickelt von Mullis *et al.* (1986) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Dies war 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 zwei ca. 20 bp großen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, welche spezifisch an ein komplementäres DNA-Fragment binden und von einer Polymerase verlängert werden. Ein Primerpaar, bestehend aus Forward (in Leserichtung der Amplifikation) und reverse (entgegengesetzt der Leserichtung) Primer flankiert jeweils einen definierten DNA-Abschnitt, welcher in einer PCR amplifiziert wird (Ableitner 2018). Der Reaktionsmechanismus der PCR besteht aus 3 Zyklen; der 1) DNA-Denaturierung, der 2) Primerhybridisierung und der 3) Elongation. Im ersten Schritt werden mittels hoher Temperatur ($\sim 95^{\circ}\text{C}$) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgebrochen und die DNA denaturiert. Bei dem Hybridisations-Schritt (Temperatur auf $55 - 65^{\circ}\text{C}$) kommt es zum sogenannten *annealing*, der Anlagerung der Primer an die DNA (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). Im nachfolgenden Amplifikationsschritt bindet die Polymerase bei $\sim 72^{\circ}\text{C}$ die gebundenen Primer und synthetisiert neue Nukleotide anhand der komplementären DNA-Vorlage an den Primer. So werden diese erweitert und somit die DNA verdoppelt. Als DNA-Polymerase wird dabei abweichend von der Original-Methode von Mullis *et al.* (1986) die Taq-Polymerase (abgeleitet von dem Bakterium *Thermus aquaticus*) aufgrund ihres hohen Temperaturoptimums verwendet. Anschließend wird eine erneute DNA-Denaturierung durchgeführt und ein PCR-Zyklus ist abgeschlossen. 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 klassischerweise mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (Wood *et al.* 1994).

Da DNA abhängige DNA Polymerasen keine RNA als Ausgangsmaterial erkennt, wird eine zusätzliche reverse Transkriptase (RT)-Reaktion der PCR vorangestellt, um auch RNA Proben mittels dieser Methode analysieren zu können. Bei der RT kommt es zur Umschreibung der RNA in cDNA. Die DNA kann anschließend über den beschriebenen PCR-Mechanismus amplifiziert werden (ODriscoll *et al.* 1993; Mülhardt 2009). Diese erweiterte PCR wird als reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) bezeichnet (Bustin *et al.* 2005).

Eine weitere besondere Form der PCR ist die quantitative PCR (qPCR). Hierbei wird dem PCR-Reaktionsmix ein fluoreszierendes Reportermolekül, wie beispielsweise ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, oder fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide zugesetzt (Ma *et al.* 2021). Goldstandard der qPCR sind die fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die sogenannten Sonden, welche spezifisch innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs hybridisieren (Ranasinghe & 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 fluoreszierendes Molekül, 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 & Brown 2005). Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die hybridisierte Sonde hydrolysiert, wodurch Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt werden (Thornton & Basu 2011). Der Quencher blockiert das Signal des Reportermoleküls nicht mehr und das Fluoreszenzsignal kann

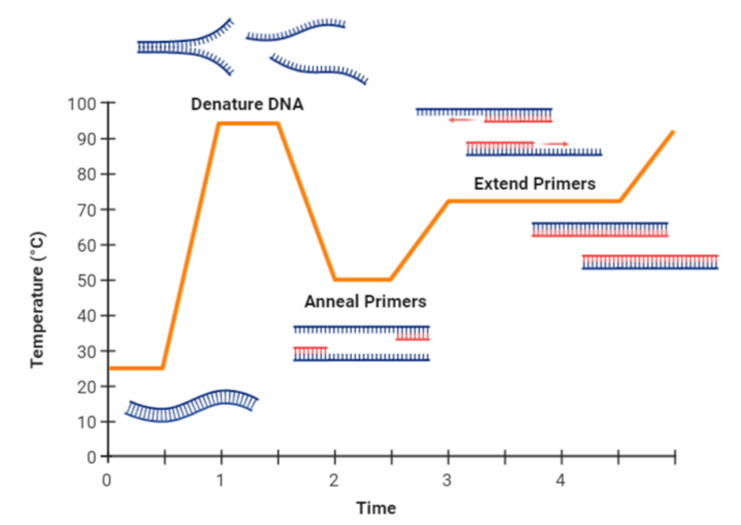


Abbildung 3: **Reaktionsmechanismus der PCR:** schematischer Reaktionsmechanismus der PCR mit angefügter Temperaturkurve bestehend aus 1) DNA-Denaturierung, 2) Primerhybridisierung und 3) Elongation. Die doppelsträngige DNA (blau) wird bei 95 °C denaturiert, und es können Primer (rot) bei 55 °C an die einzelsträngige DNA binden. Diese werden von der Polymerase bei 72 °C erweitert, bis eine neue doppelsträngige DNA vorliegt. Bild modifiziert nach Tiago Lopes (2020)

detektiert werden. Dabei steht das freiwerdende Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur amplifizierten DNA, was eine die Echtzeit-Verfolgung der Nukleinsäureamplifikation erlaubt. Durch die Einführung eines fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten *ct-Wert* (engl.: *cycle threshold*), welcher von dem ersten Fluoreszenzsignal, welches sich vom Grundrauschen abhebt, überschritten wird, lässt sich der DNA-Gehalt der Reaktion mit der Reaktionszeit verknüpfen. Somit ermöglicht die qPCR eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge (Bustin 2000; Lovatt 2002).

2.4.2 Isotherme Amplifikation

Wie bereits in 2.1 erwähnt unterliegt die PCR einigen Limitationen, die sie für die POCT weniger geeignet machen. Isotherme Amplifikationstechniken bieten eine Alternative für die POCT (Kang *et al.* 2022). Eine vereinfachte Handhabung sowie die gleichende Reaktionstemperatur ermöglicht Nukleinsäuren mit einfachen Gerätschaften wie beispielsweise sogar 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 Goldstandard Methoden für einen kleinen Überblick 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 die wohl bekannteste isotherme Amplifikationsmethode. Die LAMP amplifiziert DNA bei einer Konstanten Temperatur von 60 - 65 °C. Anders als z.B. bei der PCR werden bei der LAMP 4 bis 6 Primer verwendet, wodurch sie einerseits sehr hohe Spezifitäten erreicht, andererseits aber hohe Anforderung an die Optimierung und das Primer-Design bestehen (Soroka *et al.* 2021). Die LAMP-Primer werden dabei in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer

unterteilt. (Nagamine *et al.* 2002). Die Primer binden an unterschiedlichen Regionen der Ziel-DNA (siehe Abbildung 4) und erfüllen verschiedene Aufgaben (Huang *et al.* 2020). Die DNA-Amplifikation der LAMP ist enzymatisch mittels einer DNA abhängigen DNA-Polymerase realisiert, welche eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt, im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase mit ihrer intrinsischen Exonukleasaktivität (Thornton & Basu 2011; Park 2022).

Der Reaktionsmechanismus der LAMP kann grundsätzlich in zwei Phasen unterteilt werden; der nicht zyklischen Phase und der zyklischen Phase. Im ersten Schritt der nicht zyklischen 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 Strangverdrängungsaktivität wird der ursprüngliche Doppelstrang abgelöst. Anschließend bindet der äußere Primer und es findet abermals eine Strangverlängerung statt bei der der innere Primer mit der neu synthetisierten DNA verdrängt wird. Der entstandene DNA-Einzelstrang besitzt an einem Ende die Sequenz des inneren Primers, und bildet durch den hinteren komplementären Teil des Primers eine Schleife (loop) aus. Der eben beschriebene Amplifikations-Schritt findet auch mit den entgegengesetzten inneren und äußeren Primern statt, welche die oben erwähnte Form einer Hantel besitzt (Parida *et al.* 2008).

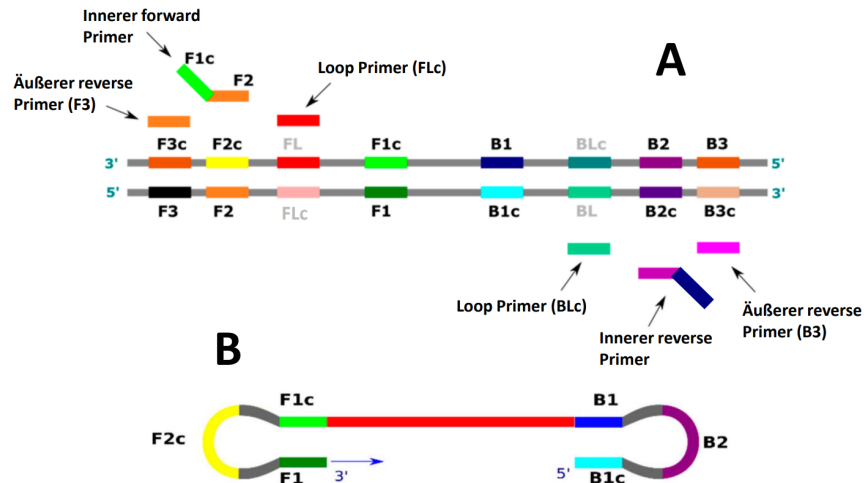


Abbildung 4: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP:** A: Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußeren Primer liegen "hinter" den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung 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 *et al.* (2021)

Die gebildete Hantelstruktur dient in der zweiten Phase der Amplifikation, der zyklischen Phase als Startpunkt. Hier können die verschiedenen Primer gleichzeitig binden und somit die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigen. Ebenfalls dient das 3'-Ende der Hantelstruktur weiterer Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf der Reaktion entstehen verschiedenste Strukturen wie Konkatemere und blumenkohlähnliche Strukturen mit weiteren Schleifen (Silva *et al.* 2019; Soroka *et al.* 2021). Durch das zusätzliche Einbringen der Loop Primer, kann die Anzahl der Startpunkte abermals erhöht werden, was zu einer erhöhten Amplifikationsgeschwindigkeit führt (Nagamine *et al.* 2002). Die LAMP zeichnet sich durch hohe DNA-Endkonzentration von 10-20 µg am Ende der Reaktion aus, wodurch eine Auswertung mit dem bloßen Auge erfolgen kann (Parida *et al.* 2008). So kann die Quantifizierung der Amplifikation einerseits über kolorimetrische Fluoreszenzfarbstoffe

wie Calcein, welche vor der Messung zugegeben werden (Tomita *et al.* 2008) oder andererseits über Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I, welche nach Abschluss der Amplifikation zugegeben werden (Iwamoto *et al.* 2003) realisiert werden. Ebenfalls kann die Messung der Trübung für den Nachweis einer Positiven Reaktion verwendet werden. Während der Amplifikation entstehen große Mengen an Pyrophosphat, welches Magnesium-Ionen bindet und bei hohen Konzentrationen ausfällt, was einer sichtbaren Trübung der Reaktionsmischung führt (Mori *et al.* 2001).

2.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation

Die Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA), ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode zum Nachweis von Nukleinsäuren, welche RNA als Ausgangsmaterial zum Nachweis von Nukleinsäuren nutzt (Compton 1991; Deiman *et al.* 2002). Aus diesem Grund ist die NASBA ideal zur Detektion von Influenza Viren, da hier im Gegensatz zu anderen Amplifikationsmethoden wie der PCR, kein RT-Schritt vorgeschaltet werden muss (Compton 1991; Moore *et al.* 2004; Bachman 2013). Die erstmals von Guatelli *et al.* (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzymmix bestehend aus einer reversen Transkriptase (RT), des avian myeloblastosis Virus, der RNase H und der T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (DdRp) (Deiman *et al.* 2002). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer Primer an das 3'-Ende der einzelsträngigen RNA. Dabei hybridisieren nur 20 bp am 3'-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5-Ende hingegen besitzt eine DdRp Promotor Sequenz. Bei konstanten 41 °C wird dann eine cDNA 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 erhalten bleibt. Ein zweiter 20 bp langer Primer (komplementär zur DNA) hybridisiert und vervollständigt mittel RT den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche viele RNA-Kopien des DNA-Templates erzeugt. Die neu entstandenen RNA-Moleküle reihen sich in eben beschriebenen Zyklus ein und es kommt zur exponentiellen Amplifikation (Compton 1991). Zur Detektion und Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle hybridisations-Sonden sogenannte "Molecular-Beacon" verwendet werden (Deiman *et al.* 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).

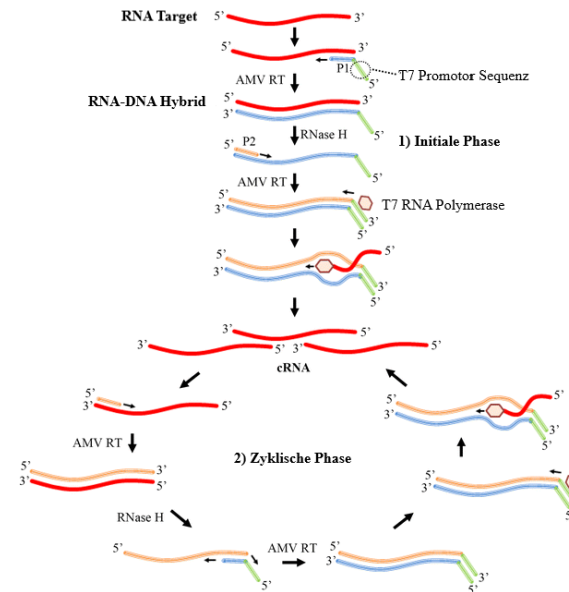


Abbildung 5: **Schematischer Reaktionsmechanismus der Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (NASBA)**: Die NASBA lässt sich einteilen in die 1) initiale Phase und die 2) zyklische Phase. Die Template-RNA bildet durch die Hybridisation von Primern ein DNA/RNA Hybrid, welches über einen RNase-Verdau und erneute DNA Synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt wird. Durch den auf dem Doppelstrang aktiven Promotor werden viele RNA-Kopien erzeugt, welche in den Amplifikationszyklus eingehen. In diesem entsteht abermals ein DNA/RNA Hybrid, welches durch RNase-Verdau und DNA Synthese in einen DNA-Doppelstrang mit aktiven Promotor überführt wird. Bild Modifiziert nach Zhong & Zhao (2018).

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 isothermes Amplifikationssystem (Li *et al.* 2019). Der Mechanismus beruht dabei auf einem Zusammenspiel der Rekombinase, dem Rekombinase loading factor, den single-stranded binding proteinen (SSB) und der Sau DNA-Polymerase (abgeleitet von dem Bakterium *staphylococcus aureus*), welche die Vervielfältigung von DNA koordinieren (Li *et al.* 2019). 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 & 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 Verdrängung Verdämmung des gebundenen Primers durch den abgespaltenen DNA-Einzelstrang wird durch die Anlagerung von SSB's an diesen Verhindert (Babu *et al.* 2018). Anschließend bindet die Sau DNA-Polymerase an das freie 3'-OH Ende des hybridisierten Primers und verlängert diesen komplementär zur DNA. Dabei besitzt die Sau DNA-Polymerase eine Strangverdrängungs-aktivität, wodurch die den DNA-Doppelstrang weiter aufbrechen und somit die Verlängerung des Primers fortsetzen kann. Dies führt zu einer neu synthetisierten doppelsträngigen DNA, welche erneut in die oben beschriebene Reaktion eingeht und so exponentiell amplifiziert wird (Babu *et al.* 2018; Tan *et al.* 2022).

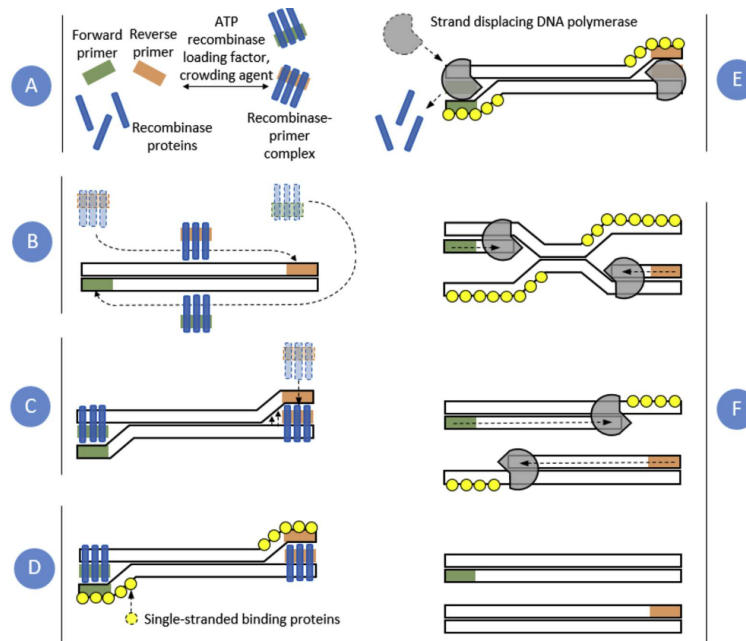


Abbildung 6: **Schematischer Reaktionsmechanismus der RPA:** **A:** Bildung der Rekombinase-Primer-Komplexe unter ATP Verbrauch. **B:** Migration der Rekombinase-Primer-Komplexe entlang der Ziel DNA bis zu den homologen Primersequenzen. **C:** Insertion des Rekombinase-Primer-Komplexes in die doppelsträngige 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 & OSullivan (2018).

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 (Lillis *et al.* 2016; Lobato & OSullivan 2018). 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 Reversen Transkriptase Reaktion kombiniert werden um RNA zu vervielfältigen (Yoo *et al.* 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 *et al.* 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 Detektion der RPA kann einerseits nach vollendeter Reaktion über eine Agarose-Gelelektrophorese oder andererseits "real time" während der Reaktion durch die Zugabe von Sonden erfolgen. Dabei können verschiedene Sondentypen wie die Exo-Sonde oder die fpg-Sonde verwendet werden (Babu *et al.* 2018). Das

Prinzip der Sonden beruht ähnlich wie der PCR auf dem FRET-Prinzip zwischen einem Fluorophor und einem Quencher (Ranasinghe & Brown 2005; Lobato & OSullivan 2018). Bei der ca. 50 bp großen Exo-Sonde findet im Gegensatz zur PCR keine vollständige Hydrolyse, sondern die zielgerichtete Spaltung der Sonde an einer a-basischen Seite durch die Exonuklease III statt. Die a-basische Seite ist dabei so angeordnet, dass sie zwischen Fluorophor und Quencher liegt und diese beiden durch die Spaltung räumlich getrennt werden (Thornton & Basu 2011; Lobato & OSullivan 2018). Um zu vermeiden, dass die Sonde als Primer fungiert wird das 3'-Ende blockiert, jedoch erzeugt die Spaltung der Exonuklease ein weiteres unblockiertes 3'-Ende, welches als Primer in die Amplifikation eingeht (Daher *et al.* 2016). Die fpg-Sonde ist mit ca. 35 bp kleiner als die Exo-Sonde funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Hier ist das Fluorophor direkt an das a-basische Nukleotid gekoppelt. Die Spaltung wird durch eine 8-oxoguanine DNA glykosylase katalysiert, wodurch das Fluorophor von der Sonde abgespalten wird und kein neues 3'-Ende entsteht (Daher *et al.* 2016).

Eine weitere Applikation der RPA ist die solid phase RPA, bei welcher einer der beiden Primer auf einer Oberfläche immobilisiert wird. Diese Applikation erlaubt ein besseres Multiplexing, da die verschiedenen Reaktionen räumlich getrennt voneinander ablaufen können (Río *et al.* 2014). Die Detektion kann hierbei Elektrochemisch (Río *et al.* 2016), Kolorimetrisch (Yamanaka *et al.* 2017) oder markierungsfrei über Ring-Resonatoren (Shin *et al.* 2013) erfolgen. Ebenfalls ist es möglich RPA mithilfe von lateral flow Plattformen zu kombinieren, um mit dem bloßen Auge auswertbare Tests zu entwickeln (Lobato & OSullivan 2018; Heeroma & Gwenin 2020).

2.5 Ziel der Arbeit

Ein aktuelles BMBF-Projekt befasst mit Point of Care Diagnostik von respiratorischen Viren. Für die vor Ort Analytik sollen verschiedene Systeme in ein mobiles Kofferlabors-System implementiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, jeweils ein Rekombinase Polymerase Amplifikations Assay zum Nachweis der Influenza Viren A und B zu entwickeln. Die Assays sollen für Influenza A die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nachweisen können sowie für Influenza B als Pan-Influenza B fungieren. Dafür sollten Primer-Sonden-Sets designet und diese in einem Screening getestet werden. Die Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Systeme sollte mittels in vitro generierter artifizieller RNA Standards auf Eignung geprüft werden und hinsichtlich der selben Parameter direkt mit dem Goldstandard (PCR-Systemen) verglichen werden. Im Detail sollen Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt der Reaktion sowie Ansatzvolumen für die RPA Assays optimiert werden. Hinsichtlich der Variation der eingesetzten Oligonukleotid-Konzentration ist der Einfluss einer Primer-Asymmetrie zu analysieren. Zusätzlich sollen Auswirkungen unterschiedlicher Sondenmodifikation charakterisiert werden. Abschließend sollte die Eignung der RT-RPAs in einem simulierten klinischen Probenhintergrund getestet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bioinformatische Methoden

Das folgende Kapitel umfasst die mithilfe der Bioinformatik durchgeführten Methoden wie Primerdesign sowie die Modifikation von Primern und Sonden. Des Weiteren wird die Auswertung der Messdaten und deren Vergleich erläutert.

3.1.1 Primer- und Sondendesign für die Rekombinase 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 3 angegeben.

Tabelle 3: 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*¹ 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*² verwendet (Sievers & Higgins 2017). Für die Influenza A Primer-Sonden-Sets wurden zusätzlich degenerierte Basen eingeführt, um ein 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 gewählten 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.

¹<http://www.primer-dimer.com/>

²<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 2023a).

RPA-Sonden

Das Design der RPA-Sonden erfolgte wie in Behrmann, Bachmann, Spiegel, *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 7). Am 3'-Ende wurde die Sonde mit einem dreikettigen Kohlenstoff-Rest versehen, um eine Kettenverlängerung der Sonde zu unterbinden (Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* 2020; Biomers 2023b). 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 7B).

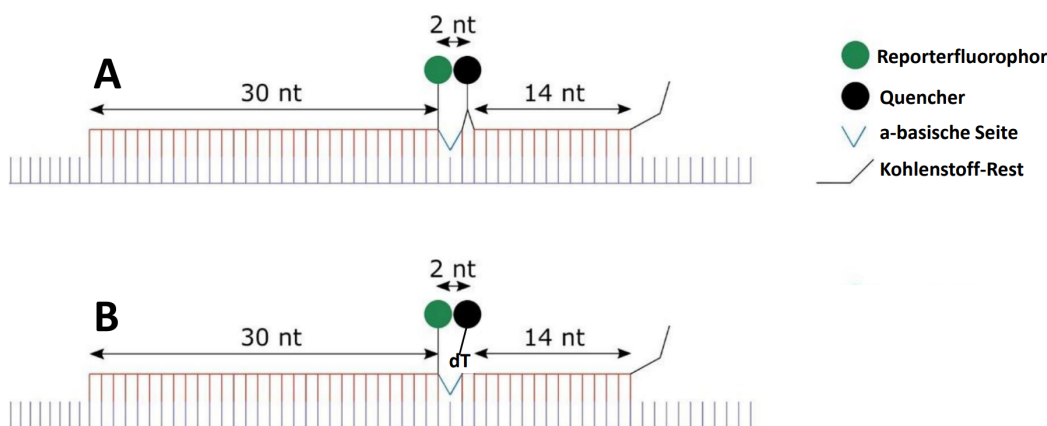


Abbildung 7: **Schematischer Aufbau der RPA-Sonden:** Modell der RPA sonden mit Reporterfluorophor, Quencher, a-basischer Seite und Kohlenstoffrest gebunden an die Ziel-DNA. **A:** Sonde mit intern gebundenem Quencher (*internally quenched*). **B:** Sonde mit dT-gekoppeltem Quencher (*dT-quenched*).

3.1.3 Statistische Auswertung der Amplifikationen

Für die Entwicklung und Optimierung von Amplifikationsverfahren ist eine einheitliche statistische Auswertung notwendig (Rödiger *et al.* 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 & 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 *et al.* (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 SHA-PIRO & WILK (1965)) für Normalität wird der Datensatz auf Normalverteilung getestet. Bei errechneten P-Werten von $\geq 5 * 10^{-4}$ 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 & Whitney (1947), verglichen. Dieser Test erlaubt eine Aussage, ob zwei unabhängige Datengruppen sich signifikant voneinander unterscheiden (Mann & 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-Verhältnis⁴ (SNR, engl. *signal noise ratio*), berechnet mit Formel (2) (siehe R-Dokumentation). 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 *et al.* 2015).

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

Des Weiteren wird oft bei Analysen von Echtzeit-Amplifikationsmethoden mit einem Schwellenwert gearbeitet. Sollte dieser während der Messung nicht überschritten werden, wird die Amplifikation als negativ

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

⁴<https://search.r-project.org/CRAN/refmans/warbleR/html/sig2noise.html>

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 *et al.* (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 *et al.* 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 (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 *et al.* 2015).

3.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten

Der 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 *et al.* 2022). Der Test auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalität durchgeführt (González-Estrada *et al.* 2022). Anschließend wurden die Daten mit der Boxplot-Methode auf Ausreißer untersucht (Gehrau *et al.* 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 *et al.* 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 & 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 ϕ auf ein parametrischen Regressionsmodell (siehe Formel (5)) übertragen (Bingham & 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, Bachmann, Spiegel, *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[®] 5-alpha kompetenten *E. coli* Zellen (High Efficiency, New England BioLabs[®] GmbH) erfolgte nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll⁵ online verfügbar). Als Vektor dienten artifiziell synthetisierte Plasmide der Firma Invitrogen, die einerseits eine Antibiotikaselektivkassette sowie andererseits die virale RNA-Sequenz als DNA-Gegenstück beinhalten (Plasmidkarten siehe Abbildung 24 - 26 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

⁵<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>

°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 & 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 4 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 4: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
Zellyse		
95 °C	60 s	1 x
Amplifikation		
95 °C	10 s	45 x*
60 °C	30 s	
Kühlen		
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 (Protokoll⁶ 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 *et al.* 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)

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 *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden 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.

⁶<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0bd0c5fb-c271-43e7-af43-32d539374fa9&lang=en>

3.2.4 Restriktionsverdau zur Plasmidlinearisierung

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 24 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 25 - 26 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 (Schmidt *et al.* 1999; Mülhardt 2009). 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. (Protokoll⁷ online verfügbar). Die Elution im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10 µl DNA Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl; 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 24 - 26 im Anhang).

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New Eng-

⁷https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf

land BioLabs) nach Herstellerangaben (Protokoll⁸ 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 (Protokoll⁹ 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 mittel 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, UTMTM) entnommen und die RNA mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online¹⁰ Verfügbar). In die erhaltenen RNA-Extrakte wurde in einem 1:10 Verhältnis die entsprechende virale Standard-RNA zugegeben und die Kontrollprobe homogenisiert.

⁸<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/standard-rna-synthesis-e2040>

⁹https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol_EchoCLEANRNACleanupcolumn_001_EN.pdf

¹⁰<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

3.4 Nukleinsäure Amplifikation

In diesem Kapitel werden durchgeführten NAAT beschrieben. Darunter fallen die RT-qPCR, die RPA sowie die verschiedenen Optimierung letzterer für die Influenza A und B Viren.

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

Die Amplifikation von viraler Standard RNA mittels RT-qPCR wurde mit dem Luna[®] Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 5) mit 1 µl Virus-RNA-Standard versetzt. Für den in Tabelle 5 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurden je nach Detektionssystem die für Influenza A (siehe Tabelle 6) bzw. Influenza B (siehe Tabelle 7) 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 8 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler[®] 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 5: Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes

Bestandteil	Konzentration	Volumen
2X Luna [®] Universal Probe One-Step Reaction Mix	1X	
20X Luna [®] WarmStart [®] 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 6: Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5'->3')	Konzentration	3'-Position	Modifikation
InfA For1	CAAGACCAATCYTGTCACCTCTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA For2	CAAGACCAATYCTGTCACCTYTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA Rev1	GCATTYTTGGACAAAVCGTCTACG*	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[®] exo Kit (TwistDX[™]) verwendet. Die für die RPA verwendeten Oligonukleotide sind für Influenza B in Tabelle 12 und für Influenza A in Tabelle @ref(tab:....) angegeben. Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 9) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzympellet zur Resuspendierung übertragen. Die Lösung

Tabelle 7: Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5'->3')	Konzentration	3'-Position	Modifikation
InfB For	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG*	16 μ M	716 bp	/
InfB Rev	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	16 μ M	818 bp	/
InfB-P	CCAATTCGAGCAGCTGAACTGCGGTG	8 μ M	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 8: Temperaturprotokoll für die Influenza PCR

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

* Messung der Fluoreszenz

wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion (46,5 μ l) wurden in eine Kavität eines 8-ter Messstreifens (Carl Roth) übertragen und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 μ l zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 μ l PCR reines H₂O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben, sowie 2,5 μ l 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 9: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes

Bestandteil	Konzentration	Volumen	Modifikation
Forward Primer	0,45 μ M		biomers.net GmbH
Reverse Primer	0,45 μ M		biomers.net GmbH
Sonde	0,13 μ M		biomers.net GmbH
RevertAid Reverse Transkriptase	10,75 U/ μ l		Thermo Fisher Scientific
RNase Inhibitor, Murine	1,08 U/ μ l		New England Biolabs
Rehydrations Puffer		29,5 μ l	TwistDX
PCR reines Wasser		x μ l \sum 46,5 μ 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, Bachmann, Spiegel, *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, Bachmann, Spiegel, *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 µl Gesamtvolumen auf 8 Reaktionen aufgeteilt und so ein neues Reaktionsvolumen von 6,5 µl erhalten. Für 8 Reaktionen wurde dabei insgesamt 40,8 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 10) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzympellet zur Resuspendierung übertragen. Die Zusammensetzung des in Tabelle 10 aufgeführten 50X PSM’s ist in Tabelle 11 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 µl pro Kavität) und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils pro Kavität 1 µl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 µl PCR reines H₂O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben. Darauf folgend wurden 15 µl Mineralöl (Carl Roth), welches die Evaporation des Reaktionsmixes während der Messung verhindert, in den Deckel jeder Kavität pipettiert. Als Letztes wurden 0,64 µl 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 Equilibationszeit 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.

Tabelle 10: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz

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

Tabelle 11: Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
Vorwärtsprimer	21 µM	Biomers
Rückwärtsprimer	21 µM	Biomers
Sonde	6 µM	Biomers

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 µl Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 40 °C getestet. Als Template-RNA wurden bei Influenza B 10^6 Kopien/µl des RNA-Standards eingesetzt. Bei Influenza A wurden 10^7 Kopien/µl (H1N1 Subtyp) des RNA-Standards verwendet.

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/µl. Das Temperaturoptimum bei Influenza A wurde im 50 µl Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/µl (H1N1 Subtyp) und einer 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-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/µl 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 µl Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 42 °C und einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration. Es wurden die Mischzeitpunkte 7 min, 5 min, 3min, 2 min, und 1,5 min nach Messbeginn bei einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/µl (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 µl Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 42 °C mit einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/µl (H1N1 Subtyp). Es wurde für die jeweiligen Messungen die Reverseprimer-Konzentration im hergestellten Reaktionsmix von 0,45 µM auf 0,675 µM und 0,9 µM 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/µl. Hierbei wurden die Reverseprimer-Konzentrationen im Primer-Sonden-Mix von 21 µM auf 31,5 µM und 42 µM 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 (Chen *et al.* 2010). Dieses Phänomen kann dazu verwendet werden um spezifisch Punktmutationen zu detektieren (Lázaro *et al.* 2021) aber auch auf die qPCR angewandt werden (Chen *et al.* 2010).

Um den Einfluss einer generellen erhöhten Primer-Konzentration innerhalb der Influenza B RPA zu untersuchen wurden die Primer-Konzentrationen verdoppelt. Die Messung erfolgte bei 40 °C im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) mit einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ 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 Reverse Primer 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/ μ 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 der Sensitivität erfolgte in dekadischen Verdünnungsstufen von $2 * 10^7$ RNA-Kopien/ μ l bis $2 * 10^0$ RNA-Kopien/ μ 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 Influenza B RT-RPA wurde jeweils im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) und im 8tel-Ansatz (siehe Kapitel 3.4.3) bei 40 °C, 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration und mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min gemessen.

Bei der Influenza A RT-RPA wurden die Sensitivität für den H1N1-Subtyp und den H3N2-Subtyp im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 3.4.2) bei 42 °C, 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-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 zu 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 Primerasymetrie 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-System verglichen.

4.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza B 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 notwendig, 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 24) 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 in einem Agarose-Gel auf überprüft (Kapitel 3.2.4). Das Kontrollgel (siehe Abbildung 8A) 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 24 im Anhang). Das unverdaute Kontrollplasmid in Spur 3 weist eine Bande bei weit über 4000 bp auf. 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 8B dargestellt. Es ergab sich eine Geradengleichung von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,99. Mithilfe der Gradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von $476.0 \pm 7,8$ ng/ml ermittelt und somit eine Kopienanzahl von $2,2 * 10^8$ RNA-Kopien/µl berechnet werden.

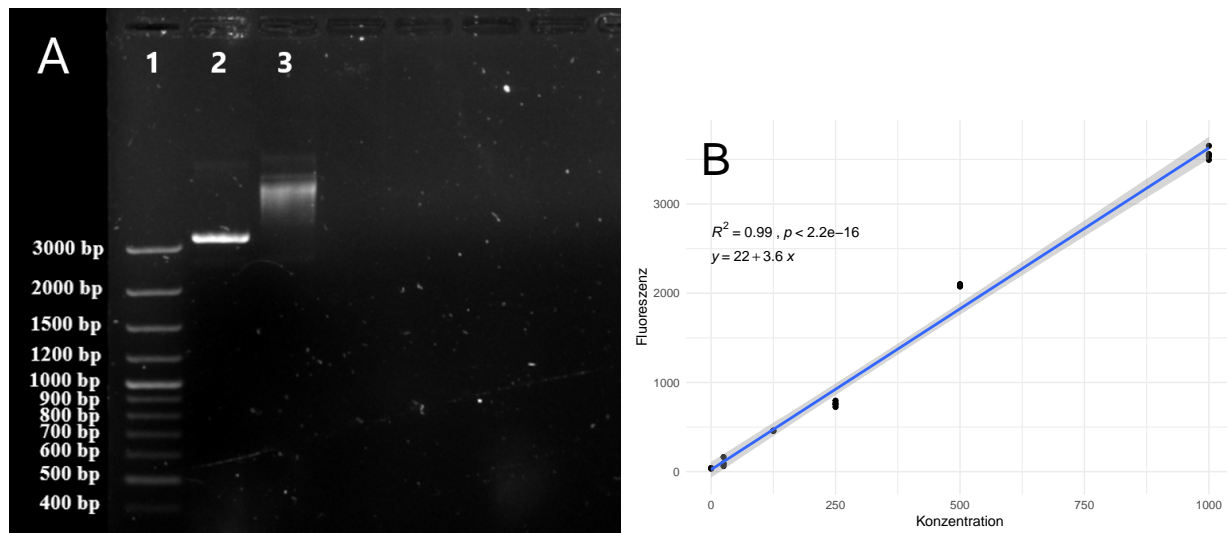


Abbildung 8: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdautem Plasmid (2), unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid 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 Influenza B RT-RPA Primer und Sonden

Für die Influenza B RT-RPA wurden mithilfe der Software PrimedRPA insgesamt 9 verschiedene Primer und 2 Sonden entwickelt. Die Sequenzen sind in Tabelle 12 mit entsprechenden Modifikationen und der 3'-Position auf der Virus-Sequenz (GenBank Nr.: MT637911) gezeigt. Aus den angegebenen Oligonukleotiden ergeben sich insgesamt 10 Primer-Sonden-Kombinationen. Davon bestehen 2 Kombinationen aus Sonde 1.1 mit Forward 1 und Reverse 1.1 und Reverse 1.2. Die 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 12: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA

Name	Sequenz (5'→3')	3'-Position	Modifikation
Sonde 3.1	GTTCCGTTTGACAATAAAAAGGGATATGCG 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	TTGAATGCATATGACCAGAGTGAAGGCTT	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	CTTGTATCCATTGGGGTGTGTTGAGGAATGT	574 bp	/
reverse 3.15	AGTTGATAAGGACTTGTATCCATTGGGGTG	586 bp	/

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

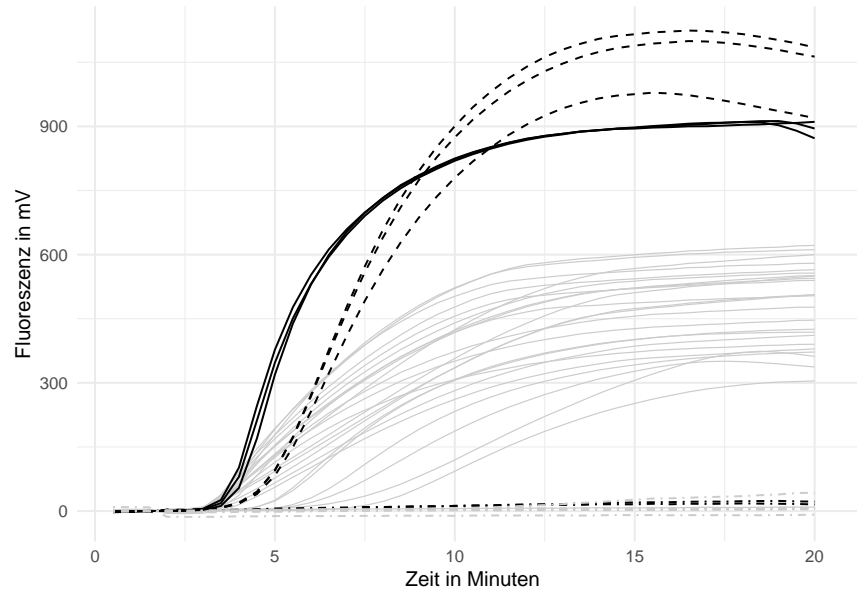


Abbildung 9: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 12 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.2 ist in **schwarz** (- - -) und die Kombination mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.1 in **schwarz** (—) dargestellt. Alle Negativkontrollen sind mit ($\cdot - \cdot$) gekennzeichnet.

Die entwickelten Primer-Sonden-Kombinationen wurden in einem Screening Verfahren mittels RT-RPA auf Amplifikation getestet (Kapitel 3.4.2) um die beste Primer-Sonden-Kombinationen. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 9 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich durch einen steileren Anstieg und höhere 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 $3,33 \pm 0,07$ min (Reverse 1.1) und $4,27 \pm 0,07$ min (Reverse 1.2). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 15 im Anhang gezeigt. 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 und 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 Influenza B RT-RPA

Verringerung des Reaktionsvolumen (low-volume Ansatz)

Für die Verringerung des Reaktionsvolumens, wurden das in 4.1.2 entwickelte Primer-Sonden-Set auf den low-volume Ansatz überführt (siehe 3.4.3). Die Fluoreszenzdaten der Messung zusammen mit einer Referenz (50 μ l Ansatz) sind in Abbildung 10 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die low-volume RPA (schwarz) im Vergleich zu der 50 μ l RPA (grau) im Verlauf der Reaktion an Fluoreszenzintensität verliert. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Anstiegszeit zwischen den beiden Reaktionsvolumen festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte liegen bei $3,36 \pm 0,01$ min (50 μ l RPA) und $3,47 \pm 0,14$ min (low-volume RPA).

Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 16 im Anhang gezeigt.

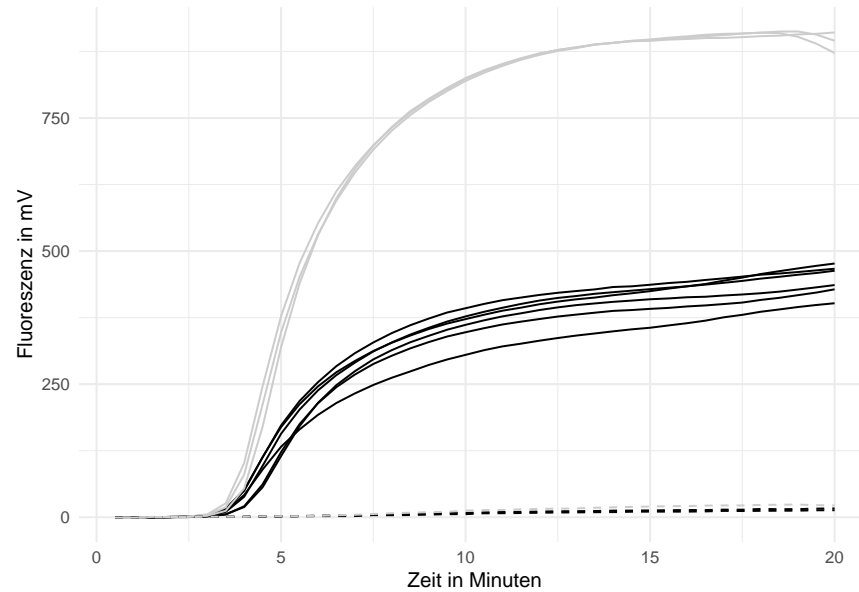


Abbildung 10: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im low-volume -Ansatz (**schwarz**) bei 40 °C in n=6 (siehe 3.4.3) mit dem in 4.1.2 entwickeltem Primer-Sonden-Set. Als Virus-RNA wurden 10^7 RNA-Kopien des hergestellten Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 µl Ansatz (**grau**) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Reaktionstemperatur

Die Optimierung der Reaktionstemperatur erfolgte im Temperaturintervall zwischen 38-42 °C (siehe 3.4.5). Die Fluoreszenzdaten der Messungen bei den verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 11A gezeigt. Die entwickelte Influenza B RT-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 $5,26 \pm 0,06$ min (38 °C), $3,57 \pm 0,20$ min (40 °C) und $3,63 \pm 0,13$ min (42 °C). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 17 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 bei der Messung bei 42 °C eine Abnahme der Fluoreszenz im späteren Verlauf der Reaktion (~13 min) zu beobachten. Ebenfalls zeigt die Messung bei 40 °C bei 4 von 7 Reaktionen eine Fluoreszenzabnahme, die setzt jedoch später bei ~16 min ein. Dieses Phänomen wird in der weiteren Arbeit als "Ditching" bezeichnet.

Einführung einer Reverse-Primer Asymetrie

Das Einführen einer Primer-Asymetrie sowie die Optimierung dieser wurde anhand des Reverse Primers wie in 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten der variierenden Primer-Konzentrationen sind in Abbildung 11B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine asymmetrisch 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 Mittelwerte der TT-Werte der einzelnen Parameter liegen bei $3,39 \pm 0,07$ min (Referenz), $3,43 \pm 0,07$ min (1,5 -fach Reverse Primer-Konzentration) und $3,63 \pm 0,13$ min (2 -fach Reverse Primer-Konzentration). Die mit dem roten Pfeil markierte Amplifikation konnte über den TT-Wert als Ausreißer identifiziert werden und wurde nicht weiter berücksichtigt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 18 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 1,5 -fach (schwarz) als optimal festgelegt.

Optimierung 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 3.4.6). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 12A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach drei Minuten (grau, durchgezogen) im Vergleich zu der Referenz (schwarz, durchgezogen) ohne Mischen zu signifikant höheren TT-Werten führt. Die TT-Werte liegen hier bei $5,90 \pm 0,19$ min (Referenz) und $7,21 \pm 0,70$ min (Mischen nach 3 min). Weiterhin weist der Anstieg der Reaktion im Vergleich 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 $5,04 \pm 0,19$ min eine signifikante Differenz zur Referenz auf. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sowie die einzelnen Mittelwerte der TT-Werte sind in Tabelle 19 im Anhang gezeigt. Wird der Mischzeitpunkt nach fünf Minuten betrachtet, besitzt

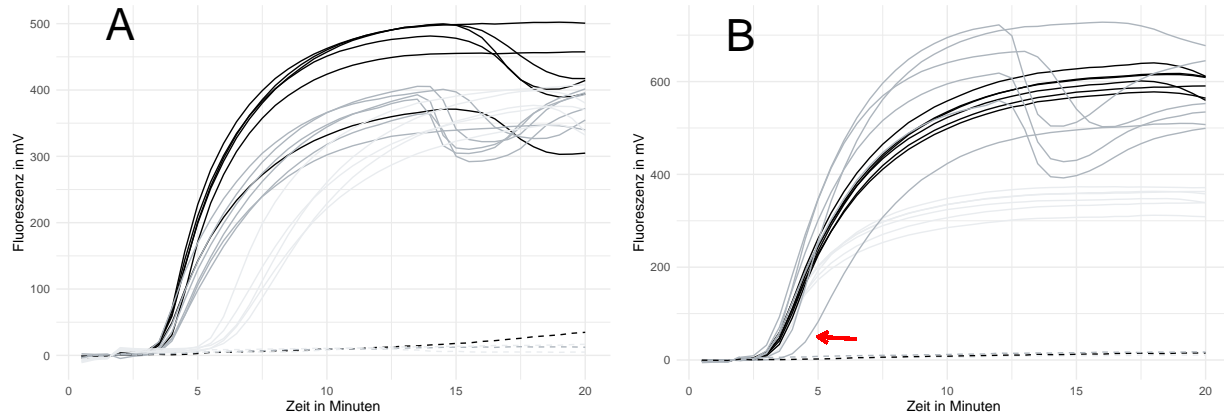


Abbildung 11: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerasymetrie:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im low-volume -Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (schwarz) und 42 °C (grau). Messung in n=6 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerasymetrie mit 1,5 -fach erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2 -fach erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=6 pro Konzentration. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

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 eingesetzten RNA-Konzentration von 10^2 Kopien/ μ l (siehe Abbildung 12B) und 10^1 Kopien/ μ l (siehe Abbildung 12C) durchgeführt (siehe 3.4.6). Bei 10^2 Kopien/ μ l besitzen die Reaktionen mit einem Mischschritt (schwarz) signifikant niedrigere TT-werte ($6,53 \pm 0,25$ min) als die Referenz (grau) ohne zusätzlichen Mischschritt ($7,35 \pm 0,58$ min). Die rechnerischen Daten des TT-Wert vergleichs sind in Tabelle 20 im Anhang gezeigt. Des Weiteren ist bei der Messung mit Mischschritt ein Ditching nach ~16 Minuten bei 6 von 7 Reaktionen zu beobachten.

Bei dem Versuch mit 10^1 Kopien/ μ l ist bei der Messung mit Mischschritt (schwarz) eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der Referenz (grau) ohne Mischen zu erkennen. Hier zeigt sich klar ein positiver Effekt des des Mischen auf die RT-RPA. Der eingeführte Mischschritt erhöht die Sensitivität der Reaktion von 3 von 7 positiv (Referenz) auf 7 von 7 Positiv. Da alle Messungen der Mischzeit im low-volume Ansatz durchgeführt wurden, wurde der Einfluss des Mischschrittes nach 5 min im 50 μ l Ansatz untersucht.

Zusammengefasst lassen sich für die Influenza B RT-RPA eine Reaktionstemperatur von 40 °C, eine 1,5 -fach asymmetrisch erhöhte reverse Primer-Konzentration und ein zusätzlicher Mischschritt nach fünf Minuten als optimal festlegen.

4.1.4 Einfluss der Primerasymetrie 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 13A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine generelle Erhöhung von

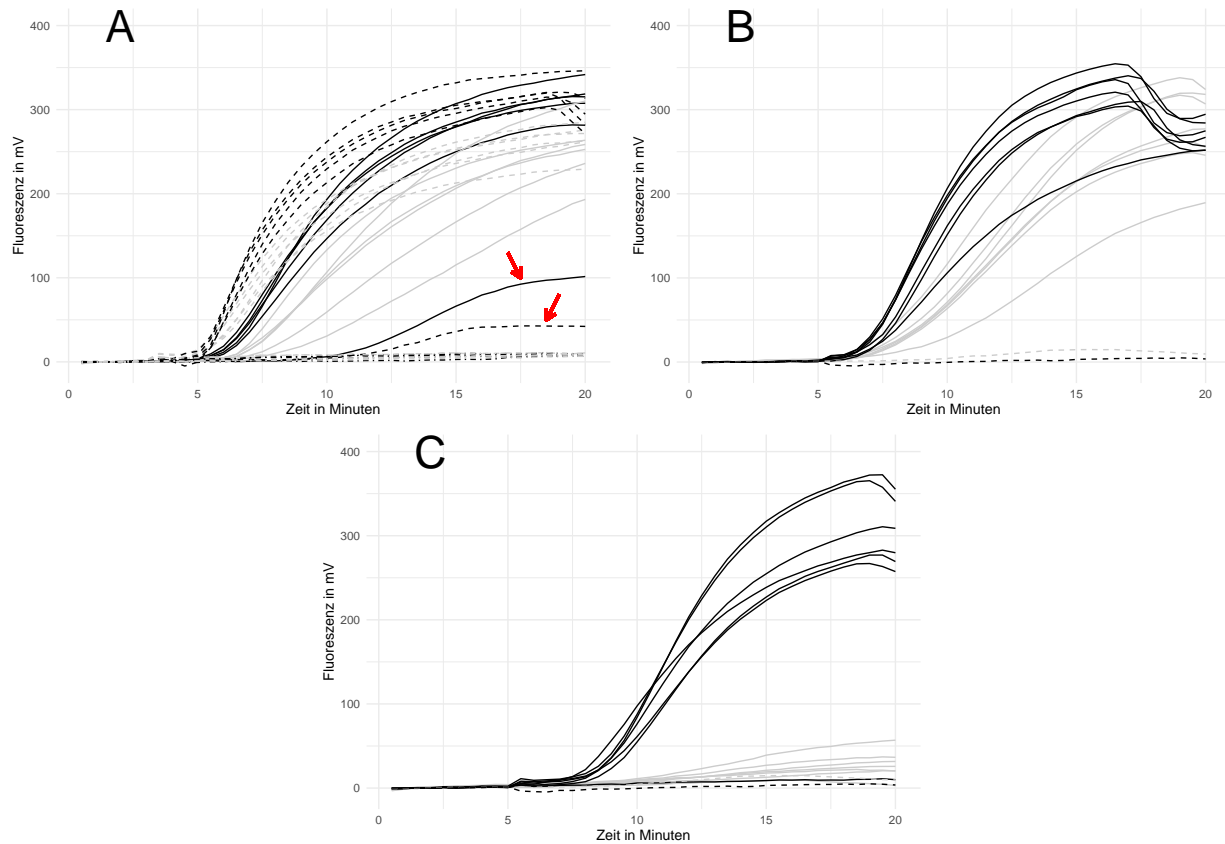


Abbildung 12: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Messung. **A:** RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (grau, durchgezogen), 4 min (grau, gestrichelt), 5 min (schwarz gestrichelt) sowie der Referenz ohne Mischen (schwarz, durchgezogen) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/μl. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Alle Messungen wurden in n=6 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (· - ·) dargestellt. **B** Vergleich zwischen der Influenza B RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschrittes nach 5 min (schwarz) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (grau) bei eingesetzten 10^2 RNA-Kopien/μl. Messung in n=7 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **C:** Vergleich zwischen der Influenza B RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschrittes nach 5 min (schwarz) und einer RT-RPA ohne zusätzliches Mischen (grau) bei eingesetzten 10^1 RNA-Kopien/μl. Messung in n=6 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Forward und Reverse Primer (grau) wieder zu einer niedrigeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer asymmetrischen Reverse Primer-Konzentration (schwarz) führt. Eine signifikante Veränderung der TT-Werte konnte nicht ermittelt werden. So liegen die TT-Werte für die Messung mit 2 -fach-Reverse Primer bei $3,40 \pm 0,14$ min und bei der Messung mit doppelter Primer-Konzentration bei $3,48 \pm 0,21$ min. 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 26 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-Asymmetrie 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 13B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass hier die erhöhte Reverse Primer-Konzentration (hellgrau) die niedrigste Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (grau) und der erhöhten Forward Primer-Konzentration (schwarz) zeigt. Die asymmetrisch erhöhte Forward Primer-Konzentration zeigt hingegen die höchsten Fluoreszenzwerte und dementsprechend die beste Signalgenerierung. Des Weiteren besitzt die erhöhte Forward Primer-Konzentration signifikant niedrigere TT-Werte mit $3,25 \pm 0,05$ min als die Referenz ($3,63 \pm 0,19$ min) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration ($3,76 \pm 0,34$). **Daraus resultierend besteht ein Zusammenhang zwischen der Hybridisierungsposition der Sonde und der Primerasymmetrie.** Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 27 im Anhang dargestellt.

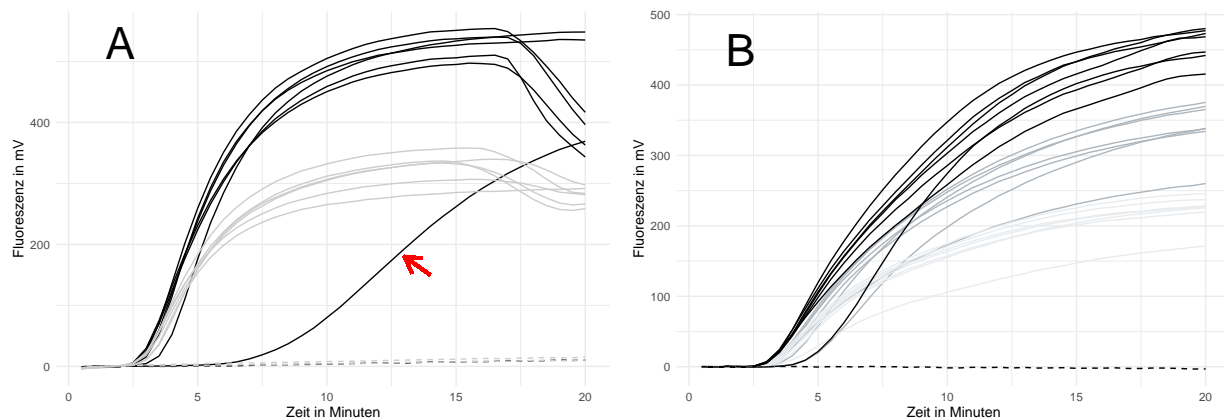


Abbildung 13: **Einfluss der Primerasymmetrie auf der RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA. **A:** Einfluss einer generellen Primer-Konzentrationserhöhung auf die Influenza B RT-RPA. Die doppelte Primer-Konzentration (jeweils $42 \mu\text{M}$ im PSM, siehe 3.4.3) ist in Grau 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 14 gezeigt. Für die Influenza B RT-RPA konnte berechnet werden, dass das System mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit 31,6 Virus RNA-Kopien detektieren kann. Des Weiteren konnte eine Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit mit einem $R^2 = 0,93$ und einer Geradengleichung von $y = 11 - 1,3x$ ermittelt werden. Der angegebene p-Wert ist $\ll 0,05$ was einen signifikanten linearen Zusammenhang aussagt.

Zusätzlich wurde die Sensitivität für den low-volume Ansatz der Influenza B RT-RPA mit den gleichen Reaktionsparametern ermittelt und ein Vergleich zu dem 50µl Ansatz gezogen. Die Messung erfolgte nach der beschriebenen Methode (siehe 3.4.9). Es konnte ein Detektionslimit von 14,6 Kopien ermittelt werden. Die erstellte Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit besitzt ein R^2 von 0,92 und eine Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$. Die über den Boxplot-Test (siehe 3.1.4) ermittelten Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 14B) wurden innerhalb der Kalibriergerade nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert ist ebenfalls $\ll 0,05$ was einen signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Für die RT-RPA im low-volume Ansatz konnte eine Verbesserung des Detektionslimits um 15 Kopien beziehungsweise 54 % nachgewiesen werden.

Damit ein Vergleich zur PCR als Standardmethode in der Diagnostik herangezogen werden kann wurde die in 3.4.1 beschriebene RT-PCR für das Influenza B Virus auf die Sensitivität getestet (Kapitel 3.4.9). Das Detektionslimit der RT-PCR liegt bei 11,4 Kopien. Somit liegt die Detektionsgrenze des PCR-Systems 22 % bzw. 3,2 Kopien unter der optimierten RPA im low-volume Ansatz. 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 im low-volume Ansatz 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. Eine Kreuzreaktivität mit dem humanen RNA-Probenhintergrund konnte nicht festgestellt werden.

Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Vergleich der verschiedenen Sensitivitätsmessungen der Influenza B RT-RPA

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

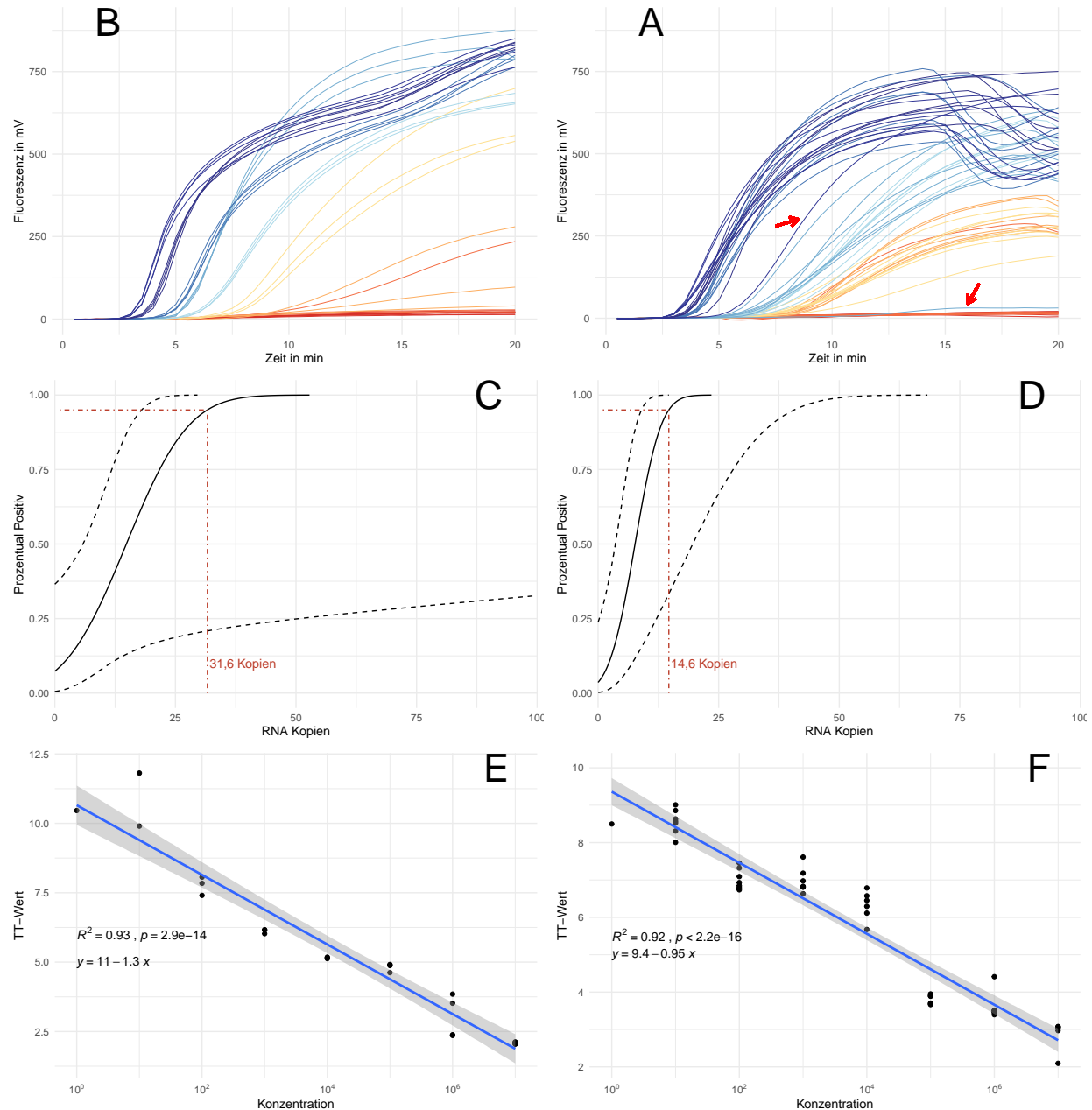


Abbildung 14: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA**: **A,B**: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 und 10^0 RNA-Kopien pro Messung sowie **Negativkontrollen** für den 50 µl Ansatz (A) und den low-volume Ansatz (B). Jede Verdünnung wurde mit mindestens n=3 (50 µl Ansatz) bzw. n=7 (low-volume Ansatz) gemessen. Ausreißer des low-volume Ansatzes bei 10^7 und 10^4 (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. **C,D**: Probit-Analyse der Amplifikationsdaten für den 50 µl Ansatz (C) und den low-volume Ansatz (D). Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, 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. **E,F**: Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß und p-Wert für den 50 µl Ansatz (E) und den low-volume Ansatz (F). Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte der Ausreißer sowie von negativen Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht dargestellt.

4.2 Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA

4.2.1 Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA

Damit die Gruppe der Influenza A Viren ausreichend untersucht und abgedeckt werden kann, wurden RNA-Standards von den aktuell vorherrschenden Subtypen H1N1 und H3N2 erstellt. 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-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 15 dargestellt. Die verdauten Plasmide zeigen eine DNA-Bande bei ~ 3300 bp. Dieses stimmt mit der Plasmidgröße von 3343 bp für beide Plasmide überein (siehe Plasmidkarten 25, 26 im Anhang). Die ungeschnittenen, mitgeführten Kontrollplasmide aus der vorherigen Plasmid-DNA Extraktion weisen 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 Puffer und Enzymrückständen befreit. Die reine, artifiziell erstellte virale RNA wurde im letzten Schritt nach mithilfe des RiboGreen-Assays quantifiziert (siehe 3.2.7). Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 15B dargestellt. Es konnte eine Geradengleichung von $y = -190 + 3,8x$ mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,99 ermittelt werden. Mithilfe dieser konnte für die artifiziell erstellten viralen RNA's Konzentration von $365,3 \pm 32,4$ ng/ml (H1N1-Subtyp) beziehungsweise $247,9 \pm 22,1$ ng/ml (H3N2-Subtyp) berechnet werden. Somit konnten entsprechende RNA-Kopienanzahlen von $2,0 \cdot 10^8$ (H1N1-Subtyp) und $1,4 \cdot 10^8$ (H3N2-Subtyp) Kopien/µl erhalten werden.

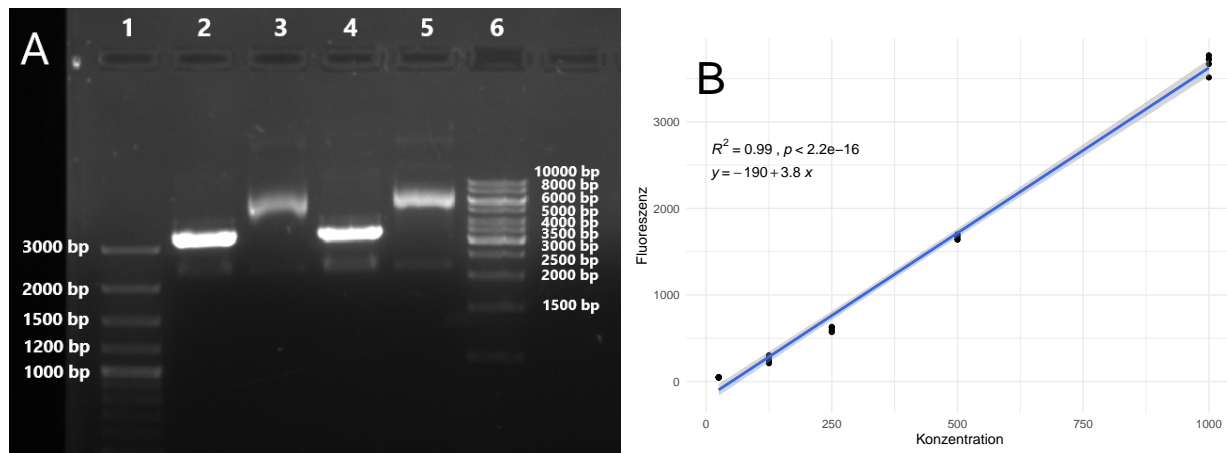


Abbildung 15: **Kontrollgel des Restriktionsverdau und RiboGreen Kalibrationsgerade der Influenza A Standardherstellung:** A: DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdautem Plasmids des H3N2 Standards (2) mit unbehandelter Kontrolle (3) sowie 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 Influenza A RT-RPA Primer und Sonden

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 des 3'-Endes auf der Referenzsequenz (H3N2-Subtyp; GenBank Nr.: MT244214) sind in Tabelle 14 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 14: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA

Name	Sequenz (5'→3')	3'-Position	Modifikation
Mit PrimedRPA designte Primer (siehe 3.1.1)			
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	CTTCTTACCGAGGTCGAAACGTATGTTCT	48 bp	
Forward 3	GGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACT	96 bp	
Reverse 1.1	GCACGGTGAGCGTGAACACAAACCCTAAAA	189 bp	
Reverse 1.4	TGGGCACGGTGAGCGTGAACAAACAAACCTA	192 bp	
Reverse 1.8	AGCGTCTACGCTGCAGCCCTCGCTCACTGG	219 bp	
Reverse 3.1	AAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACARAATTGG	161 bp	
Reverse 3.2	CCTAAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACAAARAT	164 bp	
Primer/Sonden modifiziert nach Ehnts (2013)			
Sonde E	TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAA 12 Y 3 TGTCACCTCTGACTAAGGG	186 bp	Fluorophor: FAM/ Atto-565 Quencher: BMQ-535**
Forward E	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGY	149 bp	
Forward E.2	RAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	148 bp	
Forward E.3	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	148 bp	
Reverse E	CGTCTACGCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA	216 bp	

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

Die insgesamt 8 Kombinationen wurden mittels eines Primerscreenings (siehe 3.4.4) auf Amplifikation getestet. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 16 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 wurde die Kombination um zwei weitere alternative Forward Primer (Forward E.2 und Forward E.3) ergänzt (siehe Tabelle 14). Die Fluoreszenzdaten der drei neuen Primer/Sonden-Kombinationen sind in Schwarz in Abbildung 16 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, durchgezogen). Ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten konnte nicht festgestellt werden. Somit liegt der Mittelwert der TT-Werte der Kombinationen bei $3,18 \pm 0,08$ min. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sowie die einzelnen Mittelwerte der TT-Werte sind in Tabelle 21 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.

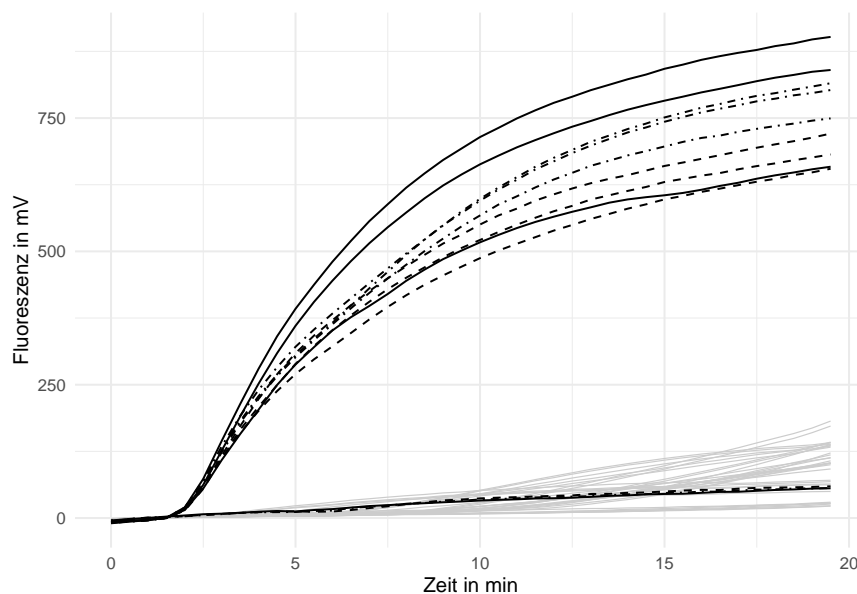


Abbildung 16: **Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 14 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen der mit PrimedRPA designten Primer und Sonden sind in **grau** dargestellt. 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 der Influenza A RT-RPA

Verringerung des Reaktionsvolumen (low-volume Ansatz)

Für die Optimierung des Reaktionsvolumen wurde das modifizierte Ehnts Primer/Sonden-Set (siehe 4.2.2) auf Amplifikation im low-volume Ansatz getestet (siehe 3.4.3). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 17 dargestellt. Zum Vergleich wurde eine RT-RPA im 50 µl Ansatz (siehe 3.4.2) mitgeführt. Es ist zu erkennen, dass im low-volume Ansatz die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum 50 µl Ansatz niedriger ausfällt. Des Weiteren geht im low-volume Ansatz die Sigmoidalität der Amplifikationskurve verloren und die Fluoreszenzverlauf nimmt Großteils einen linearen Anstieg an. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten des 50 µl Ansatzes ($3,17 \pm 0,12$ min) und des low-volume Ansatzes ($4,19 \pm 0,43$ min) ermittelt werden. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 22 im Anhang gezeigt. Somit besitzt der 50 µl Ansatz höhere Fluoreszenzwerte, einen zeitigeren Anstieg und einen typischere Amplifikationskurve als der low-volume Ansatz. Aus diesem Grund konnten wurde eine Reaktion im 50 µl Ansatz als optimaler gewählt.

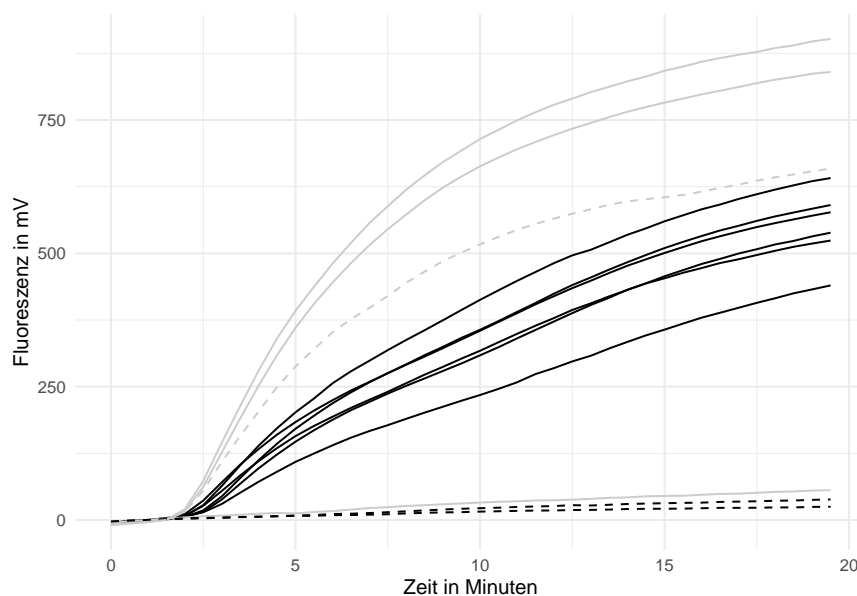


Abbildung 17: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im low-volume -Ansatz (**schwarz**) bei 42 °C in n=6 (siehe 3.4.3) mit dem in 4.2.2 angegebenen Primer-Sonden-Set. Als Virus-RNA wurden 10^8 RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 µl Ansatz (**grau**) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

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 18A 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 $3,69 \pm 0,11$ min einen signifikant zeitigeren Anstieg als die Reaktion bei 40 °C mit einem TT-Mittelwert von $4,28 \pm 0,12$ min. Die signifikant höchsten TT-Werte mit $4,76 \pm 0,11$ min wurden für die RT-RPA bei 38 °C ermittelt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 23 im Anhang 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 Primer-Konzentration mit den Parametern 1,5 -fach- und 2 -fach-Erhöht durchgeführt (siehe 3.4.7). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 18B 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 1,5 -fach 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 2 -fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration zu sehen. Ein Vergleich der TT-Werte war durch die begrenzte Probenanzahl der Doppelbestimmung nicht möglich. Jedoch liegen alle TT-Werte um $3,71 \pm 0,27$ min und keine markanten Unterschiede sind zu erkennen. Des Weiteren lässt sich bei der 2 -fach erhöhten reverse Primer-Konzentration ein anfängliches Ditching beobachten (markiert durch den roten Pfeil). Um dieses Phänomen bei zukünftigen Messungen zu vermeiden, wurden eine 1,5 -fach erhöhte Reverse Primer-Konzentration als Optimal festgelegt.

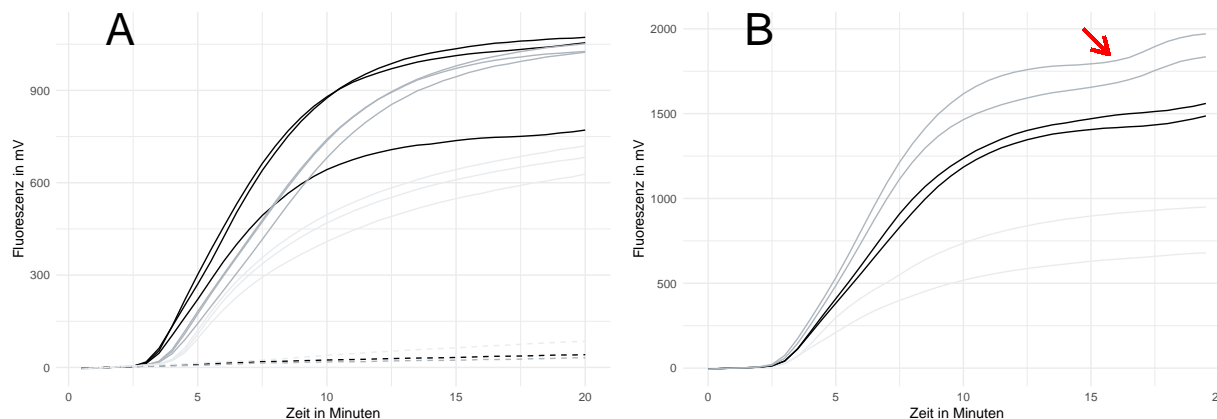


Abbildung 18: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie der Influenza A RT-RPA**. **A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 50 µl Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (grau) und 42 °C (schwarz). Messung in n=3 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerassymetrie mit 1,5 -fach erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2 -fach erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=2 pro Konzentration. Der rote Pfeil zeigt anfängliches Ditching bei der 2 -fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration.

Optimierung Mischen

Für die Optimierung des Mischschrittes für die Influenza A RT-RPA wurden 5 Messungen bei den Mischzeitpunkten 7 min, 5 min, 3 min, 2 min und 90 sek durchgeführt (siehe 3.4.6). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 19 gezeigt. Wie in Abbildung 19A 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 $15,04 \pm 1,53$ min signifikant höhere TT-Werte als die Referenz ($9,05 \pm 0,58$ min) auf. Des weiteren ist ein plötzlicher Abfall der Fluoreszenz bei den beiden Messreihen (markiert durch einen roten Pfeil) zu erkennen, welcher jedoch nicht als Ditching bewertet wird sondern von der Unterbrechung der Messung zusammen mit dem Mischschritt herrührt. Die Messungen mit einem Mischschritt nach 3 Minuten zeigen im Gegensatz zu den Messungen mit einem Mischen nach 5 min beziehungsweise 7 min ähnliche Fluoreszenzwerte wie die Referenz. Ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten konnte nicht festgestellt werden. Werden die Mittelwerte der beiden Messreihen mit $9,05 \pm 0,58$ min (Referenz) und $8,00 \pm 0,73$ min (Mischen nach 3 min) einzeln betrachtet ist ein zeitigerer jedoch nicht signifikanter Anstieg bei der Messreihe mit Mischen nach 3 min zu erkennen. In Abbildung 19B sind die Messreihen mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 90 sek und 2 min zusammen mit der Referenz gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach 90 Sekunden zu einer niedrigeren Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz führt und zusätzlich eher einen linearen Fluoreszenzverlauf während der Reaktion besitzt. Der Mischschritt nach 2 Minuten führt als einziger untersuchter Mischschritt zu einer höheren Fluoreszenzintensität am Ende der Messung als die Referenz. Bei dem Vergleich der TT-Werte zwischen den beiden Versuchsreihen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Betrachtet man allerdings die Mittelwerte der TT-Werte mit $7,77 \pm 0,34$ min (Mischen nach 2 min) und $9,05 \pm 0,58$ min (Referenz) einzeln, lässt sich, ähnlich wie bei dem Mischschritt nach 3 min, ein zeitigerer Anstieg bei dem Mischschritt nach 2 min erkennen. Dadurch und durch die höchsten Fluoreszenzintensitäten am Ende der Messung wurde ein Mischschritt nach 2 Minuten als Optimal festgelegt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 24 im Anhang gezeigt.

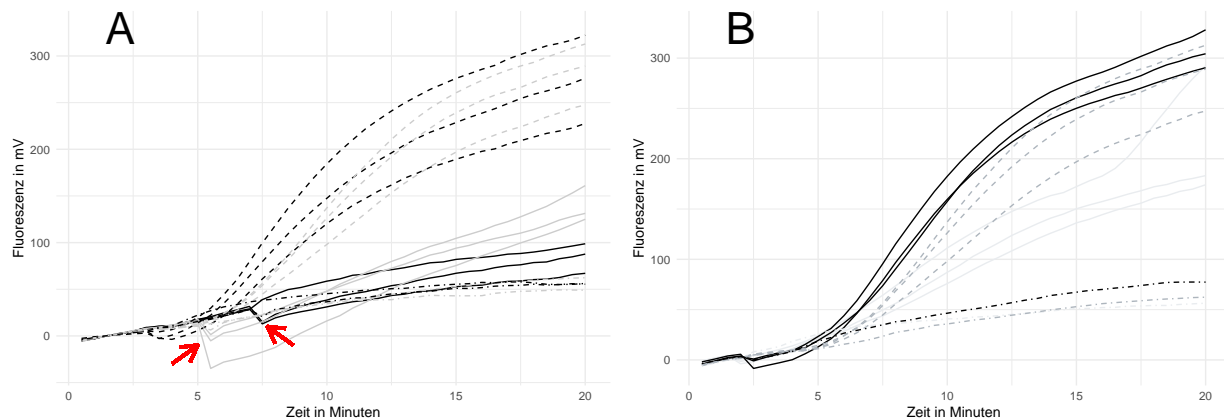


Abbildung 19: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Messung. **A:** RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (schwarz, gestrichelt), 5 min (grau, durchgezogen), 7 min (schwarz, durchgezogen) sowie der Referenz ohne Mischen (grau, gestrichelt) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l. Alle Messungen wurden in n=3 durchgeführt. Die Abnahme der Fluoreszenz nach dem Mischschritt ist mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit (· - ·) dargestellt. **B** Vergleich zwischen den Mischzeiten nach 90 Sek. (hellgrau) und 120 sek. (schwarz) mit angefügter Referenz ohne Mischen (grau, gestrichelt) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l. Alle Messungen wurden in n=3 durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (· - ·) dargestellt.

4.2.4 Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA

Die Sensitivitätsanalyse und das daraus resultierende Detektionslimit wurden mit den in Kapitel 4.2.3 ermittelten optimalen Reaktionsparametern für den H1N1- und H3N2-Subtyp berechnet (siehe 3.4.9). Dabei wurde der Schwellenwert für den p-Wert des Shapiro-Wilk-Test in Kapitel 3.1.3 auf 0,05 angepasst. Die Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessungen mit den linearen zusammenhängen der ermittelten TT-Werte sowie den berechneten Detektionslimits sind in Abbildung 20 dargestellt. Für beide Subtypen konnten jeweils 2 von 3 positive Amplifikationen bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von $2 \cdot 10^2$ Kopien/ μ l detektiert werden. Bei niedrigeren RNA-Konzentrationen konnten keine weiteren positiven Amplifikationen erfasst werden. In dem Fluoreszenzdaten für den H1N1-Subtyp (siehe Abbildung 20A) ist ein linearer Anstieg der Fluoreszenz bei der eingesetzten RNA-Konzentration von 10^1 Kopien/ μ l zu beobachten (markiert mit rotem Pfeil), welcher eine maximale Fluoreszenzintensität von über 950 Einheiten erreicht. Dieser konnte jedoch nicht als positiv ermittelt werden, und es liegt die Vermutung nahe, dass der Anstieg einem Messfehler des Gerätes zugrunde liegt. Der Zusammenhang der TT-Werte über die Zeit lässt sich für beide Subtypen mit der linearen Gleichung von $y = 11 - 1,2x$ beschreiben. Der Messfehler sowie generell negative Amplifikationen wurden hierbei vernachlässigt. Bei beiden Subtypen liegt der ermittelte p-Wert $\ll 0,05$, was einen starken und signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression liegt jeweils bei $R^2 = 0,79$ (H1N1-Subtyp) und $R^2 = 0,69$ (H3N2-Subtyp). Das mithilfe der Probit-Analyse berechnete 95 %-ige Detektionslimit für die Influenza A RT-RPA liegt für beide Subtypen bei 251,1 RNA-Kopien.

Damit ein Vergleich zur PCR als Standardmethode in der Diagnostik herangezogen werden kann wurde das Detektionslimit (siehe 3.4.9) für beide Subtypen von dem in 3.4.1 beschriebene RT-PCR System für das Influenza A Virus ermittelt. Die berechneten 95 %-igen Detektionslimits liegen bei 13,1 RNA-Kopien (H1N1-Subtyp) und 32,2 RNA-Kopien (H3N2-Subtyp). Dies entspricht einer Verbesserung von 238 Kopien für den H1N1-Subtyp beziehungsweise 219,9 Kopien für den H3N2-Subtyp.

Wie in Kapitel 4.1.5 anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden konnte, führt ein humaner Probenhintergrund zu einer Verringerung des Detektionslimits. Um dies für die Influenza A RT-RPA zu bestätigen und zu untersuchen, wurde eine Sensitivitätsanalyse mit simulierten Kontrollproben (siehe 3.3) durchgeführt. Dabei wurde neben der Negativkontrolle mit zugesetztem Wasser eine Kontrollprobe ohne zugesetzte Influenza A RNA mitgeführt um Kreuzreaktionen mit der humanen RNA zu untersuchen. Es konnte

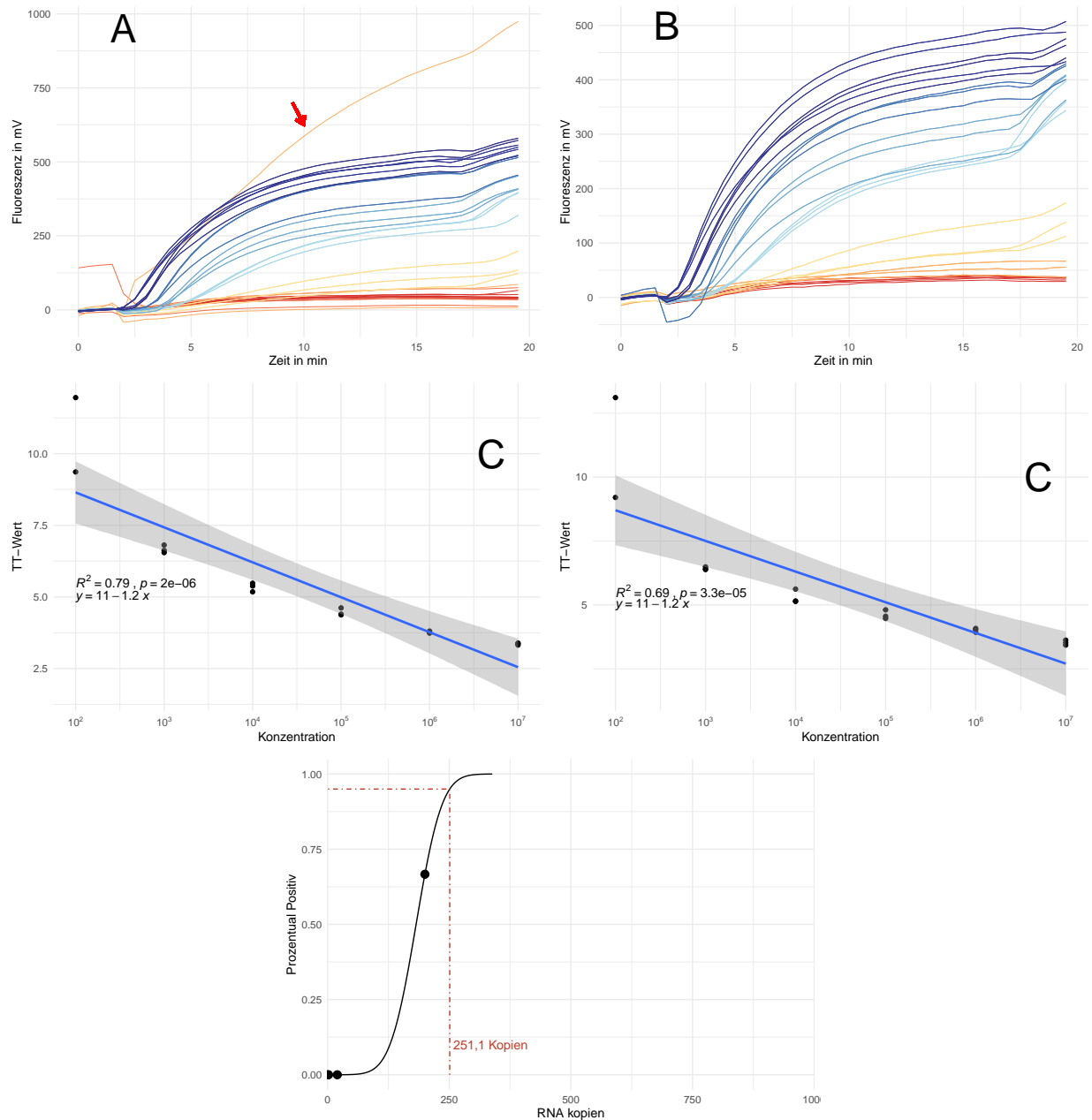


Abbildung 20: **Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA**: **A,B**: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 und 10^0 RNA-Kopien pro Messung mit dem H1N1-Standard (A) und dem H3N2-Standard (B) sowie **Negativkontrollen**. Jede Verdünnung wurde mit $n=3$ gemessen. Ausreißer bei 10^7 und 10^4 (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. **C,D**: Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß und p-Wert für den H1N1-Standard (C) und den H3N2-Standard (D). Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte von negativen Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht gezeigt. **E**: Probit-Analyse der Amplifikationsdaten für den H1N1 und H3N2-Standard. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, die Probit-Regression der RT-RPA. Die rot gestreifte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind.

4.2.5 Einfluss des Sondendesigns auf die RT-RPA

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben können Sonden für die RT-RPA als *internally Quenched* und als *dt-Quenched* modifiziert werden. Damit untersucht werden kann, ob das unterschiedliche Sondendesign einen Einfluss auf die RT-RPA hat wurde eine Influenza RT-RPA mit beide Sondentypen durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 21 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die *dt-quenched* Sonde höhere fluoreszenzwerte im Verlauf der Reaktion annimmt. Des Weiteren zeigt die Negativkontrolle der *internally Quenched* Sonde ein leicht steigendes unspezifisches Signal-Rauschen, während das Rauschen *dt-quenched* Sonde deutlich darunter liegt. Des Weiteren lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten mit $4,89 \pm 0,07$ min (*internally Quenched*) und $4,53 \pm 0,05$ min (*dt-Quenched*) feststellen. Somit lässt sich sagen, dass die *dt-Quenched* Sonde generell zu einer besseren Fluoreszenz und zu einem zeitigeren Signal führt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle 25 im Anhang gezeigt.

Um den Effekt der *dt-Quenched* Sonde auf die Sensitivität zu untersuchen wurde eine Sensitivitätsanalyse analog zu Kapitel 4.2.4 mit der *dt-Quenched* Sonde durchgeführt. Mit der neuen Sonde konnten alle Reaktion mit einer RNA-Ausgangskonzentration von $2 \cdot 10^2$ Kopien/ μ l als positiv Detektiert werden. Dem entsprechend liegt das 95 %-ige Detektionslimit für beide Subtypen bei 147,5 RNA-Kopien. Das entspricht einer Sensitivitätsverbesserung von 61 % für den H1N1 Subtyp beziehungsweise 49 % für den H3N2 Subtyp.

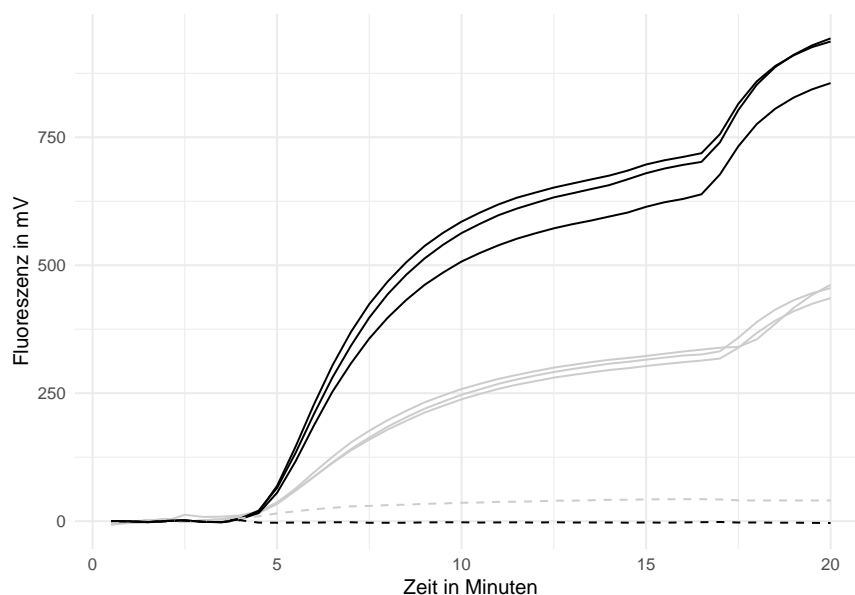


Abbildung 21: **Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Vergleichs zwischen der *internally Quenched* Sonde (grau) und der *dt-quenched* Sonde (schwarz, Modifikationen siehe Abbildung 7) mithilfe der Influenza A RT-RPA. Die Messung wurde dabei mit den in Kapitel 4.2.3 festgelegten optimalen Reaktionsparametern bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l (H1N1-Standard) in $n=3$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

5 Diskussion

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

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

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

5.1 Design der Primer und deren Einfluss auf die RT-RPA

Bei der Wahl des Amplifikationbereiches für die Influenza B RT-RPA wurde sich für das Genomsegment 8 entschieden. Dabei wurde sich an der Literatur von RT-PCR Systemen orientiert (Goffard *et al.* 2008; NCIRD 2021). Da bei Influenza B im gegensatz zu Influenza A eine geringere Mutationsrate vorliegt und zusätzlich keine großen Antigenen veränderungen der Oberflächenproteine beobachtet wurden (Paterson *et al.* 2003; Chen & Holmes 2008) konnten wie in Kapitel 3.1.1 angegeben keine Differenzen zwischen verschiedenen Stämmen in dem entsprechenden Genomsegment festgestellt werden. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der gewählte Amplifikationsbereich geeignet ist alle Viruslinien zu Detektieren. Dieses wird durch @Nakauchi2014 bestätigt, welcher für die Differenzierung von der Victoria- und Yamagata-Linie das HA-Protein auf dem Genomsegment 4 verwendet [@Nakauchi2014].

Als Amplifikationsbereich für die Influenza A RT-RPA wurde das M1-Gen auf dem Genomsegment 7 gewählt, da es durch seine Funktion das am stärksten konservierte Gen ist (McCauley & Mahy 1983). Zusätzlich wurde sich an der Literatur für RT-PCR Systeme orientiert welche ebenfalls das M1-Gen zur Detektion Amplifizieren (Daum *et al.* 2007; Suwannakarn *et al.* 2008; NCIRD 2021). Trotz der konserviertheit des Gens besitzt das Alingment zwischen den Subtypen H1N1 und H3N2 etliche Basenfehlpaarungen, wobei die größte Homologie im Bereich zwischen 10 bp und 250 bp zu beobachten ist (siehe Abbildung 22). Aus diesem Grund befinden sich alle vom PrimedRPA designten und von Ehnts (2013) entwickelten Primer (siehe Tabelle 14) in diesem Bereich.

Um die Basenfehlpaarungen auszugleichen wurden wie in Kapitel 3.1.1 degenertierte Basen in den Primern und Sonden eingeführt, welche die Hybridisierung erleichtern und somit die Amplifikation verbessern (Linhart & Shamir 2005). Einen anderen Ansatz verfolgte Liang *et al.* (2022), welcher zur Detektion der beiden Subtypen innerhalb einer RT-RPA zwei verschiedene Genomsegmente wählte (Liang *et al.* 2022). Dies hat jedoch den Nachteil, dass Liang *et al.* (2022) zwei getrennte Reaktionen zum Nachweis der Influenza Viren benötigt, während während die in dieser Arbeit entwickelte Influenza A RT-RPA nur eine Reaktion für ein aussagekräftiges Ergebniss erfordert.

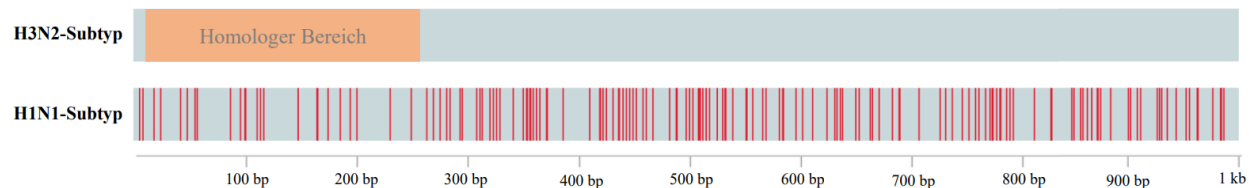


Abbildung 22: **Alignment zwischen den Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyp:** Alignment des Genomsegmentes 7 zwischen dem H1N1-Subtyp und dem H3N2-Subtyp. Der unterste Balken gibt die Sequenzlänge in bp an. Die roten Striche stehen für Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Genomsegmenten. Der orange markierte Bereich gibt den Sequenzabschnitt mit der größten Homologie an.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, sind die vom PrimedRPA Programm designten Primer für das Influenza A Virus aufgrund ihrer niedrigen Fluoreszenz und ihres späten Anstiegs unfunktionell. Betrachtet man hingegen das Primerscreening für die Influenza B RT-RPA (siehe Abbildung 9) zeigen alle entwickelten Primer-Sonden-Kombination eine Amplifikation und sind theoretisch funktionell. 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 zwei nicht vollständig Homologe Sequenzen als Vorlage verwendet wurden. Dies führte dazu, dass die entwickelten Primer und Sonden bis zu 3 Basenfehlpaarungen je nach Subtyp aufwiesen. Jedoch konnte in der Literatur gezeigt werden, dass bis zu 6 Fehlpaarungen in den Primer die RPA nicht unfunktionell werden lassen (Boyle *et al.* 2013). Des Weiteren wurde durch Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015) gezeigt, dass vorallem Mismatches am 3' und 5'-Ende des Primers die RPA inhibieren, welche nur bei dem Forward 1 Primer auftrat und durch eine degenerierte Base teilweise vermieden wurde (Daher *et al.* 2015; Higgins *et al.* 2022). Interessanterweise besitzt das von Ehnts (2013) am 3'-Ende eine Basenfehlpaarung, welche ebenfalls durch eine degenerierte Base ausgeglichen wurde. Jedoch besitzt diese Primer-Sonden-Kombination von allen getesteten Kombinationen die beste Amplifikation. Durch die alternativen forward Primer (E.2 und E.3) wurde probiert diese Fehlpaarung zu gänzlich zu vermeiden, jedoch liegt die Amplifikation nahezu gleich bzw. leicht hinter den von Ehnts (2013) entwickelten Primern und Sonde. Dies spricht gegen die Beobachtungen Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015) jedoch wurden in den beiden Studien nur Fehlpaarungen in den Primer untersucht (Daher *et al.* 2015; Higgins *et al.* 2022). Liu *et al.* (2019) konnte zeigen, dass Mismatches in der Sonde zu einer vollständigen Inhibierung und sogar zu falsch positiven Amplifikationen der RPA führen können (Liu *et al.* 2019). Das könnte eine Erklärung zur großen Diskrepanz, zwischen dem von Ehnts (2013) entwickelten RPA-System und dem mit PrimedRPA designten Primer-Sonden-Kombinationen sein. Eventuell führt die Verteilung der Basenfehlpaarungen in den PrimedRPA-Sonden zu einer unfunktionellen RT-RPA während die von Ehnts (2013) entworfene Sonde nur bedingt inhibierende Fehlpaarungen aufweist. Des Weiteren ist bei dem Primerscreening der Influenza B RT-RPA (siehe Abbildung 9) am Beispiel der beiden getesteten Sonden zu erkennen, dass nicht nur Basenfehlpaarungen sondern auch andere Einflüsse zu unterschiedlicher 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 die Amplifikation behindern (Saisuk *et al.* 2019). So konnte Beispielsweise Wei & To (2003) innerhalb einer PCR zeigen, dass eine RNA-sekundärstruktur trotz der hohen Temperaturen in der PCR die Amplifikation inhibierte (Wei & To 2003).

Betrachtet man die Hybridisierungsposition der für die Influenza A RT-RPA entwickelten Primer und Sonden

liegen diese am Anfang der der Genomsequenz bei ~50 bp bis ~ 200 bp (siehe Tabelle 14). Wie in Kapitel 2.2.1 erwähnt sind die jeweiligen Enden eines Genomsegmentes komplementär zueinander und bilden im Virion eine Loop-Struktur aus (Modrow *et al.* 2010). Somit kann diese Loop-Struktur *in vitro* eventuell die Amplifikation der Influenza A RT-RPA inhibieren, da der Amplifikationsbereich am Anfang der Genomsequenz liegt. Damit lässt sich der Unterschied zwischen der Influenza A RT-RPA und der Influenza B RT-RPA erklären, da bei der Influenza B RT-RPA der Amplifikationsbereich mittig in der Genomsequenz zwischen ~650 bp und ~730 bp liegt und ist somit von der Loop-Struktur nicht beeinflusst wird.

Ausblick Primerdesign -> mismatches durch H1N1 und H3N2 (evtl. anderes Target diskutieren, polymerase oder so)

-> alternativen diskutieren (gleiche sonde aber 2 Primer paare, wie die PCR das gemacht hat)

5.2 Vorteile der low-Volume RPA hinsichtlich Mischzeitpunkt und Sensitivität

Wie in 2.4.5 erwähnt kommt es während der RPA durch geringe Thermische Konfektion und durch den crowding Agent erschwerte Diffusion zu lokaler Reagenzien-Knappheit. Um dem entgegen zu wirken, wird eine zusätzlicher Mischschritt während der Reaktion durchgeführt, welcher zu einer erneuten homogenisierung der Reaktion führt (Lillis *et al.* 2016). Lillis *et al.* (2016) konnte jedoch zeigen, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens auf 5 µl die Notwendigkeit des zusätzlichen Mischschrittes minimiert (Lillis *et al.* 2016). Wie in 4.1.3 gezeigt, konnte ein ähnliches Verhalten mit der low-Volume RPA anhand der Influenza B RT-RPA beobachtet werden. Hier wurde das Reaktionsvolumen auf 6,5 µl angepasst was einem leicht höheren Volumen als dem von Lillis *et al.* (2016) entspricht. Jedoch stellt sich im Vergleich zwischen den Mischzeiten des 50 µl Ansatzes und der low-volume RPA heraus, dass der Mischschritt bei der low-volume RPA erst einen deutlichen Einfluss bei 10^1 RNA-Kopien auswirkt (siehe Abbildung 12) und die maximale Fluoreszenz und die Anzahl der positiven Amplifikationen deutlich verbessert. Im 50 µl Ansatz hingegen kann schon eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenz und eine große Verbesserung des TT-Wertes bei 10^4 RNA-Kopien beobachtet werden. Diese Beobachtung stimmen mit den von Lillis *et al.* (2016) überein. 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 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 konnte anhand der Influenza B RT-RPA beobachtet werden, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens zu einer deutlichen Sensitivitätserhöhung von über 50 % führt. Der gleiche Effekt konnte, wenn auch nicht so stark konnte ebenfalls durch Lillis *et al.* (2016) nachgewiesen werden. Ob es sich hierbei um eine signifikante Änderung handelt muss in einer weiteren Versuchsreihe bestätigt werden, da das Detektionslimit in dieser Arbeit für den 50 µl Ansatz nur in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Dieses Phänomen der Sensitivitätsverbesserung lässt sich ebenfalls durch das erhöhte Verhältnis zwischen eingesetzter Probe und RPA-Reaktion und der erhöhten Konvektion erklären.

Zusätzlich bietet die low-volume RPA den Vorteil der Kostenreduzierung, da aus einer kommerziell erhältlichen Reaktion acht Tests durchgeführt werden können (siehe 3.4.3). Dies macht die low-volume RPA gerade für ressourcen limitierte Umgebungen attraktiv, da sie geringe Kosten pro Test zusammen mit einfacher Handhabung, durch die gesteigerte Unabhängigkeit des Mischschrittes, hoher Sensitivität sowie robusten Reagenzien (Lillis *et al.* 2016) kombiniert (Jiang *et al.* 2021).

Durch das verringerte Reaktionsvolumen von 6,5 µl eignet sich die low-Volume RPA für den Einsatz in der Mikrofluidik, wo sie mit 3D-gedruckten Detektionschips kombiniert werden kann (Behrmann, Hügler, *et al.* 2020). Dadurch erweitern sich ihre Applikationsmöglichkeiten in der POCT und Testsysteme können vereinfacht und verbessert werden (Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* 2020).

Es konnte beobachtet werden, dass große Mengen an DNA die RPA inhibieren (Rohrman & Richards-Kortum 2015; Li *et al.* 2019), diese Inhibition ist jedoch Konzentrationsabhängig (Clancy *et al.* 2015). Dies könnte die low-volume RPA einschränken, da durch das erhöhte Proben/RPA-Verhältnis auch die Konzentration von humaner Hintergrund-DNA steigt und somit die RPA inhibiert. Zusätzlich konnten die positiven Effekte der low-Volume RPA nur anhand der Influenza A RT-RPA beobachtet werden. Eine Adaption an die low-volume RPA für die Influenza A RT-RPA konnte durch die höheren TT-Werte und linearen Amplifikationsverlauf, welcher auf eine schlechte Kinetik deutet, da keine exponentielle Amplifikation mehr vorliegt, nicht erreicht werden. Dementsprechend lässt sich sagen, dass die low-volume RPA nicht für alle RPA-Assays adaptierbar ist und somit die Applikation eingeschränkt wird. Des Weiteren wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens nur bei RNA-Viren beschrieben (Lillis *et al.* 2016), wodurch eine Adaption auf DNA-basierte Amplifikationen noch unklar ist.

noch mal nen Abschluss satz schreiben ob jetzt low-volume Toll oder nicht ist oder das lieber in der Zusammenfassung/Ausblick

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

5.3 Diskussion Sensitivitäten

Wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben liegt das Detektionslimit der optimierten low-Volume RT-RPA für den Influenza B Virus bei 14,6 RNA-Kopien. Im Vergleich zu der getesteten RT-PCR von NCIRD (2021) konnte eine Differenz von nur 3 Kopien festgestellt werden. Allerdings befinden sich hier die Sensitivitätsmessungen bei beiden Systemen im Bereich von $2 \cdot 10^0$ RNA-Kopien. In diesen Sensitivitätsbereich spielen einerseits die zufällige Diffusion eine Rolle und bestimmt ob die einzelnen Reaktionskomponenten miteinander interagieren. Andererseits minimale Ungenauigkeiten bei der Verdünnung der RNA-Standards, welche dazu führen, dass keine nachweisbaren RNA-Kopien . Dies lässt sich in Abbildung @ref(fig:...) beobachten. Hier zeigt eine Amplifikation, bei welcher durch zufällige Diffusion die Reaktionskomponenten miteinander interagieren konnten, einen deutlichen Anstieg, während alle anderen Amplifikationen gar keine Signalveränderung aufweisen. Bei dem Vergleich der optimierten

-> Methode diskutieren

5.4 Diskussion Asymmetrie

5.5 Diskussion Sondeneinfluss

5.6 Diskussion ditch

Temperatur und Ditching

Glökler *et al.* (2021) -> RPA als vorherrschende und beste Methode, da sie viel kombiniert (großer Vergleich mit anderen isothermen Amplifikationen) Lutz *et al.* (2010) ditch erstmals erwähnt Faye *et al.* (2021) dt Probe design

- Primer design
 - Influenza B (gibt nicht viel zu diskutieren, hat super geklappt)
 - > warum gewähltes target
 - Influenza A (warum hat es nicht geklappt)
 - > genomstruktur (macht sone schleife, mal in eigenhybridisierungs ding hauen)
- Optimierungen (warum wurden die Parameter so gewählt)
 - Influenza A
 - Influenza B -> lab on Chip mit 8tel Ansatz
 - wie wichtig ist Mischen am Beispiel in InfB
- Sensitivitätsanalysen
 - Vergleich mit PCR
 - Vergleich 50µl und 8tel-Ansatz -> welche Vorteile hat 8tel-Ansatz
 - Sensitivität im Klinischen Background reicht das für klinische Proben
- Spezifität
- R-Programm
 - unterschiede zwischen RPA und PCR
 - > Mischen (evtl. Lücke in den Daten)
 - > Negativkontrolle (leichter linearer Anstieg)
 - > Überexponentielle Amplifikation oder linearer Anstieg (nicht immer Sigmoidale Kurve, hängt mich dem Mechanismus zusammen)
 - > ditching
 - Wie wirken sich die Unterschiede auf die Tests aus
 - > Normalverteilung (sehr wichtig, kann aber auch bei PCR sein, wurde nicht getestet)
 - > linear Regression test (wird rausgelassen)
 - > resids growth test
 - mögliche Lösungen
 - > algorhytmus für ditching
 - > normalverteilung anpassen
 - > threshold diskutieren

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

6 Anhang

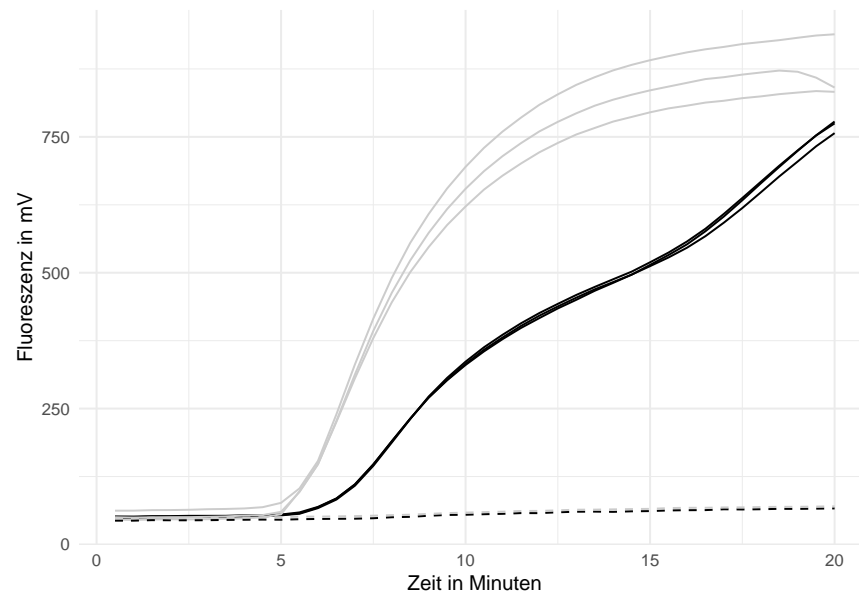


Abbildung 23: **Einfluss eines Mischschrittes nach 5 min auf die Influenza B 50 µl RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 50 µl Ansatz mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min (**grau**) und ohne zusätzliches Mischen (**schwarz**). Die Messung erfolgte bei 40 °C. Als Ausgangsmaterial wurden 10^4 RNA-Kopien eingesetzt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Tabelle 15: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 9

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-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 16: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 10

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-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 17: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 11A

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 ⁻¹⁰
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 ⁻¹⁰	s ***
38 °C	42 °C	−1,89	−1,38	p = 9,13 *10 ⁻¹⁰	s ***
40 °C	42 °C	−0,18	0,28	p = 0,81	ns
<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 11B

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referenz	n=6	3,39 ± 0,07	p = 0,46	p = 0,11	p = 0,62 (ns)
1,5X Rev.	n=5	3,43 ± 0,07	p = 0,39		
2X Rev.	n=6	3,45 ± 0,17	p = 0,64		

Notiz: ns = nicht Signifikant; s = signifikant
* p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001

Tabelle 19: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 12A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referez	n=5	6,00 ± 0,15	p = 0,13	p = 0,21	p = 2 *10 ⁻³
Mischen (3 min)	n=6	5,13 ± 0,21	p = 0,15		
Mischen (4 min)	n=5	5,11 ± 0,30	p = 0,92		
Vergleich der Gruppen					
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 ⁻³	s **
Notiz: ns = nicht Signifikant; s= signifikant; untr.Konfid. = unteres Konfidenzintervall; obrs.Konfid. = oberes Konfidenzintervall * p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001					

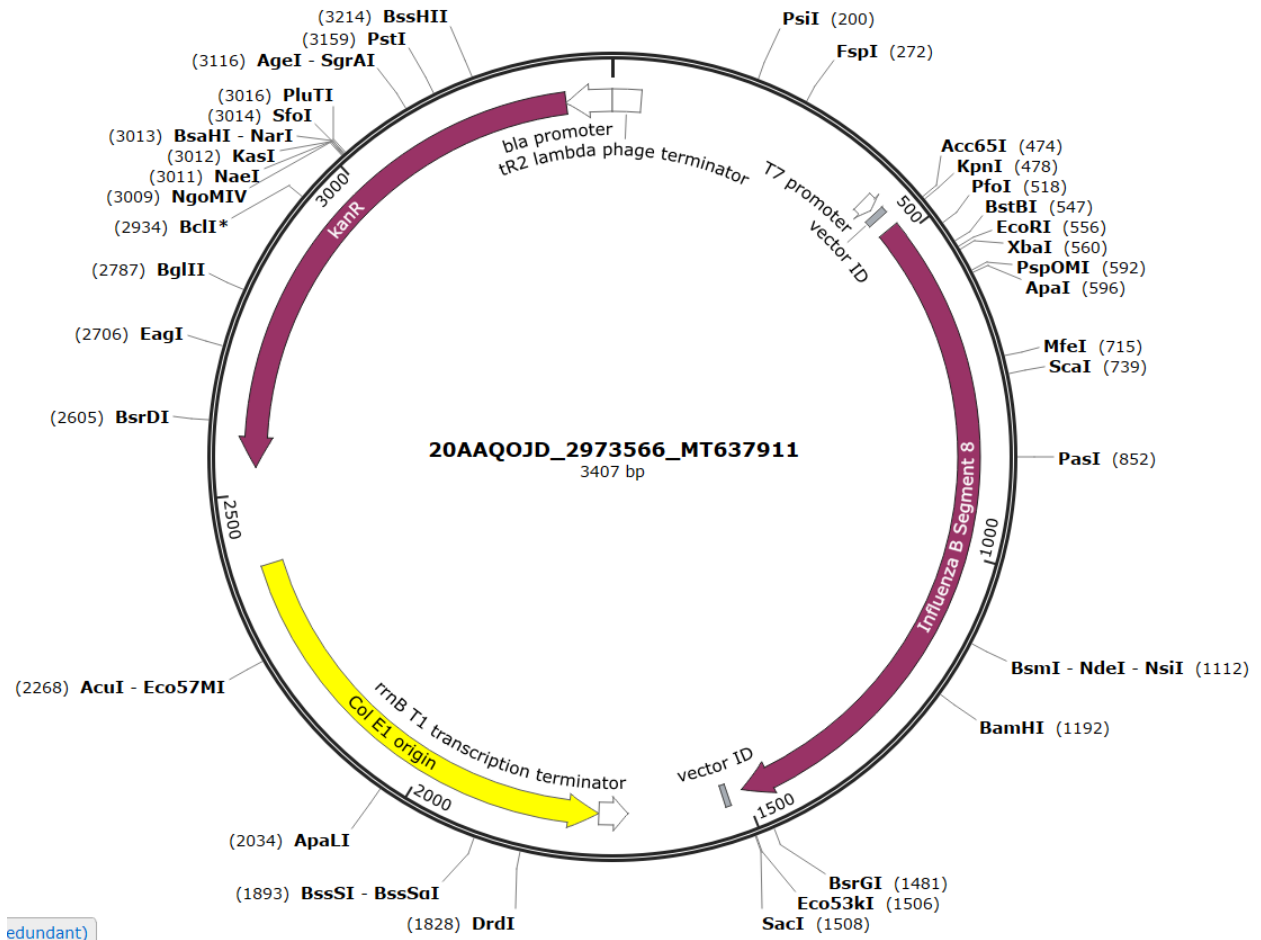


Abbildung 24: Plasmidkarte des Influenza B Plasmides für den Influenza B RNA-Standard

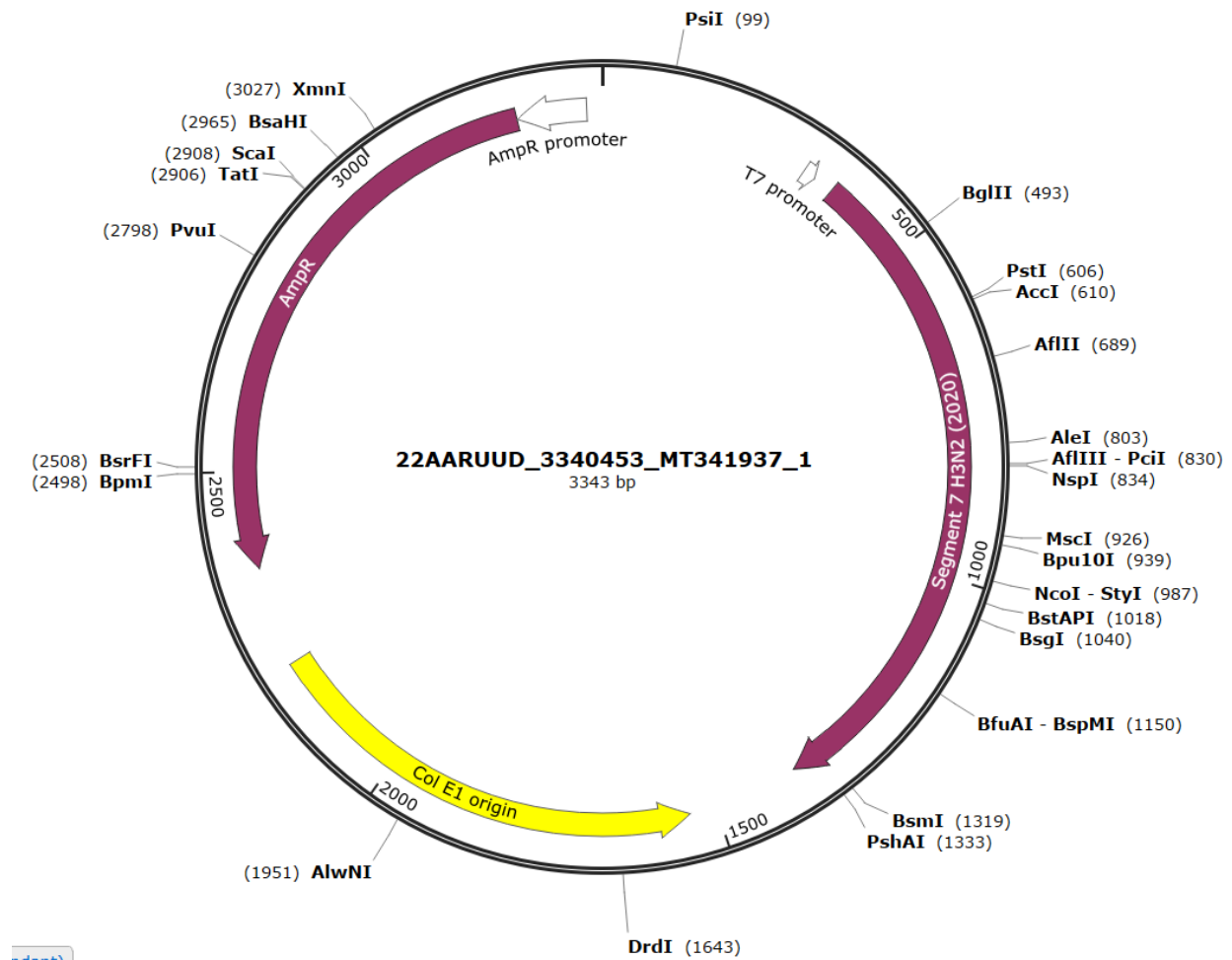


Abbildung 25: Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard

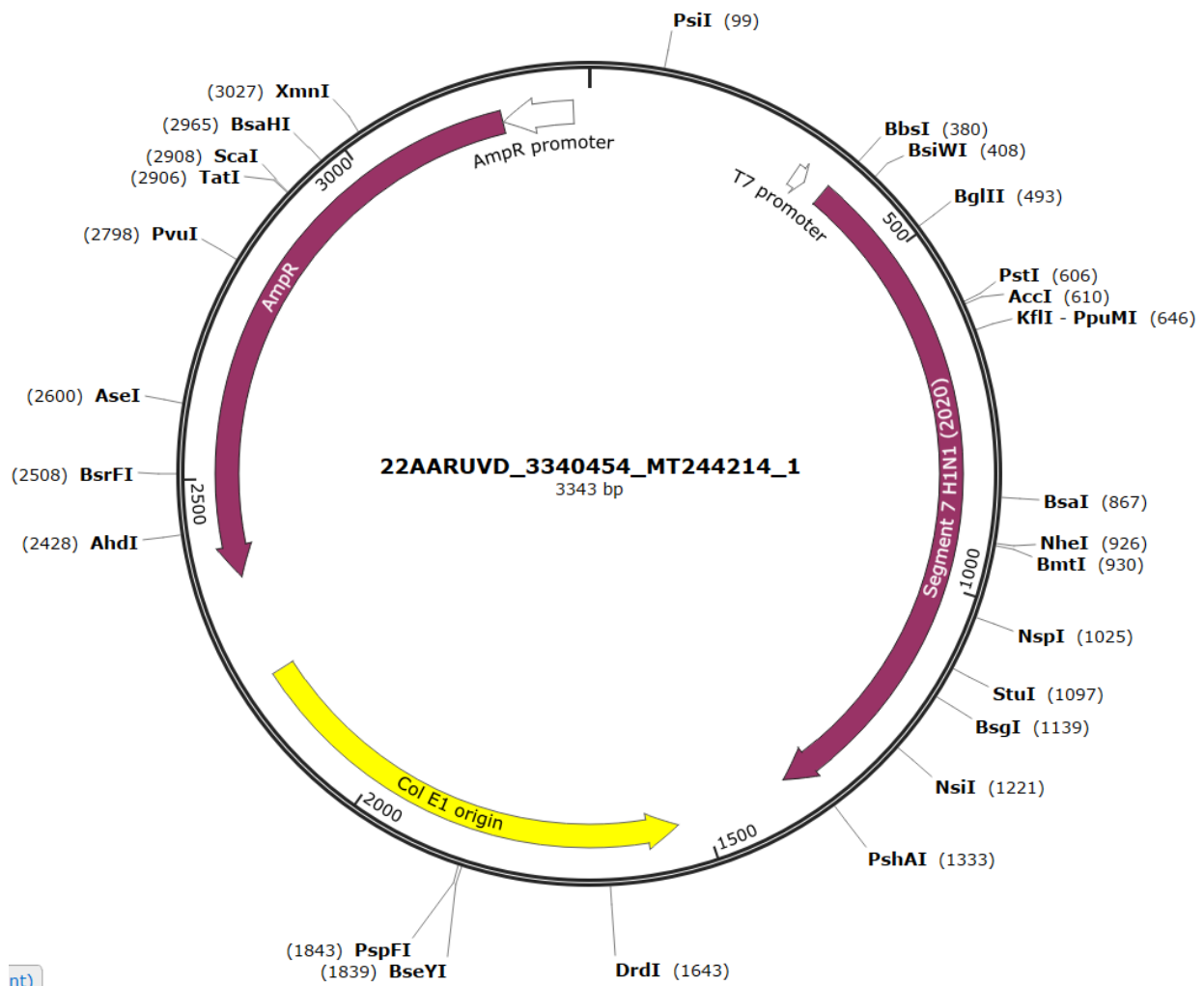


Abbildung 26: Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard

Tabelle 20: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 12B

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						

Tabelle 21: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 16

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Forward E	n=3	3,17 ± 0,12	p = 0,84	p = 0,22	p = 0,35 (ns)
Forward E.2	n=3	3,23 ± 0,02	p = 0,69		
Forward E.3	n=3	3,14 ± 0,04	p = 0,87		
<i>Notiz:</i> ns = nicht Signifikant; s = signifikant					
* p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001					

Tabelle 22: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 17

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
50 µl RT-RPA	n=3	4,19 ± 0,43	p = 0,99	p = 0,26	p = 0,006	s**
8 µl RT-RPA	n=6	3,17 ± 0,12	p = 0,90			
Notiz: ns = nicht Signifikant; s = signifikant						
* p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001						

Tabelle 23: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 18A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
42 °C	n=3	3,69 ± 0,11	p = 0,65	p = 0,98	p = 8*10 ⁻⁵
40 °C	n=3	4,28 ± 0,12	p = 0,43		
38 °C	n=3	4,76 ± 0,11	p = 0,80		
Vergleich der Gruppen					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
38 °C	40 °C	−0,80	−0,19	p = 5*10 ⁻³	s**
38 °C	42 °C	−1,37	−0,79	p = 6*10 ⁻⁵	s***
40 °C	42 °C	−0,89	−0.31	p = 1*10 ⁻³	S**

Notiz:

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

Tabelle 24: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 19

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referenz	n=3	9,05 \pm 0,57	p = 0,32		
5 min	n=3	15,04 \pm 1,53	p = 0,70		
3 min	n=3	8,00 \pm 0,73	p = 0,80	p = 0,55	p = 1,8*10 ⁻⁵
2 min	n=3	7,77 \pm 0,34	p = 0,49		
90 sek	n=3	10,16 \pm 1,14	p = 0,78		
Vergleich der Gruppen					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
2 min	3 min	-2,34	2,81	p = 0,99	ns
2 min	5 min	4,7	9,85	p = 2,4*10 ⁻⁵	s***
2 min	90 sek	-0,18	4,97	p = 0,07	ns
2 min	Referenz	-1,29	3,86	p = 0,51	ns
3 min	5 min	4,46	9,62	p = 3,2*10 ⁻⁵	s***
3 min	90 sek	-0,41	4,74	p = 0,11	ns
3 min	Referenz	-1,53	3,63	p = 0,68	ns
5 min	90 sek	-7,45	-2,3	p = 7,2*10 ⁻⁴	s***
5 min	Referenz	-8,57	-3,42	p = 1,3*10 ⁻⁴	s***
90 sek	Referenz	-3,69	1,46	p = 0,63	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 25: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 21

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
internally Quenched	n=3	4,89 \pm 0,07	p = 0,29	p = 0,59	p = 0,002	s**
dT-Quenched	n=3	4,53 \pm 0,05	p = 0,97			

Notiz: ns = nicht Signifikant; s = signifikant

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

Tabelle 26: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 13A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
2X ges.	n=6	3,40 \pm 0.14	p= 0,23	p= 0,33	p= 0,41	ns
2X rev.	n=7	3,48 \pm 0.21	P= 0,36			

Notiz: ns = nicht Signifikant; s = signifikant

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

Tabelle 27: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 13B

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Forward E	n=3	3,56 ± 0,07	p = 0,91		
Forward E.2	n=3	3,65 ± 0,14	p = 0,79	p = 0,04	p = 5 *10 ⁻⁵
Forward E.3	n=3	3,25 ± 0,05	p = 0,55		
Vergleich der Gruppen					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
2X forw.	2X rev.	0.21	0, 59	p = 0,002	s**
2X forw.	Referez	0, 20	0, 42	p = 3 *10 ⁻⁴	s***
2X rev.	Referez	-0, 29	0.10	p = 0,41	ns

Notiz:

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

Literaturverzeichniss

Ableitner O. 2018. *Einführung in die molekularbiologie*. Springer Fachmedien Wiesbaden.

Aranha C., Patel V., Bhor V. & Gogoi D. 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): 6794–6797. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>

Arranz R., Coloma R., Chichón F.J., Conesa J.J., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M., Ortín J. & Martín-Benito J. 2012. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* 338 (6114): 1634–1637. <https://doi.org/10.1126/science.1228172>

Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T., Kevadiya B. & Thakor A. 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology* 9 (8): 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>

Axelsen J.B., Yaari R., Grenfell B.T. & Stone L. 2014. Multiannual forecasting of seasonal influenza dynamics reveals climatic and evolutionary drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (26): 9538–9542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321656111>

Babu B., Ochoa-Corona F.M. & Paret M.L. 2018. Recombinase polymerase amplification applied to plant

- virus detection and potential implications. *Analytical Biochemistry* 546: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.021>
- Bachman J. 2013. **Reverse-transcription PCR (RT-PCR)**. In: *Laboratory methods in enzymology: RNA*: 67–74. Elsevier.
- Bai C., Zhong Q. & Gao G.F. 2021. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China Life Sciences* 65 (2): 280–294. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>
- Behrmann O., Bachmann I., Hufert F. & Dame G. 2020. Schnellnachweis von SARS-CoV-2 mit recombina-se polymerase amplification. *BIOspektrum* 26 (6): 624–627. <https://doi.org/10.1007/s12268-020-1458-3>
- 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 recombina-se 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 recombina-se polymerase amplification. *Micromachines* 11 (6): 595. <https://doi.org/10.3390/mi11060595>
- Bergkessel M. & Guthrie C. 2013. **Colony PCR**. In: *Methods in enzymology*: 299–309. Elsevier.
- Bingham N.H. & Fry J.M. 2010. **Regression**. Springer London.
- 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
- Biomers 2023a. **REAL-TIME PCR PROBES**. *Biomers.net the biopolymer factory*.
- Biomers 2023b. **PCR-blocker**. *biomers.net the biopolymer factory*.
- Bliss C.I. 1934. The method of probits. *Science* 79 (2037): 38–39. <https://doi.org/10.1126/science.79.2037.38>
- 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 recombina-se polymerase amplification. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>
- Brendish N.J., Schiff H.F. & Clark T.W. 2015. Point-of-care testing for respiratory viruses in adults: The current landscape and future potential. *Journal of Infection* 71 (5): 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.008>
- Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- 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>
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T. & Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3): 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Charrel R.N., Lamballerie X. de & Raoult D. 2007. Chikungunya outbreaks — the globalization of vectorborne diseases. *New England Journal of Medicine* 356 (8): 769–771. <https://doi.org/10.1056/nejmp078013>
- Chen C., Ruff D. & Halsey J. 2010. **Asynchronous PCR**. In: *Methods in molecular biology*: 231–243. Humana Press.
- 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>
- Chen X., Liu S., Goraya M.U., Maarouf M., Huang S. & Chen J.-L. 2018. Host immune response to influenza a virus infection. *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>
- Chlanda P. & Zimmerberg J. 2016. Protein-lipid interactions critical to replication of the influenza a virus. *FEBS Letters* 590 (13): 1940–1954. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118>
- Chow E.J., Doyle J.D. & Uyeki T.M. 2019. Influenza virus-related critical illness: Prevention, diagnosis, treatment. *Critical Care* 23 (1). <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2491-9>
- 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>
- Compton J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350 (6313): 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>
- Cosar B., Karagulleoglu Z.Y., Unal S., Ince A.T., Uncuoglu D.B., Tuncer G., Kilinc B.R., Ozkan Y.E., Ozkoc H.C., Demir I.N., Eker A., Karagoz F., Simsek S.Y., Yasar B., Pala M., Demir A., Atak I.N., Mendi A.H., Bengi V.U., Seval G.C., Altuntas E.G., Kilic P. & Demir-Dora D. 2022. SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 63: 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001>
- Daher R.K., Stewart G., Boissinot M. & Bergeron M.G. 2016. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clinical Chemistry* 62 (7): 947–958. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>
- 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>
- Deiman B., Aarle P. van & Sillekens P. 2002. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology* 20 (2): 163–180. <https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163>

- Dharmapalan D. 2020. Influenza. *The Indian Journal of Pediatrics* 87 (10): 828–832. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1>
- Diagne C.T., Faye M., Lopez-Jimena B., Wahed A.A.E., Loucoubar C., Fall C., Mencatelli G., Faye O., Faye O., Weidmann M. & Sall A.A. 2020. [Comparative analysis of zika virus detection by RT-qPCR, RT-LAMP, and RT-RPA](#). In: *Methods in molecular biology*: 165–179. Springer US.
- Ehnts K.I. 2013. Entwicklung von rekombinase-polymerase-amplifikations-nachweisverfahren für virale erreg-
er von atemwegsinfektionen. *Dissertation der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu
Göttingen*. <https://doi.org/10.53846/goediss-3943>
- Fahrmeir L., Heumann C., Künstler R., Pigeot I. & Tutz G. 2016. *Statistik*. Springer Berlin Heidelberg.
- 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>
- Firth A.E. & Brierley I. 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.
- Foni E., Chiapponi C., Baioni L., Zanni I., Merenda M., Rosignoli C., Kyriakis C.S., Luini M.V., Mandola
M.L., Bolzoni L., Nigrelli A.D. & Faccini S. 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 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)
- Gaňová M., Zhang H., Zhu H., Korabečná M. & Neužil P. 2021. Multiplexed digital polymerase chain reaction
as a powerful diagnostic tool. *Biosensors and Bioelectronics* 181: 113155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155>
- Gastwirth J.L., Gel Y.R. & Miao W. 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 A. 2022. [DNA and RNA isolation techniques for non-experts](#). Springer International Publishing.
- Gehrau V., Maubach K. & Fujarski S. 2022. [Mittelwertvergleiche](#). In: *Einfache datenauswertung mit r*:
319–383. Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Glökler J., Lim T.S., Ida J. & Frohme M. 2021. Isothermal amplifications – a comprehensive review on
current methods. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 56 (6): 543–586. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1937927>
- Goble J.A. & Rocafort P.T. 2016. Point-of-care testing. *Journal of Pharmacy Practice* 30 (2): 229–237.
<https://doi.org/10.1177/0897190015587696>
- 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>

- González-Estrada E., Villaseñor J.A. & Acosta-Pech R. 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., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barringer K.J., Richman D.D. & Gingeras T.R. 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): 1874–1878. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>
- Hampson A.W. & Mackenzie J.S. 2006. The influenza viruses. *Medical Journal of Australia* 185 (S10). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00705.x>
- Hatta M., Goto H. & Kawaoka Y. 2004. Influenza b virus requires BM2 protein for replication. *Journal of Virology* 78 (11): 5576–5583. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5576-5583.2004>
- Hause B.M., Ducatez M., Collin E.A., Ran Z., Liu R., Sheng Z., Armien A., Kaplan B., Chakravarty S., Hoppe A.D., Webby R.J., Simonson R.R. & Li F. 2013. Isolation of a novel swine influenza virus from oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza c viruses. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>
- Heeroma A.J. & Gwenin C. 2020. Development of solid-phase RPA on a lateral flow device for the detection of pathogens related to sepsis. *Sensors* 20 (15): 4182. <https://doi.org/10.3390/s20154182>
- Higgins M., Ravenhall M., Ward D., Phelan J., Ibrahim A., Forrest M.S., Clark T.G. & Campino S. 2018. PrimedRPA: Primer design for recombinase polymerase amplification assays. *Bioinformatics* 35 (4): 682–684. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>
- 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>
- Huang T., Li L., Liu X., Chen Q., Fang X., Kong J., Draz M.S. & Cao H. 2020. Loop-mediated isothermal amplification technique: Principle, development and wide application in food safety. *Analytical Methods* 12 (46): 5551–5561. <https://doi.org/10.1039/d0ay01768j>
- Islam M.M. & Koirala D. 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: 339338. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338>
- Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., Wu P., Kyncl J., Ang L.W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., Asten L. van, Silva S.P. da, Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M.-A., Bresee J.S., Azziz-Baumgartner E., Cheng P.-Y., Dawood F., Foppa I., Olsen S., Haber M., Jeffers C., MacIntyre C.R., Newall A.T., Wood J.G., Kundi M., Popow-Kraupp T., Ahmed M., Rahman M., Marinho F., Proschle C.V.S., Mallegas N.V., Luzhao F., Sa L., Barbosa-Ramírez J., Sanchez D.M., Gomez L.A., Vargas X.B., Acosta Herrera aBetsy, Llanés M.J., Fischer T.K., Krause T.G., Mølbak K., Nielsen J., Trebbien R., Bruno A., Ojeda J., Ramos H., Heiden M. an der, Carmen Castillo Signor L. del, Serrano C.E., Bhardwaj R., Chadha M., Narayan V., Kosen S., Bromberg M., Glatman-Freedman A., Kaufman Z., Arima Y., Oishi K., Chaves S., Nyawanda B., Al-Jarallah R.A., Kuri-Morales P.A., Matus C.R., Corona

- M.E.J., Burmaa A., Darmaa O., Obtel M., Cherkaoui I., Wijngaard C.C. van den, Hoek W. van der, Baker M., Bandaranayake D., Bissielo A., Huang S., Lopez L., Newbern C., Flem E., Grøneng G.M., Hauge S., Cosío F.G. de, Moltó Y. de, Castillo L.M., Cabello M.A., Horoch M. von, Osis J.M., Machado A., Nunes B., Rodrigues A.P., Rodrigues E., Calomfirescu C., Lupulescu E., Popescu R., Popovici O., Bogdanovic D., Kostic M., Lazarevic K., Milosevic Z., Tiodorovic B., Chen M., Cutter J., Lee V., Lin R., Ma S., Cohen A.L., Treurnicht F., Kim W.J., Delgado-Sanz C., Ontañón S. de mateo, Larrauri A., León I.L., Vallejo F., Born R., Junker C., Koch D., Chuang J.-H., Huang W.-T., Kuo H.-W., Tsai Y.-C., Bundhamcharoen K., Chittaganpitch M., Green H.K., Pebody R., Goñi N., Chiparelli H., Brammer L. & Mustaqim D. 2018. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: A modelling study. *The Lancet* 391 (10127): 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2)
- Iwamoto T., Sonobe T. & Hayashi K. 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): 2616–2622. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>
- Jagger B.W., Wise H.M., Kash J.C., Walters K.-A., Wills N.M., Xiao Y.-L., Dunfee R.L., Schwartzman L.M., Ozinsky A., Bell G.L., Dalton R.M., Lo A., Efstathiou S., Atkins J.F., Firth A.E., Taubenberger J.K. & Digard P. 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 M., Barary M., Ghebrehewet S., Koppolu V., Vasigala V. & Ebrahimpour S. 2021. A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology* 93 (8): 4638–4646. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>
- 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>
- Johnston A.D., Lu J., Ru K., Korbie D. & Trau M. 2019. PrimerROC: Accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36612-9>
- Jones L.J., Yue S.T., Cheung C.-Y. & Singer V.L. 1998. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Analytical Biochemistry* 265 (2): 368–374. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914>
- Kang T., Lu J., Yu T., Long Y. & Liu G. 2022. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID-19 point-of-care diagnostics as an example. *Biosensors and Bioelectronics* 206: 114109. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114109>
- Kim D.-K. & Poudel B. 2013. Tools to detect influenza virus. *Yonsei Medical Journal* 54 (3): 560. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.3.560>
- Kim H., Webster R.G. & Webby R.J. 2018. Influenza virus: Dealing with a drifting and shifting pathogen. *Viral Immunology* 31 (2): 174–183. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>
- Kordyukova L.V., Shtykova E.V., Baratova L.A., Svergun D.I. & Batishchev O.V. 2018. Matrix proteins of enveloped viruses: A case study of influenza A virus M1 protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (3): 671–690. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089>

- Koutsakos M., Nguyen T.H., Barclay W.S. & Kedzierska K. 2016. Knowns and unknowns of influenza b viruses. *Future Microbiology* 11 (1): 119–135. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>
- Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G. & García-Sastre A. 2018. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Kück U. 2005. **PCR-analytik**. In: *Praktikum der molekulargenetik*: 221–245. Springer Berlin Heidelberg.
- Kuckartz U., Rädiker S., Ebert T. & Schehl J. 2010. **T-test: Zwei mittelwerte vergleichen**. In: *Statistik*: 147–166. VS Verlag für Sozialwissenschaften.
- Lázaro A., Tortajada-Genaro L.A. & Maquieira Ángel 2021. Enhanced asymmetric blocked qPCR method for affordable detection of point mutations in KRAS oncogene. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (11): 2961–2969. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03229-3>
- Lee S. & Lee D.K. 2018. What is the proper way to apply the multiple comparison test? *Korean Journal of Anesthesiology* 71 (5): 353–360. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>
- 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>
- Louie R.F., Kitano T., Brock T.K., Derlet R. & Kost G.J. 2009. Point-of-care testing for pandemic influenza and biothreats. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3 (S2): S193–S202. <https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4>
- Lovatt A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *Reviews in Molecular Biotechnology* 82 (3): 279–300. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(01\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(01)00043-5)
- Luo M. 2011. **Influenza virus entry**. In: *Viral molecular machines*: 201–221. Springer US.
- 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>
- Lyons D. & Lauring A. 2018. Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses* 10 (8): 407. <https://doi.org/10.3390/v10080407>
- Ma H., Bell K.N. & Loker R.N. 2021. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 20: 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>
- Mann H.B. & Whitney D.R. 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. & 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.
- Moore C., Hibbitts S., Owen N., Corden S.A., Harrison G., Fox J., Gelder C. & Westmoreland D. 2004. Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza a. *Journal of Medical Virology* 74 (4): 619–628. <https://doi.org/10.1002/jmv.20221>
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N. & Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 150–154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>
- Mülhardt C. 2009. *Der experimentator: Molekularbiologie/ genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0): 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Muramoto Y., Noda T., Kawakami E., Akkina R. & Kawaoka Y. 2013. Identification of novel influenza a virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of Virology* 87 (5): 2455–2462. <https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12>
- Nagamine K., Hase T. & Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16 (3): 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H. & Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 143 (2): 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>
- NCIRD 2021. [National center for immunization and respiratory diseases \(u.s.\)](https://www.cdc.gov/ncird/). *Research use only CDC flu SC2 multiplex assay primers and probes*.
- Nicholson K.G., Wood J.M. & Zambon M. 2003. Influenza. *The Lancet* 362 (9397): 1733–1745. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14854-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14854-4)
- Njouom R., Monamele G.C., Ermetat B., Tchatchouang S., Moyo-Tetang S., McCauley J.W. & Daniels R.S.

2019. Detection of influenza c virus infection among hospitalized patients, cameroon. *Emerging Infectious Diseases* 25 (3): 607–609. <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>
- ODriscoll L., Daly C., Saleh M. & Clynes M. 1993. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology* 12 (1-3): 289–314. <https://doi.org/10.1007/bf00744669>
- Omran Q.Q., Fedorova O., Liu T. & Pyle A.M. 2022. A molecular beacon assay for monitoring RNA splicing. *Nucleic Acids Research* 50 (13): e74–e74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac242>
- Özay B. & McCalla S.E. 2021. A review of reaction enhancement strategies for isothermal nucleic acid amplification reactions. *Sensors and Actuators Reports* 3: 100033. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100033>
- Pabinger S., Rödiger S., Kriegner A., Vierlinger K. & Weinhäusel A. 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 M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L. & Morita K. 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): 407–421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Park J.-W. 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 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>
- Prazeres D.M.F., Schluep T. & Cooney C. 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 E.A., Lu J., Spaczai I., Prasetyo M.E., Zheng E.M., Zhang H. & Kamei D.T. 2020. Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 170: 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 R.T. & Brown T. 2005. Fluorescence based strategies for genetic analysis. *Chemical Communications* (44): 5487. <https://doi.org/10.1039/b509522k>
- Rasch B., Friesen M., Hofmann W. & Naumann E. 2014. [Einfaktorielle Varianzanalyse](#). In: *Springer-Lehrbuch*:

- 1–34. Springer Berlin Heidelberg.
- 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>
- Río J.S. del, Adly N.Y., Acero-Sánchez J.L., Henry O.Y.F. & OSullivan C.K. 2014. Electrochemical detection of francisella tularensis genomic DNA using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 54: 674–678. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.035>
- Río J.S. del, Svobodova M., Bustos P., Conejeros P. & O’Sullivan C.K. 2016. Electrochemical detection of piscirickettsia salmonis genomic DNA from salmon samples using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (30): 8611–8620. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9639-0>
- RKI 2019. [Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018](#). Robert-Koch-Institut.
- 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>
- Rödiger S., Burdukiewicz M., Spiess A.-N. & Blagodatskikh K. 2022. [PCRedux204 package - an overview \[vignette\]](#). *Comprehensive R Archive Network*, 1–104.
- Rohrman B. & Richards-Kortum R. 2015. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: A lateral flow-based method for enriching target DNA. *Analytical Chemistry* 87 (3): 1963–1967. <https://doi.org/10.1021/ac504365v>
- Saisuk W., Srisawat C., Yoksan S. & Dharakul T. 2019. Hybridization cascade plus strand-displacement isothermal amplification of RNA target with secondary structure motifs and its application for detecting dengue and zika viruses. *Analytical Chemistry* 91 (5): 3286–3293. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03736>
- Sandt C.E. van de, Bodewes R., Rimmelzwaan G.F. & Vries R.D. de 2015. Influenza b viruses: Not to be discounted. *Future Microbiology* 10 (9): 1447–1465. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.65>
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanjuán R. & Domingo-Calap P. 2016. Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
- Schmidt T., Friehs K., Schleef M., Voss C. & Flaschel E. 1999. Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 274 (2): 235–240. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4291>
- Shao W., Li X., Goraya M., Wang S. & Chen J.-L. 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. & WILK M.B. 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 A., Balda S., Apreja M., Kataria K., Capalash N. & Sharma P. 2021. COVID-19 diagnosis: Current and future techniques. *International Journal of Biological Macromolecules* 193: 1835–1844. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.016>
- Shen F., Davydova E.K., Du W., Kreutz J.E., Piepenburg O. & Ismagilov R.F. 2011. Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip. *Analytical Chemistry* 83 (9): 3533–3540. <https://doi.org/10.1021/ac200247e>
- Shin Y., Perera A.P., Kim K.W. & Park M.K. 2013. Real-time, label-free isothermal solid-phase amplification/detection (ISAD) device for rapid detection of genetic alteration in cancers. *Lab on a Chip* 13 (11): 2106. <https://doi.org/10.1039/c3lc50129a>
- Sievers F. & Higgins D.G. 2017. Clustal omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science* 27 (1): 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
- Silva S.J.R. da, Pardee K. & Pena L. 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 D.R. undated. [Restriction endonuclease digestion of DNA](#). In: *Transgenesis techniques*: 427–432. Humana Press.
- Soroka M., Wasowicz B. & Rymaszewska A. 2021. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? *Cells* 10 (8): 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
- Sreejith K.R., Ooi C.H., Jin J., Dao D.V. & Nguyen N.-T. 2018. Digital polymerase chain reaction technology – recent advances and future perspectives. *Lab on a Chip* 18 (24): 3717–3732. <https://doi.org/10.1039/c8lc00990b>
- Stahel W.A. 1999. [Multivariate statistik](#). In: *Statistische datenanalyse*: 304–321. Vieweg+Teubner Verlag.
- 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>
- Świerczyńska M., Mirowska-Guzel D.M. & Pindelska E. 2022. Antiviral drugs in influenza. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (5): 3018. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053018>
- Takeuchi K. & Lamb R.A. 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): 911–919. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.2.911-919.1994>
- Tan M., Liao C., Liang L., Yi X., Zhou Z. & Wei G. 2022. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1019071>
- Thornton B. & Basu C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145–154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Tiago Lopes J.C. Isabel Barata 2020. [Arabidopsis thaliana germination assays](#). *iGEM; Pine nemato fight*.

- To J., Surya W. & Torres J. 2016. [Targeting the channel activity of viroporins](#). In: *Advances in protein chemistry and structural biology*: 307–355. Elsevier.
- To J. & Torres J. 2019. Viroporins in the influenza virus. *Cells* 8 (7): 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>
- Tomita N., Mori Y., Kanda H. & Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3 (5): 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Uyeki T.M., Bernstein H.H., Bradley J.S., Englund J.A., File T.M., Fry A.M., Gravenstein S., Hayden F.G., Harper S.A., Hirshon J.M., Ison M.G., Johnston B.L., Knight S.L., McGeer A., Riley L.E., Wolfe C.R., Alexander P.E. & Pavia A.T. 2018. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america: 2018 update on diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management of seasonal influenza. *Clinical Infectious Diseases* 68 (6): e1–e47. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy866>
- Uyeki T.M., Hui D.S., Zambon M., Wentworth D.E. & Monto A.S. 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 E., Jankelow A., Lim J., Kindratenko V., Ganguli A., White K., Kumar J. & Bashir R. 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., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A. & Kiselev O.I. 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research* 185: 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>
- Velthuis A.J.W. te & Fodor E. 2016. Influenza virus RNA polymerase: Insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 479–493. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>
- Vemula S., Zhao J., Liu J., Wang X., Biswas S. & Hewlett I. 2016. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses* 8 (4): 96. <https://doi.org/10.3390/v8040096>
- 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)
- WELCH B.L. 1947. THE GENERALIZATION OF ‘STUDENT’S’ PROBLEM WHEN SEVERAL DIFFERENT POPULATION VARIANCES ARE INVOLVED. *Biometrika* 34 (1-2): 28–35. <https://doi.org/10.1093/biomet/34.1-2.28>
- Whitley R.J. 2007. The role of oseltamivir in the treatment and prevention of influenza in children. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 3 (5): 755–767. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.5.755>
- Wood G.S., Tung R.M., Heaffner A.C., Crooks C.F., Liao S., Orozco R., Veelken H., Kadin M.E., Koh H., Heald P., Barnhill R.L. & Sklar J. 1994. Detection of clonal T-cell receptor γ 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>
- Woźniak-Kosek A H.G. Kempńska-Mirosławska B 2014. [Detection of the influenza virus yesterday and now](#).

Acta Biochimica Polonica. 61(3): 465–470.

- Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A. & Maquieira Ángel 2017. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection. *Microchimica Acta* 184 (5): 1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2144-0>
- Yoo H.M., Kim I.-H. & Kim S. 2021. Nucleic acid testing of SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6150. <https://doi.org/10.3390/ijms22116150>
- Yoo S.J., Kwon T. & Lyoo Y.S. 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 H., Hurt A.C., Clinch B., Barr I. & Lee N. 2021. Burden of influenza b virus infection and considerations for clinical management. *Antiviral Research* 185: 104970. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104970>
- Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L. & Fan C. 2015. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical Reviews* 115 (22): 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
- Zhong J. & Zhao X. 2018. Isothermal amplification technologies for the detection of foodborne pathogens. *Food Analytical Methods* 11 (6): 1543–1560. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>