

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

22. März, 2023

Erstbetreuer: Dr. rer. nat. Gregory Dame

Zweitbetreuer: Dr. rer. nat. Barbara Hansen

Institut für Mikrobiologie und Virologie

Medizinische Hochschule Brandenburg - Theodor Fontane

Zusammenfassung

Die Grippe verursacht durch Influenza-Viren ist eine der bedeutendsten viralen Infektionserkrankungen mit mehr als 300.000 jährlichen Todesfällen. Dabei ist eine schnelle, robuste und kostengünstige Detektion entscheidend für Behandlungserfolg und Infektionsbekämpfung. Mithilfe eines mobilen Kofferlabors und der RPA als Nachweismethode sollen effizient virale Infektionserkrankungen dezentral detektiert werden.

Ziel der Arbeit ist es jeweils eine RT-RPA zum Nachweis der Pan-Influenza B Viren und der Influenza A Subtypen H1N1 und H3N2 zu entwickeln und diese für den Einsatz im Kofferlabor zu optimieren. Mithilfe artifizieller Virus-RNA wurden entwickelte Primer-Sonden-Kombinationen auf Eignung hinsichtlich der RT-RPA geprüft und jeweils eine geeignete Primer-Sonden-Kombination in den Reaktionsparametern Mischzeitpunkt, Reaktionstemperatur optimiert. Zusätzlich wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens getestet, um die RT-RPA für mikrofluidische Anwendungen innerhalb des Kofferlabors zu optimieren. Die optimierten RT-RPA's wurde auf Sensitivität und Spezifität getestet und mit goldstandard PCR-Systemen verglichen. Des Weiteren wurde eine Primerasymmetrie zur besseren Detektion auf die RT-RPA adaptiert, sowie der Einfluss verschiedener Sondenmodifikationen untersucht. Es konnte jeweils eine RT-RPA zur Detektion der Influenza B Viren und der Influenza A Viren entwickelt werden. Dabei weist die Influenza B RT-RPA ein analytisches 95 %-iges Detektionslimit von 14,6 RNA-Kopien auf und konnte für den niedrigvolumen Bereich (6,5 μ l) als low-volume RPA optimiert werden. Die Influenza A RT-RPA besitzt für beide Subtypen ein analytisches Detektionslimit von 147,5 RNA-Kopien konnte aber nicht im Reaktionsvolumen verringert werden. Es konnte anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden, dass die low-volume RPA die Notwendigkeit des Mischschrittes senkt, jedoch innerhalb eines humanen DNA- und RNA-Hintergrunds deutlich an Sensitivität verliert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine asymmetrische Primer-Verteilung zu einem höheren Fluoreszenzsignal führt und dies mit der Hybridisierungsposition der Sonde in Verbindung steht. Ebenfalls konnte anhand der Influenza A RT-RPA ein Einfluss des Sondendesings hinsichtlich *dt-Quenched* und *iQ* festgestellt werden, wobei die *dt-Quenched*-Sonde zu einer erhöhten Sensitivität im Vergleich zu der *iQ*-Sonde führt.

Die Influenza A RT-RPA ist in der Lage simulierte Patientenproben mit einer der Literatur entsprechenden Viruslast zu detektieren, während die low-volume Influenza B RT-RPA durch den Sensitivitätsverlust nur höher konzentrierte simulierte Patientenproben detektieren kann. Daraus lässt sich schließen, dass low-volume RT-RPA trotz der Vorteile nur bedingt einsetzbar ist und diese Methode hinsichtlich Sensitivität weiter optimiert werden muss.

Abstract

Influenza, caused by influenza viruses, is one of the most important viral diseases with more than 300,000 deaths annually. Rapid, robust and cost-effective detection is critical for successful treatment and infection control. Using a mobile case laboratory and RPA as a detection technique, the aim is to efficiently detect viral infections in a decentralized manner.

The aim of the work is to develop an RT-RPA for the detection of the pan-influenza B viruses and the influenza A subtypes H1N1 and H3N2 and to optimise these for use in the mobile case laboratory. Artificial viral RNA was used to test the suitability of primer-probe combinations for RT-RPA. A suitable primer-probe combination was optimised for the reaction parameters mixing time and reaction temperature. In addition, a reduction of the reaction volume was tested in order to optimise the RT-RPA for microfluidic applications within the suitcase laboratory. The optimised RT-RPAs were tested for sensitivity and specificity and compared to gold standard PCR systems. Furthermore, the influence of different probe modifications on the RT-RPA was investigated and primer asymmetry was adapted to the RT-RPA for better detection. RT-RPAs were developed to detect Influenza B and Influenza A viruses. The Influenza B RT-RPA has been optimised as a low volume RPA (6.5 μ l) with a 95% detection limit of 14.6 RNA copies. The Influenza A RT-RPA shows a detection limit of 147.5 RNA copies for both subtypes. However, the reaction volume could not be reduced. Using influenza B RT-RPA, it was shown that low-volume RPA reduces the need for the mixing step, but loses sensitivity significantly within a human DNA and RNA background. Furthermore, a positive effect of primer asymmetry on RPA was found, which is related to the hybridisation position of the probe. The Influenza A RT-RPA also showed an influence of the probe design with respect to *dt-Quenched* and *iQ*, with the *dt-Quenched* probe leading to an increased sensitivity compared to the *iQ* probe.

The influenza A RT-RPA is able to detect positive patient samples, while the low-volume influenza B RT-RPA can only detect higher concentrated simulated patient samples due to the loss of sensitivity. It can therefore be concluded that low-volume RT-RPA, despite its advantages, can only be used to a limited extent and that this method must be further optimised in terms of sensitivity.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts	1
1.2 Die Influenza Viren - Pandemieverursacher Nr. 1	2
1.2.1 Influenza A	3
1.2.2 Influenza B	5
1.3 Proteinbasierte Nachweismethoden von Influenza	6
1.4 Nukleinsäure amplifizierende Methoden zur Influenza Detektion	7
1.4.1 Die Polymerase Kettenreaktion - PCR	7
1.4.2 Isotherme Amplifikationstechniken	8
1.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation - LAMP	9
1.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation - NASBA	10
1.4.5 Rekombinase Polymerase Amplifikation - RPA	12
1.5 Ziel der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Bioinformatische Methoden	16
2.1.1 Primer- und Sondendesign für die Rekombinase Polymerase Amplifikation	16
2.1.2 Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen	17
2.1.3 Statistische Auswertung der Amplifikationen	17
2.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten	19
2.1.5 Probit-Analyse	20
2.2 Herstellung synthetischer RNA-Standards	20
2.2.1 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	21
2.2.2 Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen	21
2.2.3 Sequenzierung der extrahierten Plasmide	22
2.2.4 Restriktionsverdau zur Linearisierung des Plasmids	22
2.2.5 DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus	23
2.2.6 <i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards	23
2.2.7 RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA	23
2.3 Erstellung von RNA-Referenzproben mit humanem Nukleinsäure-Hintergrund	24
2.4 Nukleinsäure Amplifikation	24
2.4.1 Reverse Transkription Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)	24
2.4.2 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz	25
2.4.3 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz	27
2.4.4 Primer- und Sondenauswahl für die RT-RPA	28
2.4.5 Adaption des Reaktionsvolumens der RT-RPA	28
2.4.6 Optimierung der Reaktionstemperatur für die RT-RPA	28

2.4.7	Testung asymmetrische Primerkonzentrationen zur Optimierung der RT-RPA	29
2.4.8	Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation	30
2.4.9	Ermittlung der analytischen Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA	30
2.4.10	Untersuchung des Einflusses der Sondenmodifikation auf die RT-RPA	31
2.4.11	Ermittlung der Spezifität der RT-RPA	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Entwicklung und Optimierung der Influenza B RT-RPA	32
3.1.1	Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der Influenza B Virus Standard-RNA .	32
3.1.2	Untersuchung der Influenza B RT-RPA Primer und Sonden	33
3.1.3	Verringerung des Reaktionsvolumen (low-volume Ansatz) der Influenza B RT-RPA .	34
3.1.4	Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza B RT-RPA	35
3.1.5	Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA	36
3.1.6	Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA	37
3.1.7	Optimierung der Mischzeit der Influenza B RT-RPA	38
3.1.8	Bestimmung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA	41
3.1.9	Bestimmung der Spezifität der Influenza B RT-RPA	43
3.2	Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA	44
3.2.1	Überprüfung und Konzentrationsbestimmung Influenza A Virus Standard-RNA . . .	44
3.2.2	Untersuchung der Influenza A RT-RPA Primer und Sonden	45
3.2.3	Verringerung des Reaktionsvolumen der Influenza A RT-RPA	46
3.2.4	Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza A RT-RPA	47
3.2.5	Optimierung der asymmetrischen Primer-Konzentration der Influenza A RT-RPA .	47
3.2.6	Optimierung der Mischzeit der Influenza RT-RPA	48
3.2.7	Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA	50
3.2.8	Einfluss des Sondendesigns auf die Influenza A RT-RPA	52
3.2.9	Bestimmung der Spezifität der Influenza A RT-RPA	53
4	Diskussion	54
4.1	Einfluss von Basenfehlpaarung in Primern und Sonden auf die RT-RPA	54
4.2	Mischzeitpunkt und Sensitivität in der RT-RPA mit reduzierten Reaktionsvolumen .	56
4.3	Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays	57
4.4	Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA	59
4.5	Einfluss von Modifikationen der Exo-Sonde auf die RT-RPA	60
4.6	Der “Ditching”-Effekt innerhalb der RT-RPA	62
4.7	Automatische Auswertung der Amplifikationen mittels Statistik	63
5	Zusammenfassung und Ausblick	64
6	Anhang	66
7	Danksagung	74
Literaturverzeichniss		75

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung eines behüllten Virus	1
2	Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus	4
3	Vereinfachte Darstellung des Influenza Replikationstyklus	5
4	Reaktionsmechanismus der 3-Stufen PCR.	8
5	Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP	10
6	Schematischer Reaktionsmechanismus der Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (NAS-BA)	11
7	Schematischer Reaktionsmechanismus der RPA	12
8	Vergleichende Darstellung der RPA-Sondentypen	14
9	Schematischer Aufbau der RPA-Sonden	17
10	schematische Darstellung der innerhalb der asymmetrie verwendeten Sonden	29
11	Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade des Influenza B Standards	33
12	Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen.	34
13	Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA	35
14	Optimierung der Reaktionstemperatur für die Influenza B RT-RPA	36
15	Einfluss der Primerassymetrie auf der RT-RPA	37
16	Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie.	38
17	Optimierung der Mischzeit für die Influenza B RT-RPA.	40
18	Etablierung der Influenza B RPA im Original- und low-volume -Ansatz.	42
19	Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide.	44
20	Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen.	45
21	Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA	46
22	Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie der Influenza A RT-RPA.	48
23	Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA.	49
24	Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA.	51
25	Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA.	52
26	Alignment zwischen den Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyp:	55
27	Dimerbildung der Influenza B Sonden-Fragmente	63
28	Einfluss eines Mischschrittes nach 5 min auf die Influenza B 50 μ l RT-RPA	66
29	Plasmidkarte des Influenza B Plasmides	69
30	Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard	70
31	Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard	71

Tabellenverzeichnis

2	Übersicht der Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA	16
3	Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR	21
4	Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes	24
5	Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes	25
6	Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes	25
7	Temperaturprotokoll für die Influenza PCR	25
8	Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA	26
9	Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA	26
10	Zusammensetzung des Rehydrationsmixes	27
11	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz	28
12	Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den low-Volume Ansatz	28
13	Vergleich der verschiedenen Sensitivitätsmessungen der Influenza B RT-RPA	41
14	Spezifitätsmessung der Influenza B RT-RPA	43
15	Vergleich der verschiedenen Detektionslimits der Influenza A RT-RPA	53
16	Späzifitätsmessung der Influenza A RT-RPA	53
17	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 12	67
18	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 13	67
19	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 14	67
20	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 16	67
21	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 17A	68
22	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 17B	68
23	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 20	68
24	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 21	68
25	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 22A	72
26	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 23	72
27	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 25	73
28	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 15A	73
29	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 15B	73
30	Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 28	73

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-H2O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DFA	Direkter fluoreszenz Antikörper Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FAM	Carboxyfluorescein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HA	Hämaggglutinin
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
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
etc	und so weiter (lat. et cetera)

iter (lat. et cetera)* \end{longtable}

1 Einleitung

1.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Keime sind ernstzunehmende Bedrohungen für Menschen wie auch staatliche Systeme. Dabei sorgen gerade 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 Milliardenenschäden (Louie *et al.* 2009).

Viren sind ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, mit einem DNA oder RNA-Genom. Dieses wird von Nucleoproteinen stabilisiert und ist von einer Proteinmatrix, dem sogenannten Capsid umgeben. Je nach Virusart wird das Capsid von einer zusätzlichen Phospholipid-Doppelschicht, die sogenannte Membranhülle, mit eingebetteten Membranproteinen umhüllt (siehe Abbildung 1). Dabei bilden Membranhülle und Capsid das Nucleocapsid (Modrow *et al.* 2010).

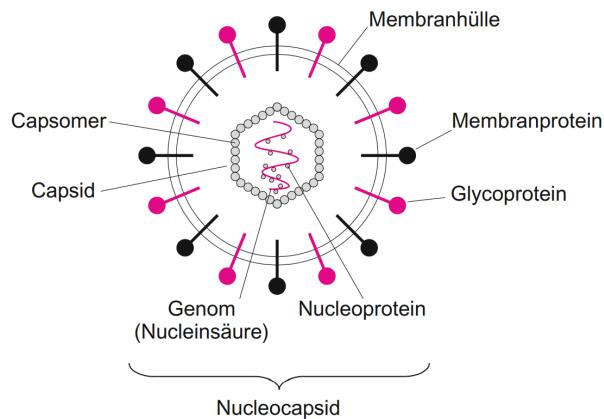


Abbildung 1: **Schematische Darstellung eines behüllten Virus** Das Virus-Genom wird von Nucleoproteinen gebunden liegt innerhalb des Capsids vor. Das Capsid ist von der Membranhülle umgeben, in welcher Membranproteine eingelagert sind (Modrow *et al.* 2010).

Da Viren keinen eigenen Reproduktionsmechanismus besitzen, sind sie auf die Infizierung von Zellen angewiesen, damit sie mittels der Reproduktions-Maschinerie des Wirtes ihre viralen Komponenten vervielfältigen können (Modrow *et al.* 2010). Eine beeindruckende Fähigkeit der Viren ist die Anpassung an neue Umgebungen und Wirte. Diese hängt von der jeweiligen Variabilität und Mutationsrate ab, welche es ihnen erlaubt eine große genetische Vielfalt zu erschaffen (Sanjuán & Domingo-Calap 2016). Dadurch bilden einige Viren ständig neue Varianten aus, welche durch ihre veränderten Infektionsstrukturen Immunlücken besetzen und dadurch Infektionsherde und Pandemien hervorrufen (Lyons & Lauring 2018; Cosar *et al.* 2022).

Die SARS-CoV-2 Pandemie hat gezeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um Infektionsketten schnell zu unterbrechen und Gesundheitssysteme zu entlasten (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 mit energieintensiven Gerätschaften und geschultes Personal, sowie aufwendige Präparationsprotokolle, wodurch eine dezentrale Diagnostik erschwert wird (Brendish *et al.* 2015; Augustine *et al.* 2020; Behrmann,

Bachmann, Hufert, *et al.* 2020). Zusätzlich fallen durch zentrale Labore lange Transportwege an, was folglich eine “Turnaround”-Zeit von mehr als 24 Stunden bedingt (Brendish *et al.* 2015). Dadurch wird das Unterbrechen von Infektionsketten erschwert, da erkrankte Patienten binnen der 24 h weitere Personen infizieren können (Sharma *et al.* 2021). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Routine-Diagnostik mit sensitiven und kostengünstigen Alternativen zu ergänzen, welche vor Ort als *point-of-care testing* (POCT) durchgeführt werden können (Goble & Rocafort 2016). Für das POCT werden isotherme Nukleinsäureamplifikationstechniken zur Detektion der Erreger immer interessanter, da diese im Vergleich zur PCR keine komplexen Geräte erfordern und kürzere Testzeiten anbieten können. Diese werden dezentral für die Diagnostik eingesetzt, was zu einer schnelleren Detektion am “*point of care*” führt. Durch den zielgerichteten Nachweis der Erreger können erkrankte Personen direkt identifiziert werden und somit möglicherweise eine Unterbrechung der Infektionsketten erreicht werden (Pumford *et al.* 2020; Islam & Koirala 2022).

1.2 Die Influenza Viren - Pandemieverursacher Nr. 1

Die “echte” Grippe, verursacht durch die Influenza Viren, als bekanntester Vertreter der Orthomyxoviren, ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit jährlichen Todesfällen zwischen 290.000 und 650.000 weltweit (Iuliano *et al.* 2018; RKI 2019). Die Influenza Viren werden, aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und ihrer serologischen Charakteristika, in die Typen A, B, C und D eingeteilt. 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, sogenannte Segmente unterteilt (Modrow *et al.* 2010; Alberts *et al.* 2017). Von diesen Typen sind alle außer D, welcher nur Rinder und Schweine befällt, humanpathogen (Foni *et al.* 2017; Javanian *et al.* 2021). Typ A besitzt 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 der Oberflächenproteinen Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterteilt. Derzeit sind 18 Subtypen der HA (H1 - H18) und 11 Subtypen der NA (N1 - N11) bekannt, 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). Derzeit kursieren die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 in der Bevölkerung (Javanian *et al.* 2021). Die hohe Variabilität der HA und NA-Proteine lässt sich durch die spezielle RNA-Polymerase der Viren erklären. Diese besitzt eine hohe Replikations-Fehlerrate, welche zu veränderten Oberflächenproteinen und damit neuen Virusmutanten führt (Luo 2011). Dieser Prozess ist als “Antigendrift” bekannt und führt dazu, dass neue Varianten dem Immunsystem von vorher infizierten entgehen können (Luo 2011; Axelsen *et al.* 2014). Eine Besonderheit 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). Besonders interessant sind dabei Schweine, da sie sowohl als Wirt von den Humanen- als auch den Geflügel-Varianten dienen und somit eine Art “Mischgefäß” für den Antigenshift darstellen.

Influenza Typ B infiziert ausschließlich Menschen und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Jedoch ist die Pandemiegefahr eingeschränkt, da dieser Typ 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

meistens milde Krankheitsverläufe hervor. Jedoch wurden bei Kindern Infektionen der unteren Atemwege mit schweren Verläufen beobachtet (Njouom *et al.* 2019). Neben humanen Infektionen sind auch Schweine als Wirt bekannt (Hause *et al.* 2013).

1.2.1 Influenza A

Das Genom ca. 13.5 kb große, segmentierte Genom des Influenza A Virus 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 der 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 wird (Vasin *et al.* 2014). Zu den essenziellen Proteinen zählen die NA, welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das HA, welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixprotein (M1), das Membranprotein (M2), das Nichtstrukturproteine NS1, das *nuklear export protein* (NEP), das Nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten der RNA-Polymerase PA, PB1 und PB2 (Luo 2011; Krammer *et al.* 2018). Der Aufbau des Virus sowie die Anordnung der essenziellen Proteine auf den Genom-Segmenten sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Accessoire-Proteine sind, im Gegensatz zu den essenziellen Proteinen, auf alternativen offenen Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) codiert. Diese erlauben es Viren, eine größere Protein-Vielfalt auf engem genetischen 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 während der Translation eine Base überspringt und somit den Leserahmen ändert, *readthrough* bei dem das Ribosom ein Stopp-codon überspringt, oder *internal Ribosomal Entry* wobei das Ribosom an ein internes Start-Codon durch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird (Firth & Brierley 2012). Zu den Accessoire-Proteine zählen beispielsweise die dem PA zugehörigen Proteine PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger *et al.* 2012; Muramoto *et al.* 2013). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Influenza A Virus besteht, wie in Abbildung 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 ist (Krammer *et al.* 2018). Das Heterotrimer assoziiert innerhalb des Virus mit den komplementären Sequenzen an den einzelnen Genomsegmenten. 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 (Arranz *et al.* 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht aus einer äußeren Cholesterol haltigen 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 (Chlada & 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 den 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

(Takeuchi & Lamb 1994; To *et al.* 2016).

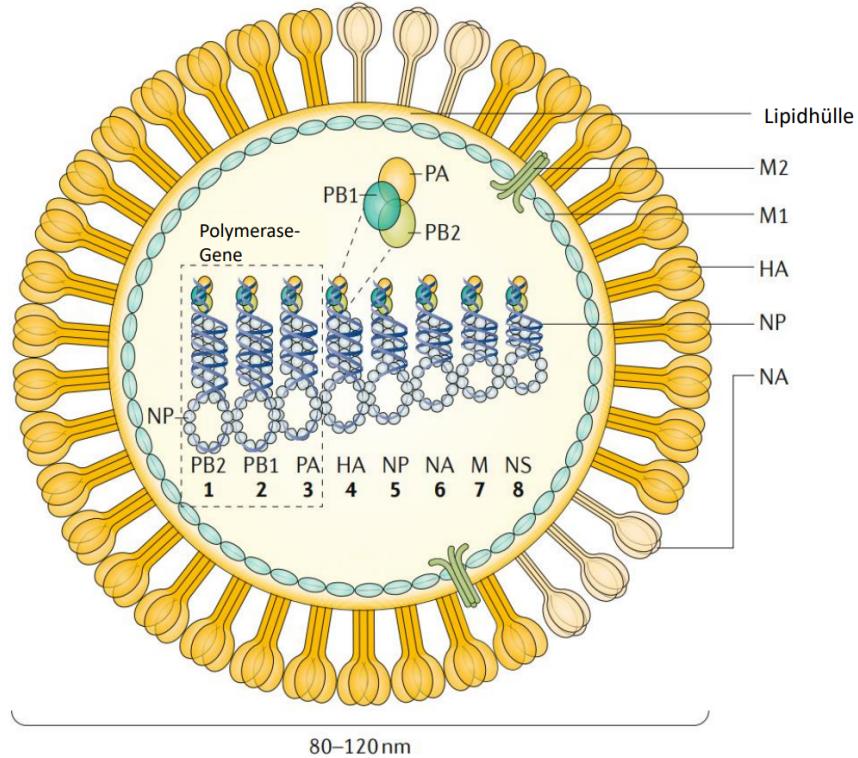


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus:** Das Influenza A Virus besteht aus acht Genom-Segmenten, welche für die 10 essentielle Proteine codieren. Zu diesen zählen die Neuraminidase (NA), das Hämaggglutinin (HA), das Matrixprotein (M1), das Membranprotein (M2), das Nichtstrukturprotein NS1, das *nuclear export protein* NEP, das Nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, Pb1 und Pb2 der RNA-Polymerase (Luo 2011; Krammer *et al.* 2018). Die Zahlen geben das jeweilige Genomsegment an. Bild modifiziert nach Krammer *et al.* (2018).

Der Replikationsmechanismus des Influenza A Virus beginnt mit der Bindung des HA an die Sialinsäure auf der Oberfläche von Lungenepithel-Zellen. Durch die Bindung wird das Virus über die Bildung eines Endosoms in die Zelle aufgenommen (Krammer *et al.* 2018). Durch den geringen pH-Wert im Endosom gibt es eine Konformationsänderung in den HA-Proteinen was dazu führt, dass das Virus mit dem Endosom fusioniert. Gleichzeitig untergeht das M2-Protein eine Konformationsänderung, wodurch ein Ionen-Kanal entsteht und Protonen den pH-Wert im Virus-Innenraum senken (Matsuoka *et al.* 2013). Dadurch dissoziert das M1 Protein von dem vRNP-Komplex und das Virus-Genom gelangt ins Cytoplasma (Matsuoka *et al.* 2013; Chauhan & Gordon 2022). Die Genomsegmente werden in den Zellkern transportiert wo die Transkription durch die Virus eigene Polymerase (PA, Pb1 und Pb2) sowie die Replikation über ein positiv orientiertes, komplementäres Ribonuklein-Komplex-Intermediat (engl.: *complementary ribonucleoprotein*, cRNP) stattfindet (Krammer *et al.* 2018). Durch ein sogenanntes “cap-snatching” vermittelt vom Pb2 werden 5'-cap Strukturen von umliegenden Host mRNAs an die eigene virale RNA gebracht und so die Transkription initialisiert. Am 3'-Ende gerät die Pb1 Untereinheit in eine Art “stottern” wodurch eine Polyadenylierung erfolgt (Chauhan & Gordon 2022). Die gecappten und polyadenylierten viralen mRNA's gelangen ins Cytoplasma wo durch die Ribosomen die neuen viralen Proteine entstehen. Die Polymerase-Proteine (PA, Pb1 und Pb2) und die NP-Proteine werden erneut in den Zellkern importiert, um die Transkription weiter zu beschleunigen (Krammer *et al.* 2018). Die

Proteine M2, HA und NA wandern zur Zellmembran und integrieren in diese. Des Weiteren werden das NS2 und M1 Protein in den Zellkern rekrutiert, wo sie die den vRNP-Komplex mit den Genomsegmenten binden und den Export zur Zell-Membran koordinieren. (Krammer *et al.* 2018; Chauhan & Gordon 2022). Dort angekommen findet der Zusammenbau und das Budding (sprich die Umhüllung mit der Zellmembran mit den integrierten HA, NA und M2-Proteinen) des Virions statt. Über die katalytische Aktivität des NA, welches terminale Salizylsäure von der Hostzelle spaltet, wird das neue Virion freigegeben (Matsuoka *et al.* 2013; Chauhan & Gordon 2022).

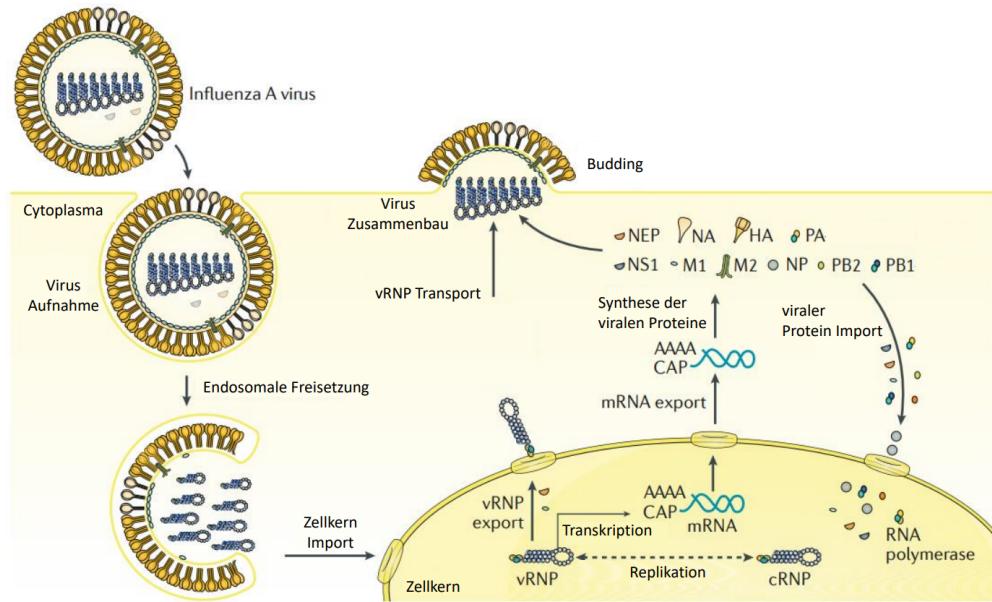


Abbildung 3: **Vereinfachte Darstellung des Influenza Replikationszyklus:** Das Virus gelangt über Endozytose und Endosombildung ins Zellinnere, und gibt das Genom ins Zellinnere. Die virale RNA wandert mit dem vRNP-Komplex in den Zellkern und die Transkription wird gestartet. Die virale mRNA wird im Cytoplasma zu viralen Proteinen translatiert, welche mit dem vRNP-Komplex neues Virion bilden und die Zelle über das Budding verlassen. HA, Hämagglyutinin; M1, Matrixprotein; M2, Membranprotein; NA, Neuraminidase; NEP, nuclear export protein; NP, Nucleoprotein; NS1, Nichtstruktur Protein; PB1, PB2 and PA, virale RNA-Polymerase.

1.2.2 Influenza B

Innerhalb von saisonalen Epidemien ist das Influenza B Virus ein ständiger Begleiter des Influenza A Virus und co-zirkuliert mit diesem (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). Dessen ungeachtet ist das Influenza B Virus für ca. 23 % aller Influenza-Erkrankungen mit einer besonders hohen Sterblichkeit von über 50 % bei Kindern (0 - 18 Jahre) verantwortlich (Zaraket *et al.* 2021).

Die Genomstruktur und der Aufbau der Influenza B Viren ist identisch mit dem des Influenza A Virus (siehe Abbildung 2) (Hampson & Mackenzie 2006). Jedoch unterscheiden sich die Proteine der Virus-Typen in Länge, Aminosäure-Komposition und Funktion (Koutsakos *et al.* 2016). So ist das Genom des Influenza B Virus mit rund 14,6 kb leicht größer und codiert für 11 Proteine (Paterson *et al.* 2003; Sandt *et al.* 2015). Dabei bleiben die 10 essenziellen Proteine erhalten (siehe Abbildung 2) während viele Accessoire-Proteine wegfallen

(Sandt *et al.* 2015). Der wichtigste Unterschied zwischen Influenza B und Influenza liegt in zwei Proteinen, welche nur in dem Influenza B Virus enthalten sind. So codiert das Segment 6 ein NB-Protein, welches ein hochkonserviertes Protein mit Ionenkanalaktivität ist, sowie das auf Segment 7 codierte BM2-Protein (Sandt *et al.* 2015). Letzteres ist ein kleines hydrophobes integrales Membranprotein, welches eine Ionenkanalaktivität, ähnlich wie das M2-Protein bei Influenza A, besitzt und essenziell für die Virus-Replikation ist (Paterson *et al.* 2003; Hatta *et al.* 2004). Außerdem unterscheidet sich Influenza B durch seine RNA-Polymerase, welche zusätzlich unmethylierte gecappte mRNA's erkennen kann sowie bei dem NP-Protein, welches deutliche strukturelle Unterschiede aufweist (Koutsakos *et al.* 2016). Des Weiteren besitzt das Influenza B Virus eine langsamere Mutationsrate als Influenza A (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 Antigenshift mit den Influenza A Viren möglich ist (Paterson *et al.* 2003).

1.3 Proteinbasierte Nachweismethoden von Influenza

Respiratorische Erkrankungen hervorgerufen durch die Influenza Viren bleiben, trotz Impfungen und einem sich weiterentwickelndem Gesundheitssystem, ein ernst zu nehmendes Problem. Die Behandlung ist dabei zeitabhängig und Medikamente wie Oseltamivir sollten in den ersten 48h nach Symptombeginn verabreicht werden (Whitley 2007). Des Weiteren sind einige Medikamente wie Amantadin spezifisch bei dem Influenza A Virus zu verabreichen (Świerczyńska *et al.* 2022). Aus diesem Grund ist eine zeitige und spezifische Diagnostik entscheidend für eine rechtzeitige Behandlung (Vemula *et al.* 2016). Die Detektion der Influenza Viren erfolgt über Standardverfahren wie Antikörpertests, Serologischen Methoden, Zellkultur sowie Nukleinsäure basierte Testverfahren wie Nukleinsäureamplifikation oder Sequenzierung (Vemula *et al.* 2016). Bei serologischen Testverfahren wird auf Antikörper im Serum des Patienten untersucht, die gegen spezielle Virusproteinen (HA oder NA) gerichtet sind. Dadurch können einzelne Subtypen des Influenza A Virus unterschieden werden (Woźniak-Kosek A 2014). Jedoch benötigen serologische Tests für ein adäquates Ergebnis, mehrere Seren eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten. Dies verhindert ein schnelles Ergebnis und ist somit für die Routine-Diagnostik ungeeignet (Chow *et al.* 2019). Die Diagnostik mittels Zellkultur benötigt spezielle Zelllinien und Präparation. Ein solches System ist nicht die erste Wahl für eine Schnelldiagnostik, da hier trotz hoher Spezifität und Sensitivität, längere Inkubationszeiten entstehen (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). Des Weiteren können Influenza detektierende Schnelltests (engl.: *rapid influenza diagnosis tests*, RIDT) für die POCT verwendet werden, welche binnen 30 Minuten ein Ergebnis liefern (Lin *et al.* 2022). Die Antikörpertests unterliegen jedoch Limitationen. So besitzen sie einerseits geringe Sensitivitäten und sind andererseits spezifisch für ein Antigen (HA oder NA). Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, unterliegt besonders Influenza A Mutationen durch den Antigenshift und Antigendrift, wodurch vor allem in Pandemien neue Varianten der Antigene entstehen. Diese können nicht mehr von den Antikörpertests detektiert werden und es kommt zu falsch negativen Ergebnissen (Yi *et al.* 2013; Lin *et al.* 2022).

1.4 Nukleinsäure amplifizierende Methoden zur Influenza Detektion

Nachweis-Methoden mit hohen Sensitivitäten und Spezifitäten sind essenziell für eine genaue Diagnose und medizinische Behandlung. Dabei sind Nukleinsäure amplifizierende Methoden (engl.: *nucleic acid amplification techniques*, NAAT) zusammen mit Antikörpertests der Goldstandard in der klinischen Diagnostik und die empfohlenen Methoden zur Detektion von Influenza Viren (Uyeki *et al.* 2018). Innerhalb der NAAT werden einzelne Nukleinsäure-Moleküle über verschiedenste Methoden, wie PCR oder isotherme Amplifikation vermehrt (amplifiziert) und so ein Signal erzeugt. Somit ist es möglich spezifisch einzelne Nukleinsäure-Moleküle nachzuweisen (Özay & McCalla 2021; Kang *et al.* 2022). Für die Influenza Diagnostik wird routinemäßig RT-PCR (reverse-Transkriptase-PCR) verwendet, jedoch auch isotherme Assays, wie LAMP (engl.: *loop mediated isothermal amplification*) oder NASBA (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*) sind bereits beschrieben (Vemula *et al.* 2016). Gerade die RT-PCR biete dabei ähnlich hohe Sensitivitäten wie die Zellkultur und die Serologischen Tests und ist somit den Antikörpertests überlegen. Des Weiteren ist die Detektion von der Nukleinsäure abhängig. Durch die Wahl konservierter Sequenzbereiche sind NAAT nicht anfällig gegenüber veränderten Proteinstrukturen wodurch falsch negative Ergebnisse, hervorgerufen durch neue Varianten, vermieden werden können (Woźniak-Kosek A 2014).

1.4.1 Die Polymerase Kettenreaktion - PCR

Die PCR, entwickelt von Mullis *et al.* (1986) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Sie war ein Meilenstein in der Molekularbiologie, da erstmals Nukleinsäuren spezifisch vermehrt werden konnten und somit für Genetik, Forensik und Diagnostik verwendet werden konnten (Gaňová *et al.* 2021). Das Prinzip der PCR beruht auf einem Konzept von zwei ca. 20 bp großen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, welche einen bestimmten Sequenzbereich flankieren. Sie binden spezifisch an ein komplementäres DNA-Fragment und werden von einer Polymerase verlängert. Das sogenannte Primerpaar, besteht aus forward (komplementär zu einer Sequenz auf dem Sense-Strang) und reverse (komplementär zu einer Sequenz auf dem Antisense-Strang) Primer (Mülhardt 2009). Der grundlegende Reaktionsmechanismus der PCR besteht aus 3 Zyklen; der 1) DNA-Denaturierung, der 2) Primerhybridisierung und der 3) Elongation (Abbildung 4). Im ersten Schritt werden mittels hoher Temperatur ($\approx 95^{\circ}\text{C}$) die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA aufgeschmolzen und damit die DNA denaturiert. Bei dem Hybridisations-Schritt ($55 - 65^{\circ}\text{C}$) kommt es zum sogenannten "annealing", d.h. der Anlagerung der Primer an die DNA (Sreejith *et al.* 2018). Im nachfolgenden Amplifikationsschritt ($\approx 72^{\circ}\text{C}$) bindet die thermostabile Taq-Polymerase (Taq, abgeleitet von *Thermus aquaticus*) an das 3'-OH Ende des angelagerten Primers und erweitert den Primer anhand der komplementären DNA und verdoppelt diese (Clark & Pazdernik 2009). Somit ist ein Zyklus abgeschlossen und ein neuer beginnt mit einer erneuten DNA-Denaturierung. Für eine erfolgreiche Amplifikation werden bis zu 45 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 Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Wood *et al.* 1994).

Da die bei der Standard PCR verwendeten Taq-Polymerase keine RNA als Ausgangsmaterial erkennt, wird eine zusätzliche reverse Transkriptase (RT)-Reaktion der PCR benötigt. Bei der RT kommt es zur Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (engl.: *complementary DNA*, cDNA), welche anschließend über den beschriebenen PCR-Mechanismus amplifiziert werden kann (ODriscoll *et al.* 1993; Mülhardt 2009). Diese Erweiterung der PCR wird als RT-PCR bezeichnet (Bustin *et al.* 2005).

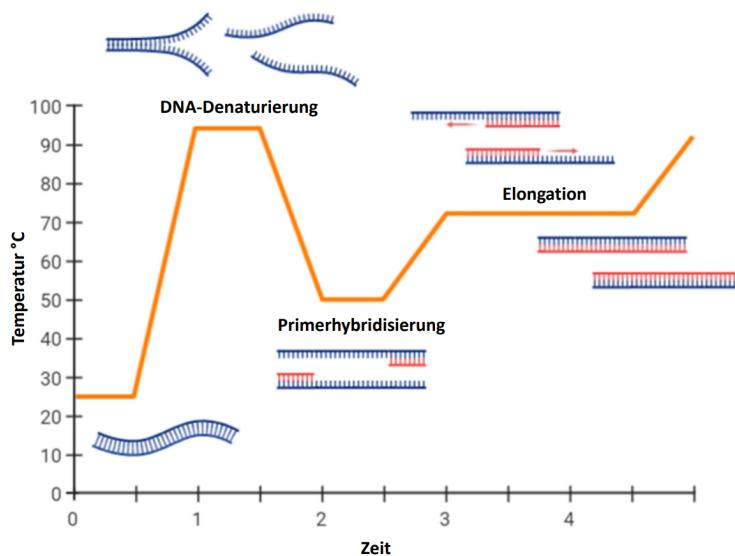


Abbildung 4: **Reaktionsmechanismus der 3-Stufen PCR:** Die PCR ist schematisch mit angefügter Temperaturkurve dargestellt, bestehend aus den 3 Schritten: 1) DNA-Denaturierung, 2) Primerhybridisierung und 3) Elongation. Die doppelsträngige DNA (blau) wird bei ≈ 95 °C denaturiert, und es können Primer (rot) bei 50 °C an die einzelsträngige DNA binden. Diese werden mittels der Taq-Polymerase bei 72 °C erweitert (rote Pfeile), bis zwei doppelsträngige DNA-Moleküle vorliegen. Bild modifiziert nach Tiago Lopes (2020)

Ein weiterer Fortschritt 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 (Reportermolekül) mit einem sogenannten Quencher, welche sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befinden. Der Quencher ist ein weiteres Molekül, welches die Emissionsenergie (Fluoreszenz) des Reportermoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) aufnimmt und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann (Ranasinghe & Brown 2005). Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die hybridisierte Sonde innerhalb der Elongation hydrolysiert, wodurch Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt werden (Thornton & Basu 2011). Der FRET zwischen Fluorophor und Quencher wird aufgehoben und das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Mit dem freiwerdenden Fluoreszenzsignal kann ein bestimmtes Verhältnis zur amplifizierten DNA quantitativ abgeleitet werden, so dass eine Echtzeit-Verfolgung der Nukleinsäureamplifikation ermöglicht wird. Durch die Einführung eines Fluoreszenzemissions-Schwellenwertes, dem sogenannten c_q -Wert (engl.: *cycle quantification*), welcher an einem Zeitpunkt von dem Fluoreszenzsignal überschritten wird, lässt sich ein bestimmter DNA-Gehalt der Reaktion mit der Reaktionszeit verknüpfen (Bustin 2000; Lovatt 2002).

1.4.2 Isotherme Amplifikationstechniken

Isotherme Amplifikationstechniken (IA) können Nukleinsäuren bei einer gleichbleiben Temperatur amplifizieren (Kang *et al.* 2022). Sie bieten eine vereinfachte Handhabung, wodurch weniger qualifiziertes Personal zur

Durchführung benötigt wird. Durch die gleichbleibende Temperatur besitzen sie geringere Anforderungen an Gerätschaften. Infolgedessen werden preisintensive Thermocycler, welche für die PCR verwendet werden, nicht benötigt (Behrmann, Bachmann, Hufert, *et al.* 2020; Boonbanjong *et al.* 2022). Dadurch bieten sie eine Alternativen zur PCR für die POCT und können dezentral für die Diagnostik eingesetzt werden (Zhao *et al.* 2015). Ab den 1990er Jahren wurden viele isotherme Methoden entwickelt, die unterschiedliche Aspekte kombinieren und somit ein Repertoire für verschiedenste Applikationen bilden (Zhao *et al.* 2015). So kann die Influenza Diagnostik mit IA bereits ergänzt werden (Vemula *et al.* 2016). Besonders hervorzuheben unter den IA ist die RPA (engl.: *recombinase polymerase amplification*). Sie verbindet viele positive Effekte und biete eine robuste, simple und effektive Plattform für die POCT (Li *et al.* 2019; Glöckler *et al.* 2021). Ausgewählte isotherme Goldstandard Methoden wie die LAMP, NASBA sowie die RPA werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation - LAMP

Die erstmal im Jahr 2000 von Notomi (2000) entwickelte LAMP ist die bekannteste IA. Die LAMP amplifiziert DNA bei einer konstanten Temperatur von 60 - 65 °C. Anders als z.B. bei der PCR werden bei der LAMP vier bis sechs Primer verwendet, wodurch sie zwar einerseits sehr hohe Spezifitäten erreicht, andererseits aber dadurch hohe Anforderungen an das Primer-Design sowie deren Optimierung bestehen (Soroka *et al.* 2021). Die LAMP-Primer werden in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer unterteilt. (Nagamine *et al.* 2002). Die Primerpaare binden jeweils an unterschiedlichen Regionen der Ziel-DNA (siehe Abbildung 5) und erfüllen verschiedene Aufgaben (Huang *et al.* 2020). Die DNA-Amplifikation der LAMP ist enzymatisch mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase realisiert, welche im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt (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 (siehe Abbildung 5). 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 (engl.: *loop*) aus. Der eben beschriebene Amplifikationsschritt findet auch mit den entgegen gesetzten inneren und äußeren Primern statt. Dadurch entsteht ein DNA-Fragment, welches die oben erwähnte Form einer Hantel besitzt (Abbildung 5)(Parida *et al.* 2008).

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 als weiterer Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf der Reaktion entstehen verschiedenste Strukturen wie Konkatenäre 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 über bestimmte Methoden erfolgen kann (Parida *et al.*

2008). So kann die Quantifizierung der Amplifikation einerseits über kolorimetrische Fluoreszenzfarbstoffe wie Calcein (Tomita *et al.* 2008) oder andererseits über Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I (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 Reaktionsmixtur führt (Mori *et al.* 2001).

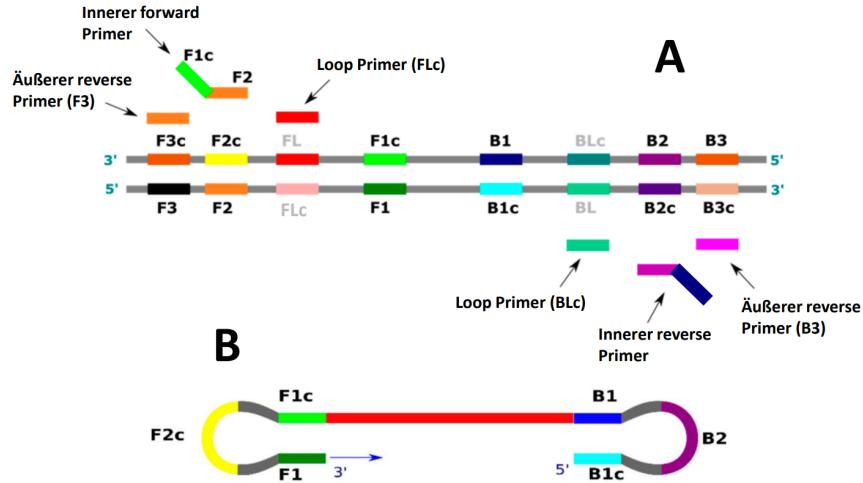


Abbildung 5: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP:** A: Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußenen Primer liegen „hinter“ den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung 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)

1.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation - NASBA

Die NASBA ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode zum Nachweis von RNA Ausgangsmaterial (engl.: *template*) (Compton 1991; Deiman *et al.* 2002). Im Gegensatz zur PCR benötigt die NASBA keinen vorhergehenden RT-Schritt und ist damit ideal zur Detektion von Influenza Viren, welche RNA-Genome aufweisen (Compton 1991; Moore *et al.* 2004; Bachman 2013). Die erstmals von Guatelli *et al.* (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzym Mix bestehend aus einer RT des Alpharetrovirus, der RNase H und der T7 DNA-abhängigen RNA-Polymerase (engl.: *DNA dependent RNA polymerase*, DdRp) (Deiman *et al.* 2002). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer DNA-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 besitzt hingegen eine DdRp Promotor Sequenz. Der hybridisierte DNA-primer wird von der im Reaktionsmix enthaltenen RT verlängert (41 °C) und es entsteht ein cDNA/RNA-Hybrid. Der RNA-Anteil wird anschließend von der RNase H verdaut, sodass der einzelsträngige cDNA-Anteil mit der Promotorsequenz erhalten bleibt. Ein zweiter 20 bp langer Primer (komplementär zur cDNA) hybridisiert und vervollständigt mittels RT den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche viele RNA-Kopien des DNA-Templates erzeugt (Abbildung 6). Die neu entstandenen RNA-Moleküle reihen sich in diesen Zyklus ein und es kommt zur exponentiellen Amplifikation (Abbildung 6) (Compton 1991).

Zur Echtzeitetektion und Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle hybridisations-Sonden sogenannte “*Molecular Beacon*” verwendet werden (Deiman *et al.* 2002). Diese besitzen die Struktur einer Haarnadel, wobei das eine Ende mit einem Reporterfluorophor und das andere Ende mit einem Quencher gekoppelt sind. Die Haarnadel-Struktur 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 (Abbildung 6). Die Sequenz innerhalb der ausgebildeten Schleife ist komplementär zu einer Region auf dem zu detektierenden RNA-Moleköl. 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).

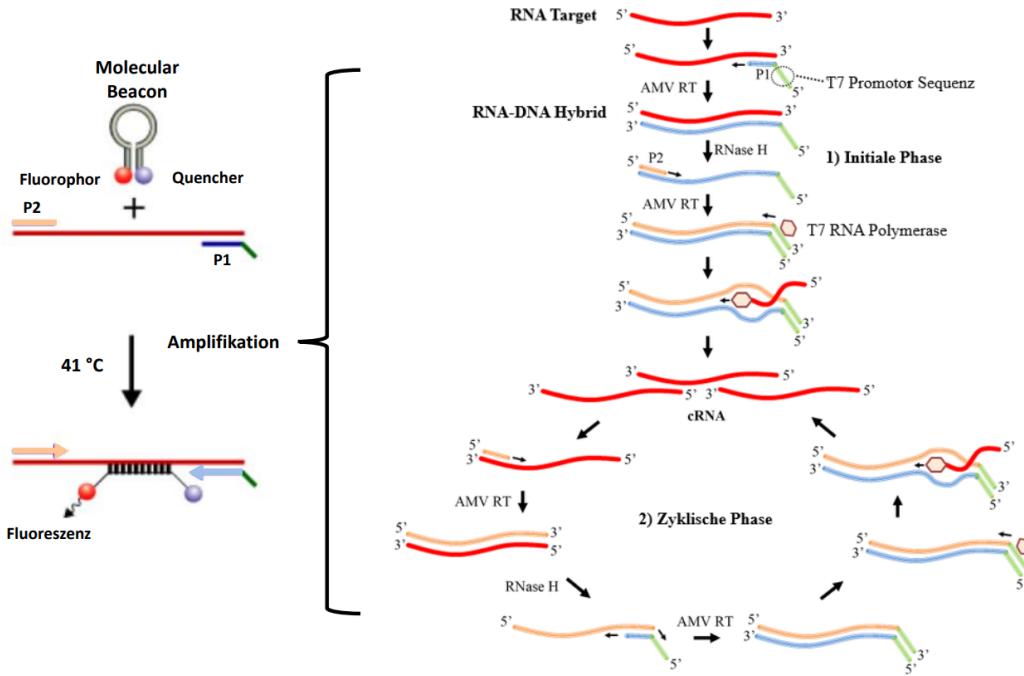


Abbildung 6: **Schematischer Reaktionsmechanismus und Detektion der Nukleinsäure sequenzbasierte Amplifikation (NASBA)** : Die NASBA lässt sich einteilen in die 1) initiale Phase und die 2) zyklische Phase. Die Template-RNA (rot) bildet durch die Hybridisation von Primer P1 ein cDNA/RNA Hybrid, welches über einen RNase-Verdau und erneute DNA-Synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt wird. Durch den auf dem Doppelstrang aktiven Promotor (grün) 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 deinen DNA-Doppelstrang mit aktiven Promotor überführt wird. Die Detektion erfolgt über “*Molecular Beacon*”, welche mit der komplementären Sequenz im inneren der Schleife an die Ziel-RNA hybridisieren. Dadurch werden Quencher (grau) und Fluorophor (rot) voneinander getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Bild Modifiziert nach Zhong & Zhao (2018) und PREMIER (2023).

1.4.5 Rekombinase Polymerase Amplifikation - RPA

Die von (Piepenburg *et al.* 2006) entwickelte RPA ist ein von dem Replikationszyklus der T4 Bakteriophage angepasstes isothermes Amplifikationssystem (Li *et al.* 2019). Der Mechanismus der Vervielfältigung der DNA beruht dabei auf einem koordinierten Zusammenspiel der Rekombinase und dem Rekombinase loading factor der T4 Bakteriophage, den single-stranded binding proteinen (SSB) und der Sau-DNA-Polymerase (abgeleitet von *Staphylococcus aureus*) (Li *et al.* 2019). Im ersten Schritt bindet die T4 UvsX Rekombinase mithilfe des T4 UvsX Rekombinase Co-Enzyms unter ATP-Verbrauch an einzelsträngige DNA-Primer (Daher *et al.* 2016; Lobato & OSullivan 2018). Der entstandene Rekombinase-Primer-Komplex migriert entlang doppelsträngiger DNA und sucht die zu den gebundenen Primern homologen Sequenzen. Wird ein homologer Bereich gefunden, verdrängt der Komplex den Doppelstrang und bindet mithilfe des Primers unter Bildung einer D-Schleife an den komplementären DNA-Einzelstrang. Der Rekombinase-Komplex dissoziiert nach erfolgreicher Primerbindung unter ATP Verbrauch und kann wieder an neue Primer binden. Eine Rehybridisierung und die damit einhergehende Verdrängung des gebundenen Primers durch den abgespaltenen DNA-Einzelstrang wird durch die Anlagerung von SSB's an den Einzelstrang 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. Sie besitzt eine Strangverdängungsaktivität, wodurch der DNA-Doppelstrang weiter aufgebrochen wird und somit die Verlängerung des Primers fortgesetzt wird. Dies führt zu zwei neu synthetisierten doppelsträngigen DNA-Molekülen, welche erneut in die oben beschriebene Reaktion eingehen und so zur exponentiellen Amplifikation führen (Babu *et al.* 2018; Tan *et al.* 2022).

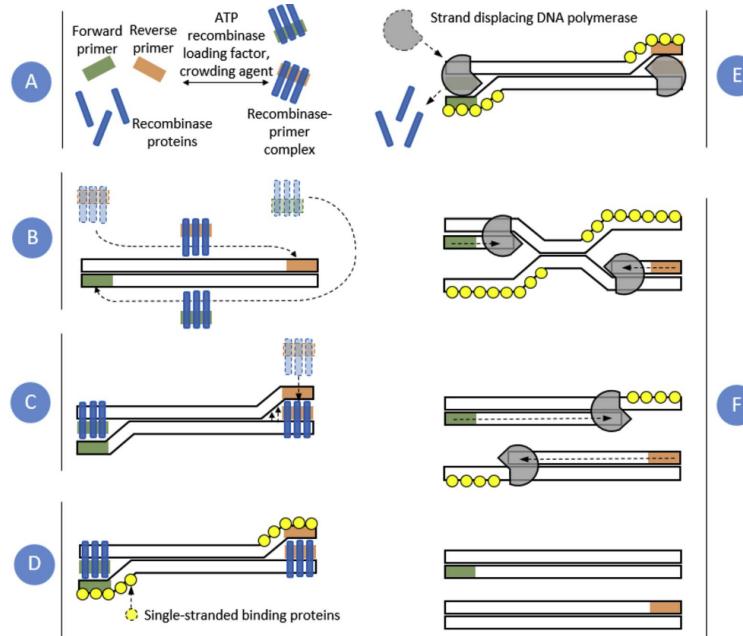


Abbildung 7: **Schematischer Reaktionsmechanismus der RPA:** Im ersten Reaktionsschritt der RPA bildet sich der Rekombinase-Primer-Komplex (A), welcher entlang der doppelsträngigen DNA migriert (B). Wird eine zu den Primern homologe Sequenz gefunden, wird der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz gebunden (C) und die SSB stabilisieren die verdrängte einzelsträngige DNA (D). Die Polymerase bindet an die Primer (E) und verlängert diese (F). Bild modifiziert nach Lobato & OSullivan (2018).

Um die Dissoziation des Rekombinase-Primer-Komplexes zu unterbinden und die Amplifikation zu beschleu-

nigen wird Polyethylen Glucol (PEG) als sogenanntes “*crowding-agent*” verwendet (Lillis *et al.* 2016; Lobato & OSullivan 2018). Dieses 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. Vor allem bei niedrigen DNA-Konzentrationen kann deshalb ein zusätzlicher Mischschritt während der laufenden RPA-Reaktion erforderlich sein (Lillis *et al.* 2016). Ebenfalls kann, ähnlich wie bei der RT-PCR, die RPA mit einer RT-Reaktion kombiniert werden, um RNA als template zu verwenden (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, die einen Amplifikationsbereich von wenigen 100 bp flankieren (Li *et al.* 2019). Für das Design der RPA-Primer ist ein automatisiertes Programm beschrieben (Higgins *et al.* 2018). Innerhalb des Primerdesigns konnte gezeigt werden, dass bis zu drei drei Nukleotid-Fehlpaarungen pro Primer, die RPA nicht beeinflussen (Boyle *et al.* 2013). Jedoch konnte von Higgins *et al.* (2022) gezeigt werden, dass Art und Lage der Fehlpaarung größeren Einfluss als die Anzahl auf die RPA besitzen (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. Man unterscheidet für die RPA verschiedene Sondentypen wie die Exonuklease (Exo)-Sonde oder die Formamidopyrimidin DNA glykosylase (fpg)-Sonde (Powell *et al.* 2018; 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 unblockierten 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 jedoch 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 (Abbildung 8). Jedoch wurden bei RPA-Systemen mit fpg-Sonden geringere Sensitivitäten als bei dem Exo-Sonden Konterpart beobachtet (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 Ablauen 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). Hierbei wird eine neue Sonde die Endonuklease IV (nfo)-Sonde verwendet, welche eine a-basische Seite besitzt und am 5'-Ende mit einem Carboxyfluorescein (FAM)-Fluorophor markiert ist. Zusammen mit Biotin markierten reverse Primern entstehen doppelt markierte Amplifikate (FAM und Biotin), welche über die Biotin-Streptavidin Interaktion an die lateral flow Oberfläche gebunden werden und über Anti-FAM Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 8)(Daher *et al.* 2016).

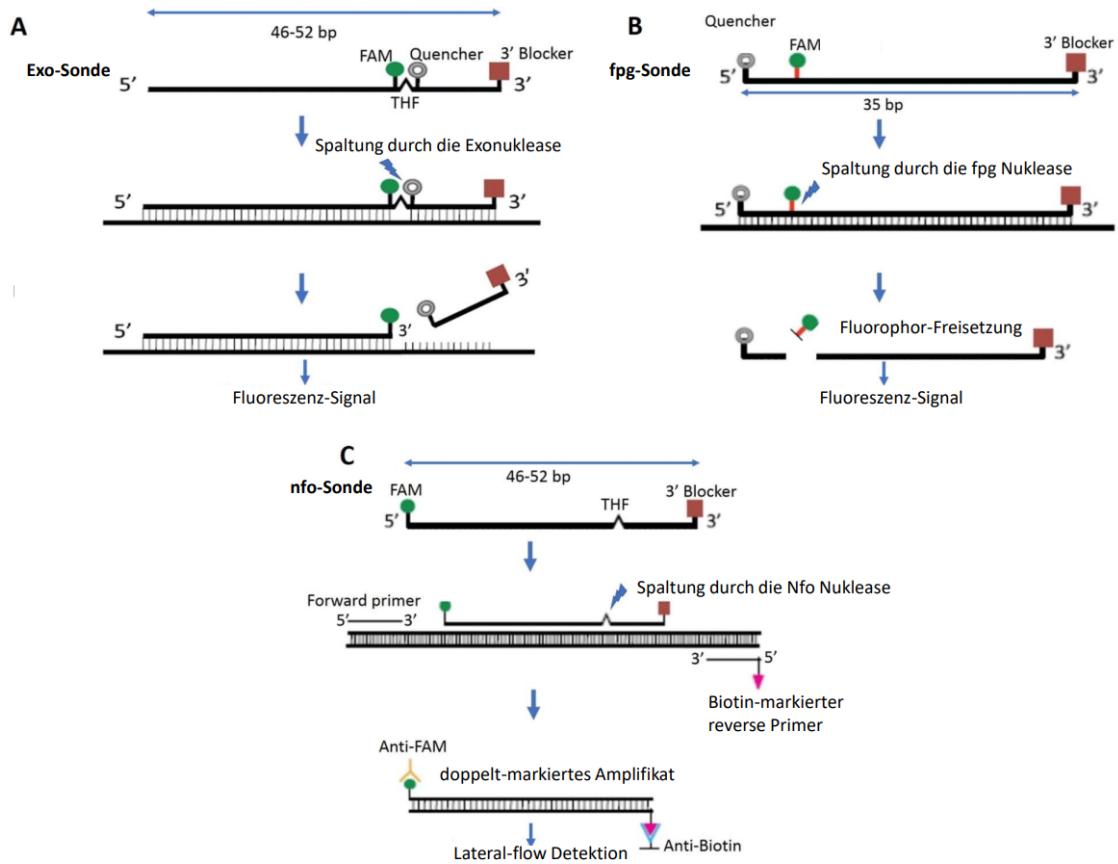


Abbildung 8: **Vergleichende Darstellung der RPA-Sondentypen:** Die quantitative Detektion der RPA kann über A) exo-Sonden oder B) fpg-Sonden erreicht werden sowie die Detektion über lateral flow mittels C) nfo-Sonde.

A,B: Über eine enzymatische Aktivität wird die a-basische Seite gespalten, somit Fluorophor und Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden.

C Durch Spaltung der Sonde entstehen mit FAM und Biotin markierte Amplifikate, welche über Avidin gebunden werden und über Antikörper nachgewiesen werden. FAM, Carboxyfluorescein; THF, a-basische Seite.

1.5 Ziel der Arbeit

Ein aktuelles BMBF-Projekt befasst sich mit der Point-of-Care Diagnostik respiratorischer Viren. Zur Vor-Ort Analytik sollen mittels des isothermen RPA-Detektionssystems die verschiedenen Viren in einem mobilen Kofferlabor beprobt 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-Kombinationen designt und diese in einem Auswahlverfahren getestet werden. Die analytische Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Systeme sollte mittels in vitro synthetisierter RNA-Standards ermittelt, so die Systeme Charakterisiert und mit entsprechenden PCR-Systemen verglichen werden. Reaktionstemperatur, Mischzeitpunkt der Reaktion, Ansatzvolumen sowie der Einfluss von asymmetrischen Primer-Konzentrationen sollten für die isothermen Assays zum Einsatz im Kofferlabor optimiert werden. Zusätzlich sollen Auswirkungen unterschiedlicher Sondenmodifikation charakterisiert werden. Die Eignung für die klinische Diagnostik der optimierten RT-RPAs sollte anhand simulierter („gespikter“) Proben überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bioinformatische Methoden

Das folgende Kapitel umfasst die Bioinformatisch durchgeführten Methoden wie das RPA Primerdesign sowie die Modifikation der Primer und Sonden. Des Weiteren wird die Auswertung der Messdaten und deren Analysemethoden erläutert.

2.1.1 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 2 angegeben.

Tabelle 2: Übersicht der Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA

Parameter	Wert
Länge der Primer	30 - 34 bp
Länge der Sonde	50 bp
Sondentyp	Exo-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 B Virus diente das Virusgenomsegment 8 (GenBank Nr.: MT637911). Für das Influenza A Virus dienten die Sequenzen des Virusgenomsegmentes 7 der Subtypen H1N1 (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2 (GenBank Nr.: MT244214) als Referenzsequenzen. Von beiden Subtypen wurde eine Konsensus-Sequenz erstellt und mithilfe dieser die Primer und Sonden designt. Die Primer und Sonden wurden so gewählt, dass sie 4 oder weniger Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Subtypen aufweisen. Alle konstruierten Primer-Sonden-Kombinationen 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-Kombinationen mit DNA-Sequenzen des gleichen Virusgenomsegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Fehlpaarungen am 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-Kombinationen wurden zusätzlich die Basen so angepasst, dass jeweils beide Subtypen ähnlich viele Fehlpaarungen aufweisen, um so ein optimales Alignment an die Sequenzen zu gewährleisten. Bei den Influenza B Primer-Sonden-Kombinationen war dies nicht notwendig, da die Sequenzen im gewählten Bereich homolog sind.

¹<http://www.primer-dimer.com/>

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

2.1.2 Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen

Das Prinzip der Signalgenerierung von Fluoreszenzsonden ist bei PCR und RPA gleich. Es beruht auf dem FRET-Prinzip (siehe 1.4.1), welches während der Reaktion durch die räumliche Trennung des Reporterfluorophors und des Quenchers außer Kraft gesetzt wird.

PCR-Sonden

Alle verwendeten PCR-Sonden (siehe Tabelle 5 und 6) 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, indem die erste Thymin-Base nach 30 bp mit dem Reporterfluorophor markiert wurde. Das nachfolgende Nukleotid wurde mit einer a-basischen Seite substituiert (siehe Abbildung 9). Diese besteht aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat ohne Nukleobase. Nachfolgend wurde über interne "linker" an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrades der nächsten zwei Nukleotide ein entsprechender Quencher gekoppelt (siehe Abbildung 9A). 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). Für eine Sondenvergleichsstudie wurde zusätzlich für das Influenza A Virus eine zweite *dT-quenched* Sonde mit der gleichen Sequenz modifiziert. Die Kopplung des Quenchers erfolgte hierbei an das nachfolgende dT-Nukleotid (siehe Abbildung 9B).

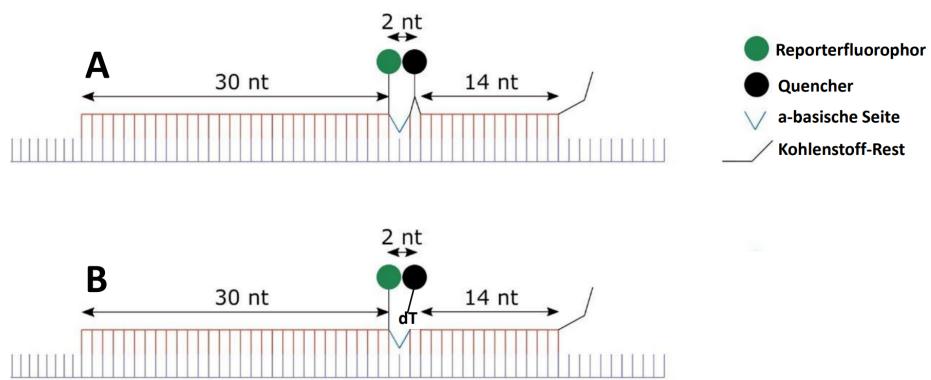


Abbildung 9: **Schematischer Aufbau der RPA-Sonden:** Vergleichende Gegenüberstellung RPA Sonden mit Reporterfluorophor (grün), Quencher (schwarz), a-basischer Seite und Kohlenstoffrest gebunden an die Ziel-DNA.

A: Sonde mit intern gebundenem Quencher (*internally quenched*, iQ).

B: Sonde mit dT-gekoppeltem Quencher (*dT-quenched*). Bild modifiziert nach Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* (2020)

2.1.3 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). Es wurde die R-Version 4.2.2 für die Auswertung der Daten verwendet.

Normalisierung der Fluoreszenz-Daten:

Für die Normalisierung der Daten wurde der Mittelwert der ersten fünf Messwerte jeder Amplifikationskurve berechnet, entsprechend Ritz & Spiess (2008) 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) 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 (SHAPIRO & WILK 1965) 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 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 MAD³ (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).

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

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

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

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

Polygon Test:

Innerhalb dieses Tests wird der Anstieg (Δy) pro Zeitintervall (Δt) 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 (Rödiger *et al.* 2015). Als Schwellenwert für eine positive Amplifikation wurde hier empirisch ein Wert von 10 festgelegt.

$$((x_2 - x_1)) * ((y_2 + y_1)) \cong (\Delta t) * ((y_2 + y_1)) \quad (3)$$

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 eingestuft (Aranha *et al.* 2021). Um dies zu berücksichtigen, wurde der *Schwellenwert Test*, eingeführt.

Schwellenwert Test:

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 als C_q -Wert angegeben, ist der Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenzwerte einer Amplifikation einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten und sich zusätzlich signifikant vom Grundrauschen unterscheiden (Bustin *et al.* 2009). Für die RPA wird dies als TT-Wert (engl. *threshold time*) definiert (Diagne *et al.* 2020). Zur 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 beschrieben Wert (siehe Kapitel 2.1.3) verwendet (Rödiger *et al.* 2015).

2.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten

In der deskriptiven Statistik ist der Vergleich von Datensätzen ein Standardverfahren. Bei zwei Gruppen wird dies 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, die 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 nachfolgend ein Games Howell Test durchgeführt, um die Verhältnisse der einzelnen Gruppen zu untersuchen (Lee & Lee 2018).

2.1.5 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 die Normalverteilungsfunktion ϕ auf ein parametrisches Regressionsmodell (siehe Formel (5)) übertragen, d.h. es wird eine Regression von $\phi^{-1}(p_x)$ auf x durchgeführt (Bingham & Fry 2010). Die sich daraus ergebende 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 von Toxinen auf Lebewesen mathematisch zu bestimmen (Bliss 1934). Aufgrund der gleichen Datenlage lässt sich dieses Modell jedoch auch verwenden, um das untere Detektionslimit mittels einer Konzentrationsreihe für ein Nukleinsäure-Amplifikationssystem zu ermitteln. Die Probit-Analyse anhand von Amplifikationsdaten erfolgte mittels einer R-skripts beschrieben in Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* (2020).

2.2 Herstellung synthetischer RNA-Standards

Zur Etablierung und Optimierung der RPA-Protokolle wurde eine definierte Menge amplifizierbarer RNA-Moleküle eingesetzt, um damit die Vergleichbarkeit der Protokolle zu ermöglichen. Dafür wurden molekularbiologisch definierte Virus-RNA Standards der zu amplifizierenden Nukleinsäuren *in vitro* hergestellt. Die RNA-Standards für das Influenza A Virus wurden wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben hergestellt. Für das Influenza B Virus war bereits eine transformierte *E. coli* Kultur in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Aus diesem Grund sind die Arbeiten dazu erst ab Kapitel 2.2.2 beschrieben.

2.2.1 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 (Protokoll⁵ online verfügbar). Als Vektor dienten artifiziell synthetisierte Plasmide (Invitrogen), die eine Antibiotikaselektivkassette, die virale RNA-Sequenz als DNA-Gegenstück, sowie eine Promotorsequenz der T7 DN-abhängigen RNA-Polymerase beinhalten (Plasmidkarten siehe Abbildung 29 - 31 im Anhang). Die entsprechenden GeneBank Referenznummern der Virus-RNA-Sequenzen wurden bereits beschrieben (Kapitel 2.1.1). Für die Transformation wurden jeweils 200 ng der Plasmide eingesetzt. Jeweils 25 µl des Transformationsansatzes wurde auf mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml, Roche diagnostics) versetzte Lennox LB-Platten (Carl Roth, Fertigmischung; 1,5 % Agar, AppliChem) als Selektivmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurde eine modifizierte Form der PCR, die Kolonie-PCR, durchgeführt. Hierbei dienen die transformierten Bakterien als Ausgangsmaterial. Mittels spezifischen PCR-Primern (siehe Tabelle 5), die das Insert innerhalb des Plasmids amplifizieren können, wird geprüft, ob die Transformation inklusive des gewünschten Inserts erfolgreich war (Bergkessel & Guthrie 2013). Für die PCR wurde der Luna[®] Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs[®] GmbH) eingesetzt. Eine Kolonie der transformierten *E. coli* wurde in 20 µl PCR-reinem Wasser (Nuklease- und Nukleinsäure-frei, DEPC behandelt, Carl Roth, H₂O_{DEPC}) resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2 µl mit 18 µl PCR-Mix (nach Herstellerangaben hergestellt, Protokoll⁶ online verfügbar) gemischt und eine PCR im Light Cycler 480 II (Roche diagnostics) durchgeführt. Das Temperaturprogramm der 2-stufigen PCR ist in Tabelle 3 angegeben. Weitere 5 µl der Suspension wurden auf einer mit Ampicillin versetzten Lennox LB-Platte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert, um eine Folgekultur der überprüften Transformante zu erhalten.

Tabelle 3: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Zellaufschluss		
95 °C	60 s	1 x
Amplifikation		
95 °C	10 s	45 x*
60 °C	30 s	
Kühlung		
40 °C	30 s	1 x

* Messung der Fluoreszenz

2.2.2 Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen

Die transformierten Bakterien wurden submers bei 37 °C und 200 RPM über Nacht in 25 ml Lennox LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (Protokoll⁷ online verfügbar). Das Prinzip der Qiagen DNA-Reinigung beruht dabei auf einer speziellen alkalischen Lyse der Bakterien kombiniert mit einem Ionen

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

⁶<https://international.neb.com/protocols/2016/11/08/luna-universal-qpcr-master-mix-protocol-m3003>

⁷<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0bd0c5fb-c271-43e7-af43-32d539374fa9&lang=en>

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 die gebundene DNA von Unreinheiten befreit und eluiert werden (Prazeres *et al.* 1998). Die Elution der DNA im letzten Schritt wurde mit 30 µl H₂O_{DEPC} durchgeführt. Eine anschließende Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 8000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.2.3 Sequenzierung der extrahierten Plasmide

Zur Prüfung der Vollständigkeit der inserierten DNA-Zielsequenz, 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 Didesoxynukleotiden amplifiziert. (Mülhardt 2009). Als Primer für die extrahierte Plasmid-DNA (2.2.2) wurde der Vorwärtsprimer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') und der Rückwärtsprimer M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab.

2.2.4 Restriktionsverdau zur Linearisierung des Plasmids

In Vorbereitung für eine *in vitro* Transkription zum Erstellen viraler RNA-Standards wurde die extrahierte Plasmid-DNA (2.2.2) linearisiert. Dafür wurden Restriktions-Endonukleasen benutzt, welche innerhalb ihrer spezifischen Erkennungssequenzen den DNA-Doppelstrang schneiden (Smith n.d.). Für das Influenza B Plasmid (Abbildung 29, 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), der 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 30 - 31 im Anhang) wurde das Enzym PshAI (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte mit einer Enzymkonzentration von 1,5 U/µl in 40 µl einfach konzentriertem Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 3 µg Plasmid-DNA 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, welche der Auftrennung von DNA-Fragmenten dient. 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. Plasmide laufen je nach Konformation bei gleichen Sequenzlängen unterschiedlich schnell. So zeigen ungeschnittene Plasmide eine stark verdrillte ("supercoil") Form, welche eine schwächere sterische Beeinträchtigung der Gittermatrix erfährt als die linearisierte Plasmid-DNA. Des Weiteren wandern durch einen Einzelstrangbruch entdrillte zirkuläre Plasmide ("nicked circular") langsamer durch die Gittermatrix. Somit lassen sie die unterschiedlichen Plasmidformen (linear, supercoil, nicked circular) im Gel unterscheiden (Schmidt *et al.* 1999; Ali 2012). Zur visuellen Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen Farbstoff markiert (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 GreenGel 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.

2.2.5 DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus

Zur Entfernung von Puffer- und Enzymbestandteilen des inaktivierten Restriktionsansatzes, wurde das DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. (Protokoll⁸ online verfügbar). Die Elution im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10 µl DNA Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,5; bereitgestellt im Kit). Anschließend wurde die Quantität und Reinheit der DNA mittels NanoDrop 8000 Spektrophotometer bestimmt.

2.2.6 *In vitro* Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards

Da RNA das genomische Material der Influenza Viren ist, wurden die DNA-Fragmente in RNA transkribiert. Für diesen Zweck wurde die T7 Promotor-Region vor der viralen Sequenz auf dem Plasmid verwendet (Plasmidkarten 29 - 31 im Anhang).

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribeTM T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) nach Herstellerangaben (Protokoll⁹ online verfügbar). Pro Reaktion wurde 1 µg linearisierte und gereinigte DNA aus Kapitel 2.2.4 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, da diese bei späteren Amplifikationen ebenfalls als Ausgangsmaterial verwendet werden würde und so die Messergebnisse verfälscht. Dazu wurde der Mix mit 70 µl H₂O_{DEPC} verdünnt und 10 µl 10X DNase-Puffer (New England Biolabs) dazugegeben. Die 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) nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll¹⁰ online verfügbar). Das Prinzip der RNA-Reinigungsmethode von BioEcho basiert dabei auf einer Matrix, welche durchlässig für Nukleinsäuren ist, jedoch andere Verunreinigungen bindet (BioEcho 2022).

2.2.7 RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA

Zur präzisen Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Quant-iT RiboGreen RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip basiert auf der Bindung eines gleichnamigen Fluoreszenzfarbstoffes an eine 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 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 ebenfalls mit 1X TE-Puffer auf eine innerhalb der Kalibriergerade liegende Konzentration verdünnt. Jede Messlösung der Kalibriergerade sowie die zu bestimmende RNA-Lösung wurde 1:1 mit einer Farblösung (RiboGreen 1:200 in 1X TE-Puffer) gemischt. Diese wurde homogenisiert, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend nochmal gemischt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 Fluoreszenzspektrometer bei 525 nm.

⁸https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf

⁹<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/standard-rna-synthesis-e2040>

¹⁰https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol_EchoCLEANRNACleanupcolumn_001_EN.pdf

2.3 Erstellung von RNA-Referenzproben mit humanem Nukleinsäure-Hintergrund

Zur Überprüfung, ob die Detektion von RNA mittels RT-RPA von einem humanen Probenhintergrund beeinflusst wird, wurden Referenzproben erstellt. Dazu wurden von gesunden Mitarbeitern nasopharyngeale Abstriche mithilfe der Mini UTM Kit 1 ml Swabs (360c, Copan) entnommen und die humane Gesamt-Nukleinsäure mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online¹¹ Verfügbar). Die Elution erfolgte in 60 µl AVE-Puffer (Bereitgestellt vom Kit). In die erhaltenen RNA-Extrakte wurde in einem 1:10 Verhältnis die entsprechende virale Standard-RNA zugegeben und die Referenzprobe homogenisiert.

2.4 Nukleinsäure Amplifikation

In diesem Kapitel werden die durchgeführten NAATs beschrieben. Darunter fallen die RT-qPCR, die RT-RPA sowie die verschiedenen Optimierungen der isothermen Amplifikations- bzw. Detektionssysteme des Influenza A und B Virus.

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

Die Amplifikation viraler Standard RNA mit der RT-qPCR Methode wurde mit dem Luna[®] Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 4) mit 1 µl des jeweiligen Virus-RNA-Standards versetzt. Für den in Tabelle 4 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurden je nach Detektionssystem die für Influenza A (siehe Tabelle 5) bzw. Influenza B (siehe Tabelle 6) angegebenen Primer und Sonden verwendet. Die verwendeten Primer und Sonden sind durch das Nationale Center für Immunisierung und Respiratorische Krankheiten (NCIRD) beschrieben (NCIRD 2021). Dabei sind jeweils die Oligonukleotid-Sequenz und die verwendeten Fluorophore und Quencher (siehe 2.1.1) dargestellt. Der finale 20 µl Reaktionsmix wurde nach dem in Tabelle 7 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler[®] 480 (Roche) gemessen. Für das Hexachlorofluorescein (HEX) Fluorophor wurde im HEX-Kanal (Extinktion: 523 nm, Emission: 586nm) gemessen. Die Erfassung des Cyanine 5 (Cy5) Fluorophors erfolgte im Cy5-Kanal (Extinktion: 615 nm, Emission 670 nm) Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes

Bestandteil	Endkonzentration	Volumen
2X Luna [®] Universal Probe One-Step Reaction Mix	1X	
20X Luna [®] WarmStart [®] RT Enzyme Mix	1X	
40X PSM	1X	
Virus RNA*		1 µl
H ₂ O _{DEPC}		x µl \sum 20 µl

* bei Wasserkontrollen wurde die Virus-RNA mit H₂O_{DEPC} substituiert

¹¹<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

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

Name	Sequenz (5'->3')	Endkonzentration	Modifikation
InfA For1	CAAGACCAATCYTGTACCTCTGAC*	16 μ M	/
InfA For2	CAAGACCAATYCTGTCACCTYTGAC*	16 μ M	/
InfA Rev1	GCATTYTGGACAAAVCGTCTACG*	16 μ M	/
InfA Rev2	GCATTTGGATAAAGCGTCTACG	16 μ M	/
InfA-P	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	8 μ M	Fluorophor: HEX; Quencher: BMN-Q535**

* Y=C oder T; V=A, C oder T ** Modifiziert wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

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

Name	Sequenz (5'->3')	Endkonzentration	Modifikation
InfB For	TCCTCAAYTCACTCTCGAGCG*	16 μ M	/
InfB Rev	CGGTGCTTTGACCAAATTGG	16 μ M	/
InfB-P	CCAATTGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	8 μ M	Fluorophor: Cy5, Quencher: BMN-Q620**

* Y=C oder T; V=A, C oder T ** Modifiziert wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

Tabelle 7: 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	
Kühlung		
40 °C	30 s	1x

* Messung der Fluoreszenz

2.4.2 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 μ l Ansatz

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels RT-RPA wurde das TwistAmp[®] exo Kit (TwistDX[™]) verwendet. Die für die RT-RPA verwendeten Oligonukleotide sind für Influenza B in Tabelle 8 und für Influenza A in Tabelle 9 angegeben. Pro Reaktion wurde 46,5 μ l Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 10) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzympellet zur Resuspension übertragen. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RT-RPA-Reaktion (46,5 μ l) wurde in eine Kavität eines 8-ter Streifens (Carl Roth) übertragen und kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 μ l zu amplifizierende Virus-RNA bzw. 1 μ l H₂O_{DEPC} (Wasserkontrolle ohne Ziel-RNA) 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 *Sau* DNA-Polymerase bereitzustellen (Kück 2005). Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im

ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38 - 42 °C. Für das Fluorophor FAM erfolgte die Anregung bei 470 nm und die Messung der Fluoreszenz bei 520 nm. Die Anregung des Fluorophors ATTO565 erfolgte bei 560 nm und die Messung der Fluoreszenz wurde bei 625 nm detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 (Qiagen) eingestellt. Je nach Versuch wurde die Messung für einen zusätzlichen Mischschritt unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

Tabelle 8: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA

Name	Sequenz (5'->3')	Modifikation
Mit PrimedRPA designte Primer (siehe 2.1.1)		
Sonde 3.1	GTTCCGTTGACAATAAAAAGGGATATGCG 12 A 3 TGTATTGTCCYTGAGAG	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 1.1	GCTAAACTTGTGCTACTGATGATCTACAG 12 G 3 AGGATGAAGAAGATGG	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAAGGCTT	/
forward 3	GGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGGGAA	/
forward 4	GAGACATGAACACAGAGATGCAAGGCAA	/
reverse 1.1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGAATTG	/
reverse 1.2	TGAATGTCCTTCATTAAGACGCTCGAAGAG	/
reverse 3.3	ATTGGGGTGTGTTGAGGAATGTTCCGTTAC	/
reverse 3.6	ATCCATTGGGGTGTGTTGAGGAATGTTCCGT	/
reverse 3.10	CTTGTATCCATTGGGGTGTGTTGAGGAATGT	/
reverse 3.15	AGTTGATAAGGACTTGTATCCATTGGGGTG	/
Sonde für die Primerasymmetrie-Untersuchung (siehe 2.4.7)		
antisense Sonde	CCATCTTCTTCATCCTCCACTGTAAGATCA 12 A 3 GTAGCAACAAGTTAGC	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**

* Y=C oder T; 1: Repoterfluorophor; 2: a-basische Seite; 3: Quencher ** Modifiziert wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

Tabelle 9: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA

Name	Sequenz (5'->3')	Modifikation
Mit PrimedRPA designte Primer (siehe 2.1.1)		
Sonde 1.2	GGCTCTCATGGAATGGTAAAGACAAGACCAAT 12 T 3 GTCACCTYTGACTA	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 3.1	GGRAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATG 12 A 3 TGGCTAAAGACAA	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Forward 1	CCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTKG	
Forward 2	CTTCTTACCGAGGTCGAAACGTATGTTCT	
Forward 3	GGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACT	
Reverse 1.1	GCACGGTGAGCGTGAAACACAAACCTAAAA	
Reverse 1.4	TGGGCACGGTGAGCGTGAAAACAAAMCCTA	
Reverse 1.8	AGCGTCTACGCTGCAGCCCTCGCTCACTGG	
Reverse 3.1	AAAATCCCTTAGTCAGAGGTGACARAATTGG	
Reverse 3.2	CCTAAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACAARAT	
Primer/Sonden modifiziert nach Ehnts (2013)		
Sonde E	TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAA 12 Y 3 TGTCACCTCTGACTAAGGG	Fluorophor: FAM/ Atto-565 Quencher: BMQ-535**
Forward E	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGY	
Forward E.2	RAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	
Forward E.3	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	
Reverse E	CGTCTACGCTGCAGTCCTCGCTCACTGGCA	

* Y=C oder T; 1: Repoterfluorophor; 2: a-basische Seite; 3: Quencher ** Modifiziert wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Rehydrationsmixes

Bestandteil	Endkonzentration	Volumen	Hersteller
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
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$		$\times \mu\text{l} \sum 46,5 \mu\text{l}$	

* bei Wasserkontrollen wurde die Virus-RNA mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ substituiert

2.4.3 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz

Wie bereits in Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* (2020) und Lillis *et al.* (2016) beschrieben, kann das Reaktionsvolumen der RPA deutlich verringert werden. Die Vorteile sind hier nicht nur eine Kosteneinsparung durch weniger Materialverbrauch, sondern auch die Möglichkeit, den Mischschritt während der Reaktion zu vernachlässigen (Lillis *et al.* 2016). Des Weiteren wird durch das geringere Volumen die RPA für mikrofluidische Anwendungen zugänglich (Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* 2020). Für den low-Volume Ansatz wurde die Standard RT-RPA-Reaktion mit 50 μ l Gesamtvolume ein neues Reaktionsvolumen von 6,5 μ l reduziert. Für 8 Reaktionen wurde dabei insgesamt 40,8 μ l Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 11) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzympellet zur Resuspension übertragen. Die Zusammensetzung des in Tabelle 11 aufgeführten 50X PSM's ist in Tabelle 12 gezeigt. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RT-RPA-Reaktion wurden auf einen 8-ter Streifen aufgeteilt (4,8 μ l pro Kavität) und dieser kurz zentrifugiert. Jeweils pro Kavität wurde 1 μ l zu amplifizierende Virus-RNA bzw. 1 μ l $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ (Wasserkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben. Darauffolgend wurden 15 μ l Mineralöl (Carl Roth) in den Gefäß-Deckel pipettiert, zur Verhinderung einer möglichen Evaporation des Reaktionsmixes während der Messung. Als Letztes wurden je 0,64 μ l Magnesium Acetat (140mM) an die Innenseite der Kavität pipettiert. Zum Start der Messung wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert und homogenisiert, um das Magnesium in den Reaktionsmix einzubringen und ihn mit Mineralöl zu Überschichten. Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38 - 42 °C. Für das FAM-Fluorophor erfolgte die Anregung bei 470 nm und die Messung der Fluoreszenz bei 520 nm. Die Anregung des Fluorophors ATTO565 erfolgte bei 560 nm und die Messung der Fluoreszenz wurde bei 625 nm detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 (Qiagen) eingestellt. Je nach Versuch wurde die Messung für einen zusätzlichen Mischschritt unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

Tabelle 11: Zusammenstellung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Endkonzentration	Volumen	Hersteller
50X PSM	1,35X	/	
RNase Inhibitor, Murine	1,37 U/ μ l		Thermo Fisher Scientific
RevertAid Reverse Transkriptase	13,73 U/ μ l		New England Biolabs
Rehydrations Puffer		29,5 μ l	TwistDX
H_2O_{DEPC}		$x \mu$ l $\sum 40,8 \mu$ l	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 12: Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den low-Volume Ansatz

Bestandteil	Endkonzentration	Hersteller
Vorwärtsprimer	21 μ M	Biomers
Rückwärtsprimer	21 μ M	Biomers
Sonde	6 μ M	Biomers

2.4.4 Primer- und Sondenauswahl für die RT-RPA

Für die Entwicklung der RT-RPA wurden die in Kapitel 2.1.1 designten Sonden mit ihren jeweiligen forward und reverse Primern auf eine positive Amplifikation getestet. Dabei wurden Anstiegszeit, maximale Fluoreszenzauslenkung und Ausprägung des Anstiegs als Kriterien für die Auswahl festgelegt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Wasserkontrollen keine Amplifikation aufweisen. Die RT-RPA für die Primer- und Sondenauswahl erfolgte im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) bei 40 °C. Als Template-RNA wurden bei Influenza B 10^6 Kopien/ μ l und bei Influenza A 10^7 Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp) des RNA-Standards eingesetzt.

2.4.5 Adaption des Reaktionsvolumens der RT-RPA

Die Reduzierung des Reaktionsvolumens der RPA bringt einige Vorteile mit sich (Kapitel 2.4.3). Um eine Adaption des Low-Volume Ansatzes der ausgewählten Primer-Sonden-Kombination für Einsatz als Lab-on-a-chip Applikation im Kofferlabor zu prüfen, wurde ein Vergleich der beiden Reaktionsvolumina (50 μ l Ansatz (Kapitel 2.4.2) und low-Volume Ansatz (Kapitel 2.4.3)) durchgeführt. Die Influenza B RT-RPA wurde bei 40 °C, ohne zusätzlichen Mischschritt und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^6 Molekülen/ μ l gemessen. Die Influenza A RT-RPA wurde bei 42 °C, ohne zusätzlichen Mischschritt und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^8 Kopien/ μ l (H1N1-Subtyp) durchgeführt.

2.4.6 Optimierung der Reaktionstemperatur für die RT-RPA

Die klassische RPA ist für einen Temperaturbereich von 37 - 42 °C ausgelegt (TwistDx 2018), wobei verschiedene RPA-Systeme unterschiedliche Temperaturoptima aufweisen (Li *et al.* 2019). Dementsprechend wurden die Temperaturoptima der ausgewählten Primer-Sonden-Kombination untersucht. Die Optimierung erfolgte im Temperaturintervall zwischen 38 - 42 °C. Es wurden je die Temperaturen 38 °C, 40 °C, 42 °C für die RT-RPA getestet. Für Influenza B erfolgte die Temperaturoptimierung im low-volume Ansatz (siehe Kapitel 2.4.3), mit einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^6 Kopien/ μ l. Das Temperaturoptimum bei Influenza A wurde im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) bei einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp) bestimmt.

2.4.7 Testung asymmetrische Primerkonzentrationen zur Optimierung der RT-RPA

Die Primerasymmetrie, sprich die ungleiche Verteilung der benötigten Primer ist für die PCR bereits in der Literatur bekannt. Die ungleichmäßige Verteilung der Primer führt in der dazu, dass spezifisch der sense- oder antisense-Strang öfter amplifiziert wird und somit einzelsträngige DNA entsteht (Chen *et al.* 2010). Der asymmetrische Ansatz konnte von Kersting *et al.* (2014) und Wang *et al.* (2019) auf die RPA angewendet werden, um über die entstandene einzelsträngige DNA einen Nachweis mittels Microarray bzw. über einen enzymkatalysierten Farbumschlag durchzuführen (Kersting *et al.* 2014; Wang *et al.* 2019). Innerhalb der qPCR konnte gezeigt werden, dass die entstehende einzelsträngige DNA zu einer erhöhten Hybridisierungskinetik von “*molecular beacon*”-Sonden führt und somit ein erhöhtes Fluoreszenz-Signal zur Folge hat (Poddar 2000).

**Einführung der Primerasymmetrie in die RT-RPA: **

Um das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RT-RPA zu adaptieren wurde eine Primerasymmetrie auf die Influenza B RT-RPA angewendet. Es wurde eine 2X reverse Primerasymmetrie (0,9 μ M) eingeführt um den zur verwendeten Exo-Sonde komplementären sense-Strang asymmetrisch zu vervielfältigen. Die Messung erfolgte im low-volume Ansatz (Kapitel 2.4.3) bei 40 °C mit einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l. Als Referenz wurde eine RT-RPA ohne Primerasymmetrie mitgeführt. Als Kontrolle wurde die forward Primer-Konzentration auf 0,9 μ M angeglichen und so ein aequimolares Primerverhältnis hergestellt. Die Messung erfolgte bei den gleichen Reaktionsparametern.

Einfluss der Hybridisierungs-position der Sonde:

Laut dem von Poddar (2000) beschriebenen Prinzip, hängt die Fluoreszenzerhöhung mit einer erhöhte Hybridisierungskinetik der Sonde an die, durch die Primerasymmetrie vorliegende einzelsträngige DNA zusammen. Dadurch würde in der RT-RPA eine häufigere Spaltung der Sonde (d.h. ein höheres Fluoreszenzsignal) entstehen. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde eine neue Sonde (antisense Sonde), welche an gleicher Position auf an dem entgegengesetzten (antisense) Strang hybridisiert, eingeführt (Tabelle 8, Abbildung 10). Mit dieser Sonde wurden jeweils Influenza B RT-RPA's mit einer asymmetrisch erhöhten Forward oder Reverse Primer-Konzentration (0,9 μ M) sowie eine Messung mit normalen Primer-Konzentrationen als Referenz durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 40 °C im low-volume Ansatz (siehe Kapitel 2.4.3) mit einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l.

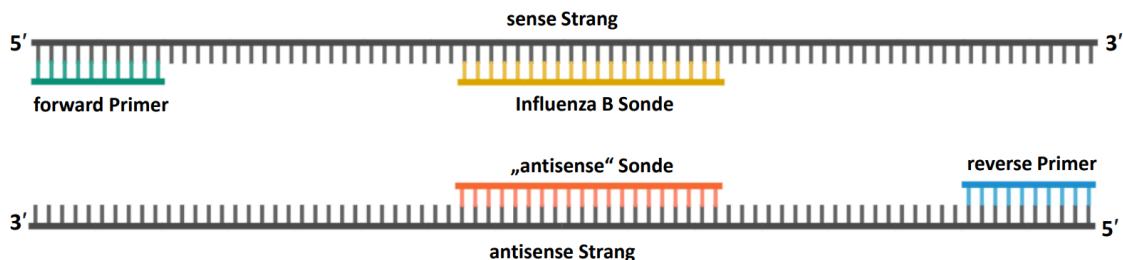


Abbildung 10: **schematische Darstellung der innerhalb der Asymmetrie verwendeten Sonden** Die antisense Sonde hybridisiert auf dem antisense Strang an gleicher Position wie die verwendete Influenza B Sonde.

Optimierung der Primerasymmetrie:

Für die Optimierung der Primerasymmetrie wurden sowohl für Influenza B als auch Influenza A die verschie-

denen Reverse Primer-Konzentrationen 1X, 1,5X und 2X untersucht. Die Messung für Influenza A erfolgte im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) bei 42 °C mit einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp). Es wurde für die jeweiligen Messungen die reverse Primer-Konzentration im hergestellten Reaktionsmix von 0,45 μ M auf 0,675 μ M und 0,9 μ M erhöht. Alle anderen Konzentrationen blieben unverändert. Bei Influenza B erfolgte die Messung im low-volume Ansatz (siehe Kapitel 2.4.3) bei 40 °C und einer RNA-Konzentration von 10^6 Kopien/ μ l. Hierbei wurden die reverse Primer-Konzentrationen im Primer-Sonden-Mix von 21 μ M auf 31,5 μ M und 42 μ M angepasst.

2.4.8 Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Einführung und Optimierung eines zusätzlichen Mischzeitpunktes während der Reaktion ist notwendig, um entstehende lokale Reagenzienknappheit durch eine erneute Homogenisierung der Reaktionslösung auszugleichen (Kapitel 1.4.5). Der zusätzliche Mischschritt ist vor allem bei niedrigen RNA-Konzentration ausschlaggebend, da hier die lokale Reagenzienknappheit den größten Einfluss hat (Lillis *et al.* 2016). Die Untersuchung verschiedener Mischzeitpunkte in der RT-RPA erfolgte bei Influenza B im low-volume Ansatz (siehe Kapitel 2.4.3) bei 40 °C. Der Zeitpunkt des Mischens nach 5 min, 4 min und 3 min nach Messbeginn wurde bei einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l und einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration getestet. Zusätzlich wurde der Mischzeitpunkt von 5 Minuten bei geringeren RNA-Konzentrationen von 10^2 , 10^1 und 10^0 RNA-Kopien/ μ l untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzlichen Mischschritt mitgeführt.

Für Influenza A erfolgte die Optimierung des Mischzeitpunktes im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) bei 42 °C und einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration. Als Mischzeitpunkte wurden 7 min, 5 min, 3 min, 2 min, bzw. 1,5 min nach Messbeginn bei einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp) untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzlichen Mischschritt mitgeführt.

2.4.9 Ermittlung der analytischen Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA

Die analytische Sensitivität gibt Auskunft über die geringste detektierbare Molekülanzahl und gibt Zusammen mit der Spezifität die Grenzen des entwickelten Systems an (Saah 1997). Des Weiteren erlaubt sie einen Vergleich mit anderen Detektionssystemen um so gezielte Aussagen treffen zu können. Es wurden die analytischen Sensitivitäten der entwickelten RT-RPAs sowie der RT-PCRs für die Influenza A und B Viren, jeweils unter optimalen Reaktionsparametern ermittelt und verglichen. Die Ermittlung der analytischen 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 2.1.3 beschriebenen Methode ausgewertet. Das Detektionslimit wurde mit der in Kapitel 2.1.5 beschriebenen Probit-Analyse berechnet.

Alle RT-PCR's wurden dabei nach der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Influenza B RT-RPA wurde jeweils im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) und im low-volume Ansatz (siehe Kapitel 2.4.3) bei 40 °C, einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min gemessen.

Bei der Influenza A RT-RPA wurde die analytischen Sensitivität für den H1N1-Subtyp und den H3N2-Subtyp im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) bei 42 °C, einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min ermittelt. Zusätzlich wurde die Sensitivität der RT-RPA Systeme mit Referenzproben (Kapitel 2.3) ermittelt, um den Einsatz von Patientenproben zu simulieren und eine eventuelle Veränderung der Sensitivität in einem humanen Nukleinsäure-Probenhintergrund ("background") zu untersuchen. Dafür wurden die Konzentrationen von $2 * 10^5$ RNA-Kopien/ μ l bis $2 * 10^0$ RNA-Kopien/ μ l

in dekadischen Verdünnungsstufen mit den gleichen Reaktionsparametern durchgeführt. Die Amplifikationen wurden anschließend mit der in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Methode ausgewertet. Das Detektionslimit wurde mit der in Kapitel 2.1.5 beschriebenen Probit-Analyse berechnet.

2.4.10 Untersuchung des Einflusses der Sondenmodifikation auf die RT-RPA

Die verwendeten Sonden lassen sich als *iQ*-Sonden oder *dT-quenched*-Sonden modifizieren (Kapitel 2.1.2). Damit untersucht werden kann, ob die unterschiedlichen Sondenmodifikationen einen Einfluss auf die RT-RPA ausüben, wurde die Amplifikation beider Sonden innerhalb der Influenza A RT-RPA untersucht. Die RT-RPA erfolgte bei 42 °C mit einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10³ Kopien/µl (H1N1-Subtyp). Zusätzlich wurde die Sensitivität nach Kapitel 2.4.9 mit der *dT-quenched*-Sonde für beide Influenza Subtypen (H1N1, H3N2) ermittelt.

2.4.11 Ermittlung der Spezifität der RT-RPA

Die Spezifität ist ein wichtiger Faktor in der Diagnostik, da eine geringe Spezifität zu falsch positiven Ergebnissen führt und so falsche Behandlungsansätze gewählt werden (Saah 1997). Zur Überprüfung der Spezifität wurde folgendes Virus-Material mittels RT-RPA in einer Doppelbestimmung auf eine Amplifikation getestet: Influenza B Virus (Yamagata-, Victoria-Linie), Influenza A (H1N1, H3N2, H7N5) Rhinovirus B, Rhinovirus C, Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus (hRSV) Typ A, Humanes Metapneumovirus (HPV) Typ A1 und Andenovirus Typ 34. Bei jeder durchgeführten Messung wurde eine Wasserkontrolle und eine Positivkontrolle (1 µl 10⁷ RNA-Kopien/µl) mitgeführt. Die jeweiligen Viren wurden aus Zellkultur-Überständen mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online¹² verfügbar). Die Elution erfolgte in 60 µl AVE-Puffer (Bereitgestellt vom Kit). Von den erhaltenen Extrakten wurde je 1 µl in die entsprechende RT-RPA eingesetzt. Die Spezifitätstestung für die Influenza B RT-RPA erfolgte im low-volume Ansatz (siehe Kapitel 2.4.3) bei 40 °C, einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min. Die Testung der Spezifität für die Influenza A RT-RPA erfolgte im 50 µl Ansatz (siehe Kapitel 2.4.2) bei 42 °C, einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min.

¹²<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

3 Ergebnisse

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

3.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza B RT-RPA

3.1.1 Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der Influenza B Virus Standard-RNA

Standardisierte Virus-RNA wurde für die Vergleichbarkeit zwischen der RT-PCR und der RT-RPA sowie der variierenden Parameter in einer definierten Konzentration hergestellt (Kapitel 2.2.1 - 2.2.7). Das artifizielle DNA-Plasmid mit der inserierten Influenza B-Sequenz wurde mittels Sanger-Sequenzierung überprüft (Kapitel 2.2.3, Daten nicht gezeigt). Dadurch konnten Sequenzfehler ausgeschlossen werden **und die Integrität der Virus-Sequenz bestätigt werden**. Für die *in vitro* Transkription wurde das Plasmid weiterhin durch einen Restriktionsverdau linearisiert und die Linearisierung in einem Agarose-Gel überprüft (Kapitel 2.2.4, Abbildung 11A). Das linearisierte Plasmid (Spur 2) zeigt eine Bande bei ≈ 3400 bp, was mit der Plasmidgröße von 3407 bp übereinstimmt (siehe Plasmidkarte 29 im Anhang). Das unverdaute Kontrollplasmid (Spur 3) weist eine Bande von mehr als 4000 bp auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Linearisierung durch den Restriktionsverdau erfolgreich war. Das linearisierte Plasmid wurde mithilfe des T7-Promotors auf dem Plasmid *in vitro* transkribiert und gereinigt (Kapitel 2.2.6). Die so synthetisierte virale RNA wurde mit dem RiboGreen Assay (Kapitel 2.2.7) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in 11B dargestellt. Es ergab sich eine Geradengleichung der Kalibriergerade von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99. Der berechnete p-Wert ist «0,05 was einen signifikant linearen Zusammenhang aussagt. Mithilfe der Gradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von $476.0 \pm 7,8$ ng/ml ermittelt und somit die Menge der synthetisierten Kopien auf $2,2 \times 10^8$ RNA-Kopien/ μ l bestimmt werden.

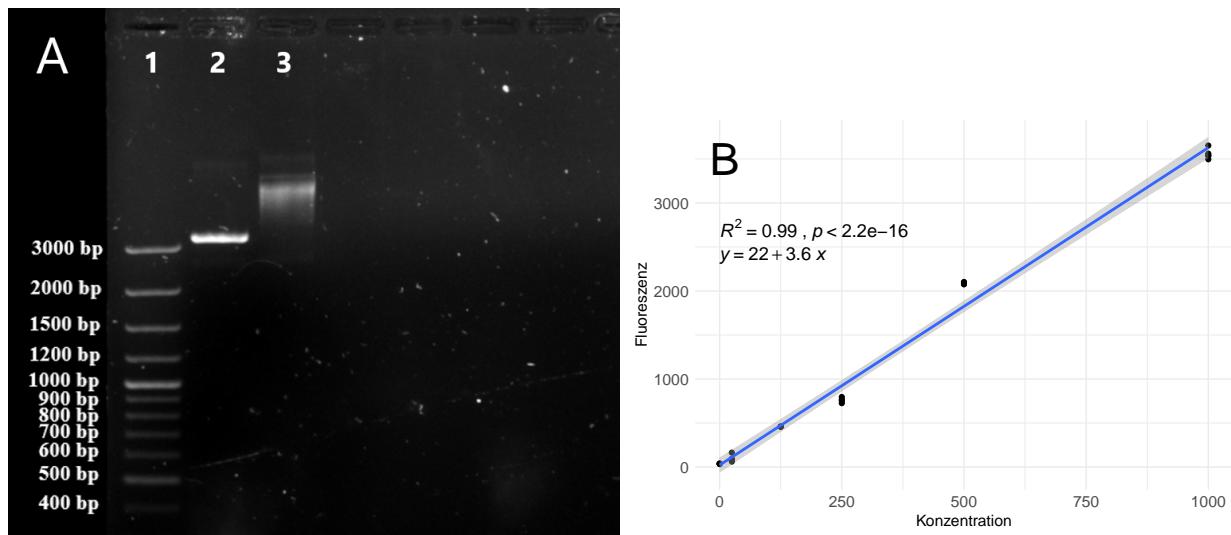


Abbildung 11: **Kontrollgel und RiboGreen Kalibrationsgerade des Influenza B Standards:**
A: DNA-Banden des Kontrollgels für die Linearisierung des Influenza B Plasmids mit verdautem Plasmid (2), unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeföhrter DNA-Leiter (1). Bild ist digital bearbeitet.
B: Kalibrationsgerade 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.

3.1.2 Untersuchung der Influenza B RT-RPA Primer und Sonden

Für die Pan-Influenza B RT-RPA wurden mithilfe der Software PrimedRPA insgesamt 9 verschiedene Primer und 2 Sonden ausgesucht (Kapitel 2.1.1, Tabelle 8). Aus den angegebenen Oligonukleotiden ergeben sich insgesamt 10 Primer-Sonden-Kombinationen. Davon bestehen 2 Kombinationen aus Sonde 1.1 mit Forward 1 und Reverse 1.1 und Reverse 1.2. Die anderen 8 Kombinationen setzen sich aus Sonde 3.1, Forward 3 bzw. Forward 4 und Reverse 3.3 - 3.15 zusammen.

Zur Bestimmung einer geeigneten Primer-Sonden-Kombination wurden die 10 ausgewählten Kombinationen mittels des Standard-Protokolls der RT-RPA getestet (Kapitel 2.4.4). Die Fluoreszenzdaten dazu sind in Abbildung 12 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 3.1 (grau) zeigen streuende Anstiegszeiten zwischen 3,3 min - 7,4 min und eine durchschnittliche Fluoreszenzauslenkung von rund 450 Einheiten. Die zwei Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich hingegen durch einen steileren Anstieg und höhere Fluoreszenzwerte von 900 bis über 1000 Einheiten im Vergleich zu den Kombinationen mit Sonde 3.1 aus. Bei der Kombination mit Reverse 1.1 (schwarz, durchgezogen) ist dabei ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei der Kombination mit Reverse 1.2 (schwarz, gestrichelt) beobachtet. Die Mittelwerte der TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle 17, Anhang) für die jeweiligen Kombinationen liegen bei $3,33 \pm 0,07$ min (Reverse 1.1) und $4,27 \pm 0,07$ min (Reverse 1.2) und zeigen eine geringe Streuung um den Mittelwert. Alle Wasserkontrollen zeigen keine merkliche Fluoreszenzauslenkung und dementsprechend keine unspezifische Amplifikation. Durch die höhere Fluoreszenzauslenkung bei den Kombinationen mit Sonde 1.1 wurden diese den Kombinationen mit Sonde 3.1 vorgezogen. Dabei erreicht die Kombination mit Reverse 1.2, Forward 1 und Sonde 1.1 im Verlauf der Messung eine höhere Fluoreszenzauslenkung, besitzt jedoch signifikant höhere Anstiegszeiten. Da ein zeitigerer Anstieg (d.h. niedrigere TT-Werte) auf eine schnellere Amplifikation deutet, wurde die Kombination mit Reverse 1.1, Forward 1 und Sonde 1.1 (schwarz, durchgezogen) ausgewählt und für die weiteren Influenza B RT-RPAs verwendet.

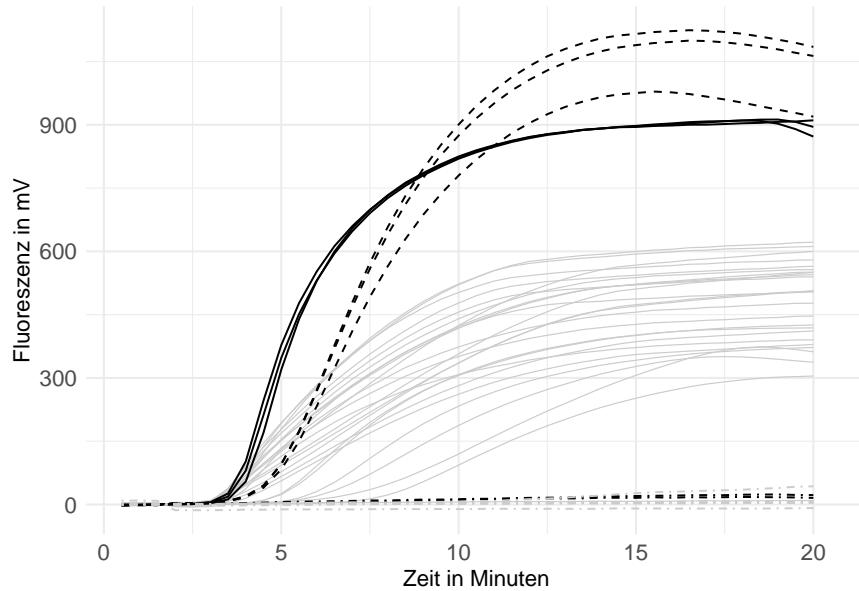


Abbildung 12: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 8 angegeben Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 1.2, Foward 1 und Reverse 1.2 ist in **schwarz** (---) und die Kombination mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.1 in **schwarz** (—) dargestellt. Alle Negativkontrollen sind mit (·—·) gekennzeichnet.

3.1.3 Verringerung des Reaktionsvolumen (low-volume Ansatz) der Influenza B RT-RPA

Wie bereits beschrieben, kann die Reduktion des Reaktionsvolumen zu einer Unabhängigkeit des Mischschrittes und einer erhöhten Sensitivität führen (Lillis *et al.* 2016). Neben der Kostenersparnis kann das geringe Volumen in mikrofluidische Applikationen eingebracht werden und somit für Lab-on-a-chip Applikationen innerhalb der POCT eingesetzt werden (Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* 2020). Zur Prüfung, ob die in Kapitel 3.1.2 ausgewählte Primer-Sonden-Kombination für die POCT auf den low-volume Ansatz adaptiert werden kann, wurde eine Reduzierung des Reaktionsvolumens untersucht (Kapitel 2.4.5). In Abbildung 13 ist der Vergleich der klassischen RPA (50 μ l) zum low-Volume Ansatz (6,5 μ l) bei einer Kopienzahl von 10^7 RNA-Kopien/ μ l dargestellt. Der low-volume Ansatz (schwarz) zeigt im Vergleich zur Standard RT-RPA (grau) eine geringere Auslenkung der Fluoreszenz. Jedoch konnte keine signifikante Veränderung der TT-Werte zwischen den beiden Reaktionsvolumen festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle 18, Anhang) liegen bei $3,36 \pm 0,01$ min (50 μ l RT-RPA) und $3,47 \pm 0,14$ min (low-volume RT-RPA). Trotz der verringerten Fluoreszenzintensität wurde der low-volume Ansatz in den folgenden Experimenten verwendet, da dieser für spätere geplante Lab-on-a-chip Applikationen besser geeignet ist und die Kostenreduzierung für Ressourcen limitierte Umgebungen vorteilhaft ist.

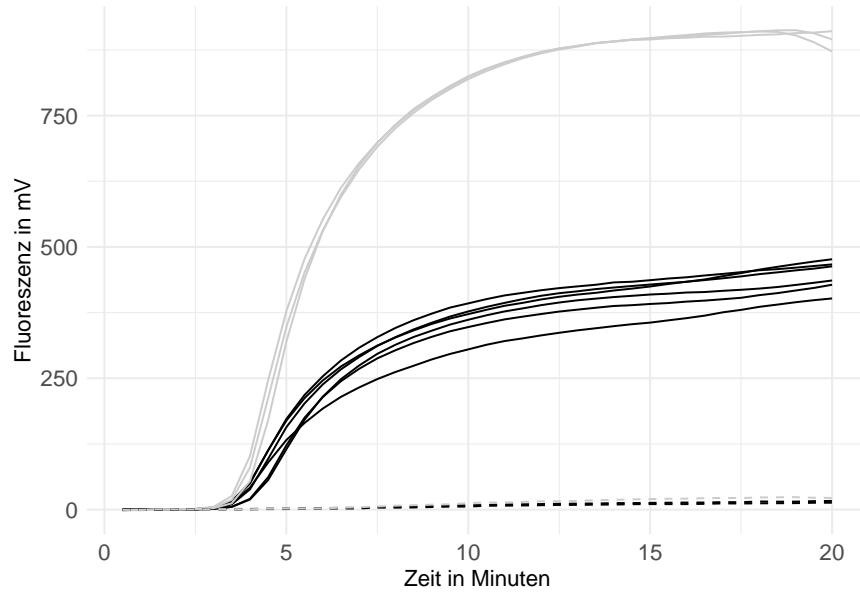


Abbildung 13: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA bei 40 °C im low-volume Ansatz (schwarz n=6) sowie im 50 μ l Ansatz (grau, n=3) sind dargestellt. Als Virus-RNA wurden 10^7 RNA-Kopien eingesetzt. Alle Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

3.1.4 Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza B RT-RPA

Das Temperaturoptimum der RPA kann je nach System und Nachweisziel variieren (Li *et al.* 2019). Zur Optimierung der Reaktionstemperatur für die Influenza B RT-RPA wurden Reaktionstemperaturen zwischen 38 - 42 °C im low-volume Ansatz untersucht (Kapitel 2.4.6). Die Fluoreszenzdaten dazu sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Influenza B RT-RPA zeigt bei 38 °C (blau) einen signifikant späteren Anstieg im Vergleich zu den Reaktionen bei 40 °C (gelb) und 42 °C (orange). Die Mittelwerte der TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle 19, Anhang) für die jeweiligen Temperaturen liegen bei $5,26 \pm 0,06$ min (38 °C), $3,57 \pm 0,20$ min (40 °C) und $3,63 \pm 0,13$ min (42 °C). Zwischen den Amplifikationskurven von 40 °C und 42 °C konnten keine signifikanten Unterschiede der TT-Werte ermittelt werden. Bei der 40 °C Amplifikationskurve kann im Durchschnitt eine höhere maximale Fluoreszenzauslenkung beobachtet werden. Die Reaktionen bei 38 °C und 42 °C weisen hingegen niedrigere, jedoch ähnlich hohe Fluoreszenzauslenkungen auf. Bei den 42 °C Messdaten ist eine Abnahme der Fluoreszenz im späteren Verlauf der Amplifikation (ca. 13 min) zu beobachten. Auch bei der Reaktionstemperatur von 40 °C kann bei 4 von 7 Reaktionen diese Fluoreszenzabnahme beobachtet werden, welche jedoch später (bei ca. 16 min) einsetzt. Diese Fluoreszenzabnahme im späteren Verlauf der Messung wird in dieser Arbeit als Ditching bezeichnet. Aufgrund der höchsten Fluoreszenzauslenkung wurde die Reaktionstemperatur bei 40 °C als optimal festgelegt und für die weiteren Influenza B RT-RPAs verwendet.

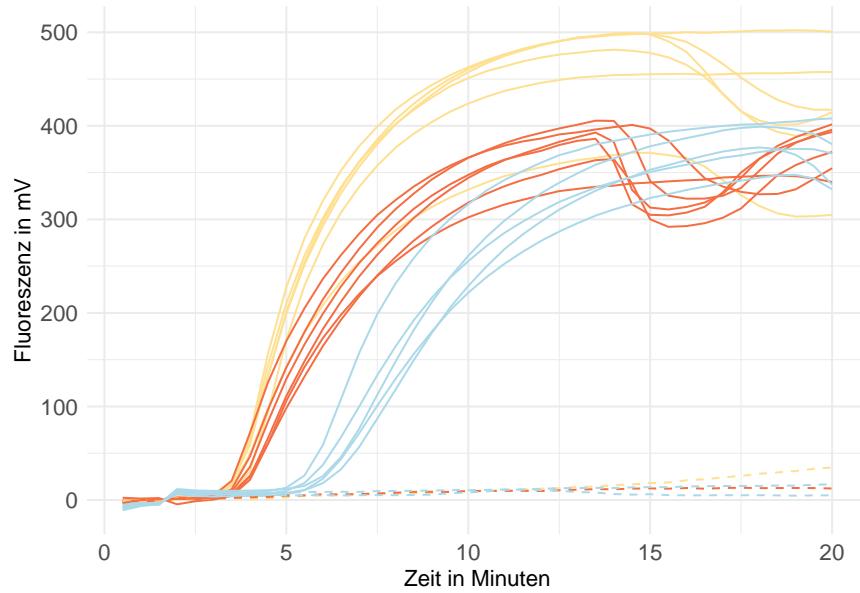


Abbildung 14: **Optimierung der Reaktionstemperatur für die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im low-volume Ansatz bei 42 °C (orange), 40 °C (gelb) und 38 °C (blau), je n=6. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

3.1.5 Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA

Wie von Kersting *et al.* (2014) und Wang *et al.* (2019) gezeigt wurde, kann die Primerasymmetrie auf die RPA übertragen werden (Kersting *et al.* 2014; Wang *et al.* 2019). Poddar (2000) konnte zeigen, dass innerhalb der qPCR die Primerasymmetrie zu einer erhöhten Sondenhybridisierung und somit zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führt (Poddar 2000). Ziel war es den Nachweis mittels Exo-Sonden in der low-volume RPA mit der Primerasymmetrie zu kombinieren und so ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Dazu wurde eine reverse Primer-asymmetrie (reverse Primer 2X-Konzentriert) eingeführt um den zur Sonde komplementäre sense Strang vermehrt zu Amplifizieren. Die Messung zusammen mit der Referenz (normale Primerkonzentration) und einer Kontrolle (aequimolare 2X Primer-Konzentration) ist in Abbildung 15A gezeigt. Durch die Einführung der reverse Primer-Asymmetrie (orange) lässt sich eine Erhöhung der Fluoreszenzauslenkung um rund 200 Einheiten im Vergleich zur Referenz (gelb, Standard Primer-Konzentration) beobachten. Die Angleichung der Asymmetrie durch die Erhöhung des Forward Primers (blau) innerhalb der Kontrolle zeigt eine ähnliche Fluoreszenzauslenkung wie die Referenz. Dementsprechend weist eine generell Erhöhte Primerkonzentration keine Unterschiede in der Fluoreszenzauslenkung zur Referenz auf. Zwischen den untersuchten Primerkonzentrationen konnte keine signifikanten Unterschiede der TT-Werte festgestellt werden (statistische Auswertung, Tabelle 28, Anhang). Die mittleren TT-Werte der einzelnen Primer-Konzentrationen liegen jeweils bei $3,40 \pm 0,14$ min (2X reverse Primer), $3,48 \pm 0,21$ min (Kontrolle, 2X Primer-Konzentration) und $3,39 \pm 0,07$ (Referenz). Die markierte Amplifikationskurve (roter Pfeil) konnte als Ausreißer identifiziert werden und wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Eine Vermutung war, dass die Hybridisierung der Sonde an den sense oder antisense Strang der zu amplifizierenden DNA in Verbindung mit der Primer-Asymmetrie und der daraus resultierenden erhöhten Fluoreszenzintensität steht. Um dies zu überprüfen wurde eine erneute Messreihe mit einer am entgegengesetzten (antisense) Strang hybridisierenden Sonde durchgeführt (Kapitel 3.1.5). Die Fluoreszenzdaten der Messungen sind

in Abbildung 15B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass hier die erhöhte reverse Primer-Konzentration (orange) die niedrigste Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (blau) und der erhöhten forward Primer-Konzentration (gelb) zeigt. Die asymmetrisch erhöhte forward Primer-Konzentration zeigt hingegen die höchsten Fluoreszenzwerte und dementsprechend die beste Signalgenerierung. Des Weiteren besitzt die erhöhte Forward Primer-Konzentration signifikant niedrigere TT-Werte (statistische Auswertung, Tabelle 29, Anhang) mit $3,25 \pm 0,05$ min als die Referenz ($3,63 \pm 0,19$ min) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration ($3,76 \pm 0,34$). Im Vergleich zum vorherigen Experiment (Abbildung 15A) wird durch die neue, am antisense Strang hybridisierende, Sonde die zur Fluoreszenzerhöhung führende Primerasymmetrie umgekehrt. Somit sorgt eine erhöhte forward Primer-Konzentration zusammen mit der antisense Sonde für stärkere Fluoreszenzsignale, während die "sense" Sonde (Sonde 1.1) zusammen mit einer erhöhten reverse Primer-Konzentration zu einer höheren Fluoreszenz führt.

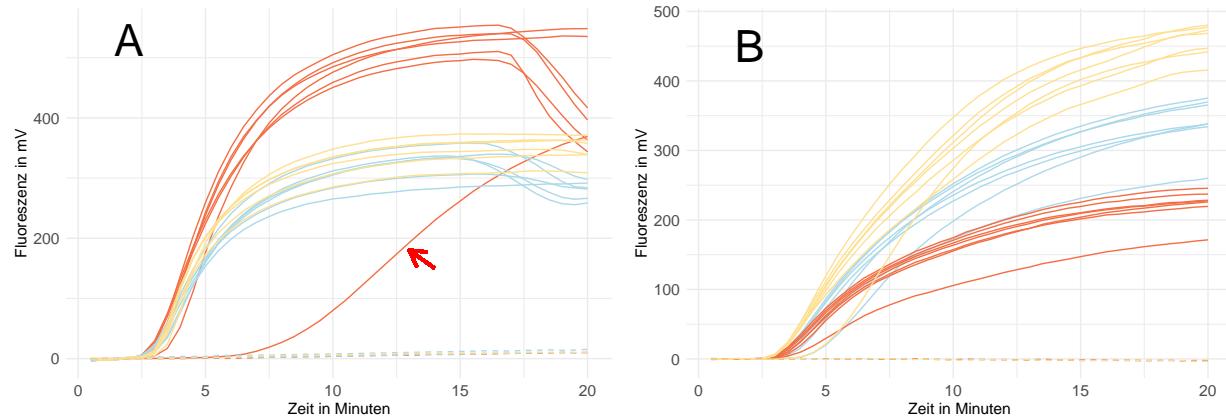


Abbildung 15: **Einfluss der Primerasymmetrie auf der RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA.

A: Einfluss einer generellen Primer-Konzentrationserhöhung auf die Influenza B RT-RPA. Die doppelte Primer-Konzentration (42 μ M im PSM, siehe 2.4.3) ist in blau dargestellt, während die asymmetrische Erhöhung des reverse Primers (42 μ M im PSM) in orange gezeigt ist. Die mitgeführte Referenz (jeweils 21 μ M im PSM) ist in gelb dargestellt. Alle Messungen wurden in mindestens $n=6$ durchgeführt. Über den TT-Wert konnte die markierte Amplifikation (roter Pfeil) als Ausreißer identifiziert werden. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

B: Messung der Influenza B RT-RPA bei asymmetrisch erhöhter Reverse (orange) und forward (gelb) Primer-Konzentration (jeweils 42 μ M im PSM) mit der in 3.1.5 angegebenen Sonde. Als Referenz (blau) wurde eine RT-RPA mit normaler Primer-Konzentration mitgeführt. Alle Messungen wurden in $n=7$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

3.1.6 Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA

Wie in Kapitel 3.1.5 gezeigt wurde, kann die Primerasymmetrie auf die low-volume RT-RPA angewandt werden, wo sie zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal führt. Zur Bestimmung des optimalen Asymmetrieverhältnis wurde eine Versuchsreihe mit einer angepassten Reverse Primer-Konzentration von 0,45 μ M, 0,675 μ M und 0,9 μ M (entspricht 1X, 1,5X und 2X erhöhte Konzentration) im low-volume Ansatz bei 40 °C und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l durchgeführt (Kapitel 3.1.5). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 16 dargestellt. Wie zu erwarten, zeigt die asymmetrische Erhöhung der Primer-Konzentration (orange, blau) eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur unveränderten reverse Primer-Konzentration (gelb). Eine signifikante Veränderung (statistische Auswertung, Tabelle 20, Anhang)

der TT-Werte konnte nicht ermittelt werden. Die mittleren TT-Werte der einzelnen Parameter liegen bei $3,39 \pm 0,07$ min ($0,45 \mu\text{M}$), $3,43 \pm 0,07$ min ($0,625 \mu\text{M}$) und $3,63 \pm 0,13$ min ($0,9 \mu\text{M}$). Die markierte Amplifikation (roten Pfeil) wurde mittels TT-Wert als Ausreißer identifiziert und ist nicht berücksichtigt. Der im vorherigen Abschnitt (Kapitel 3.1.4) schon beobachtete „Ditching“-Effekt konnte bei der $0,9 \mu\text{M}$ Primer-Konzentration (orange) nach etwa 12 min bei 4/6 Reaktionen beobachtet werden. Um mögliche Messartefakte zu vermeiden, wurde mit einer $0,675 \mu\text{M}$ Primerkonzentration (1,5X der Standardkonzentration, blau) weitergearbeitet und diese als optimal festgelegt.

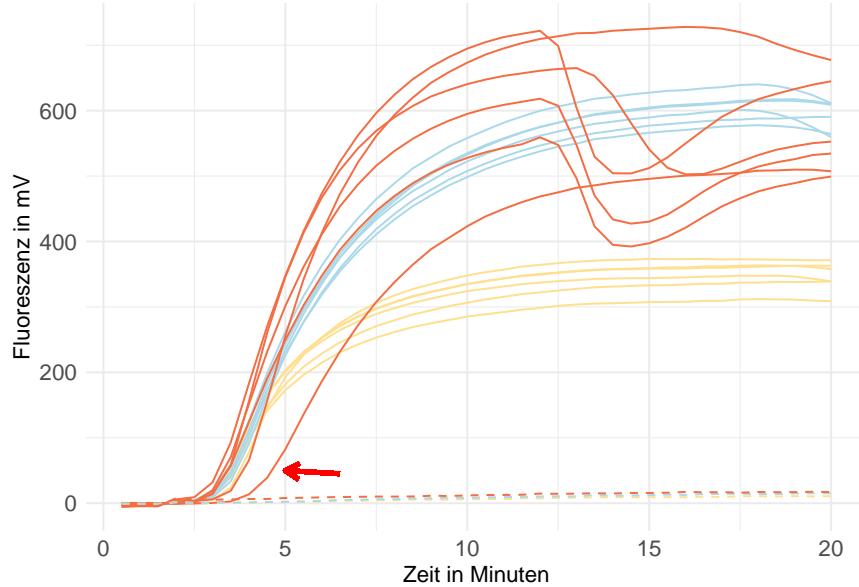


Abbildung 16: **Optimierung der Primerasymmetrie der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im low-volume Ansatz bei einer reverse Primer-Konzentration von $0,45 \mu\text{M}$ (gelb), $0,625 \mu\text{M}$ (blau) und $0,9 \mu\text{M}$ (orange). Messung in $n=6$ pro Primer-Konzentration. Ausreißer sind mit einem roten Pfeil markiert. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

3.1.7 Optimierung der Mischzeit der Influenza B RT-RPA

Wie in 1.4.5 beschrieben kann ein zusätzlicher Mischschritt während der Reaktion zu einer erhöhten Amplifikation und somit zu einer besseren Detektion führen. Um im asymmetrischen, low-volume Ansatz (6,5pl) den zusätzlichen Mischschritt für die Influenza B RT-RPA als Einflussfaktor zu identifizieren wurden einerseits verschiedene Mischzeitpunkte nach 5 min, 4 min und 3 min und andererseits unterschiedliche RNA-Konzentrationen (von 10^3 Kopien bis 10^0 Kopien pro Ansatz) in der jeweiligen Reaktion untersucht (Kapitel 2.4.8). Die Fluoreszenzdaten der Untersuchung sind in Abbildung 17A bei einer Template-Konzentration von 10^3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach drei Minuten (blau) im Vergleich zu der Referenz (ohne Mischen, gelb) zu signifikant höheren TT-Werten führt und damit zu einer Verschlechterung der Amplifikation. Die TT-Werte liegen hier bei $5,90 \pm 0,19$ min (Referenz) und $7,21 \pm 0,70$ min (Mischen nach 3 min), wobei der Mischschritt nach 3 Minuten eine große Streuung der TT-Werte um den Mittelwert aufweist. Die Mischzeiten nach 4 Minuten (orange) und 5 Minuten (rot) weisen jeweils signifikant niedrigere TT-Werte zur Referenz auf, sind jedoch untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Demnach liegen die Zusammengefassten TT-Werte der beiden Mischzeiten bei $5,04 \pm 0,19$ min. Die statistische Auswertung ist in Tabelle 21 im Anhang gezeigt. Der Mischzeitpunkt nach 5 Minuten zeigt im Vergleich zu dem Misch-

zeitpunkt nach 4 Minuten eine höhere maximale Fluoreszenzauslenkung und wurde aus diesem Grund als Optimal festgelegt und näher untersucht.

Damit der Einfluss des Mischzeitpunktes auf die low-volume RT-RPA bei geringen RNA-Konzentration untersucht werden kann, wurde eine Konzentrationsreihe mit absteigenden RNA-Konzentrationen (10^2 , 10^1 , 10^0 RNA-Kopien pro Ansatz) und dem Mischzeitpunkt nach 5 Minuten durchgeführt und mit der ungemischten Referenz verglichen (Kapitel 2.4.8). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 17B-D dargestellt. Bei 10^2 Kopien/Ansatz zeigen die Reaktionen mit Mischschritt (rot) signifikant niedrigere TT-werte ($6,53 \pm 0,25$ min) als die Referenz (gelb) ohne zusätzlichen Mischschritt ($7,35 \pm 0,58$ min, statistische Auswertung, Tabelle 22, Anhang). Ein Ditching Effekt nach ≈ 16 Minuten konnte hier bei 6/7 Reaktionen beobachtet werden, wodurch die maximalen Fluoreszenzauslenkungen bei beiden Versuchsreihen ähnlich sind.

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

Bei 10^0 RNA-Kopien/Ansatz wurde mit Mischschritt (rot) 1/6 Reaktion als positiv gewertet, während ohne Mischschritt keine positive Reaktion festgestellt wurden. Demnach konnte ebenfalls einer Erhöhung der Sensitivität durch den eingeführten Mischschritt ermittelt werden. Da alle Messungen der Mischzeit im low-volume Ansatz durchgeführt wurden, wurde ein Vergleich zum 50 μ l Ansatz durchgeführt und der Einfluss des Mischschrittes nach 5 min untersucht. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 28 im Anhang dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein Mischschritt nach 5 Minuten (rot) bei 10^4 RNA-Kopien zu einer Verringerung der TT-Werte und zu einer höheren Fluoreszenzauslenkung führt. Dementsprechend konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten (statistische Auswertung, Tabelle 30, Anhang) mit $6,48 \pm 0,01$ min (ohne Mischen, gelb) und $5,21 \pm 0,03$ min (mit Mischen, rot) festgestellt werden. Des Weiteren zeigt der Mischschritt einen steileren Fluoreszenzanstieg als die ungemischte Referenz.

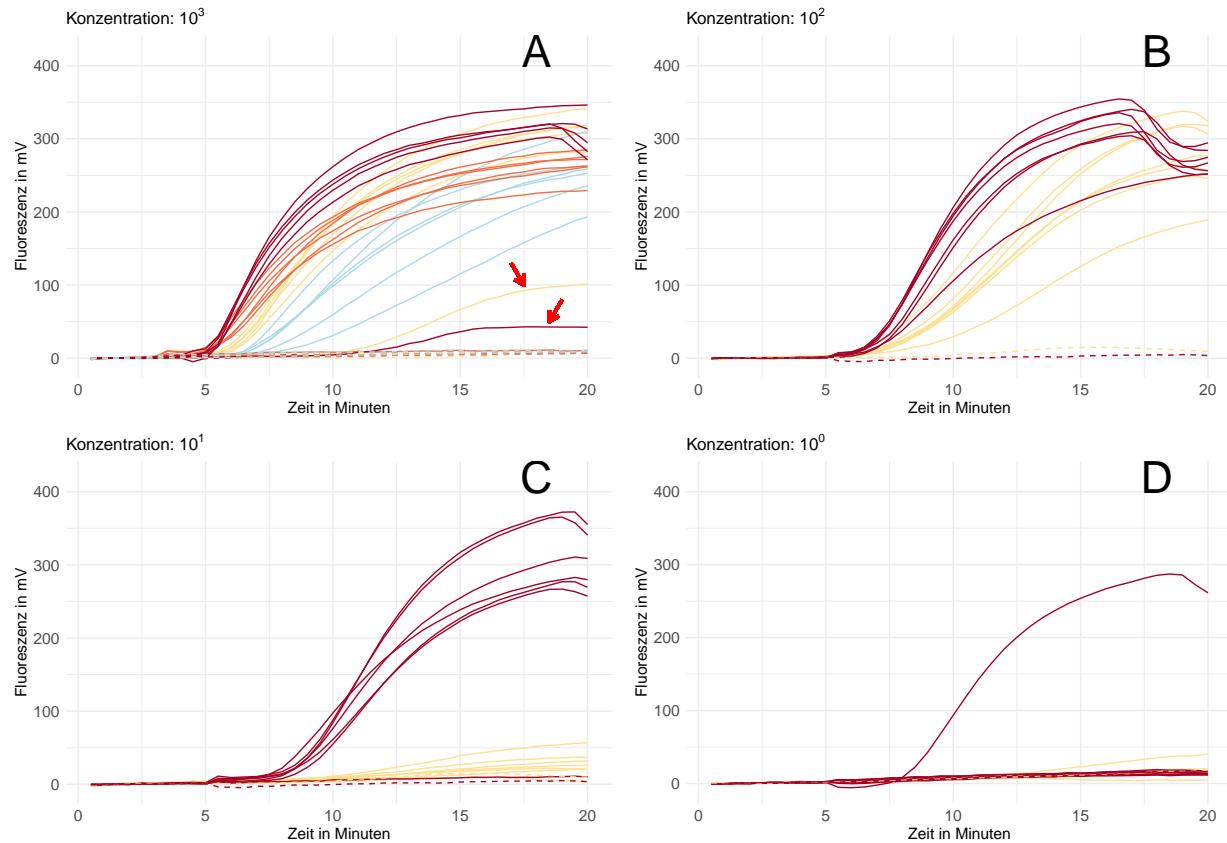


Abbildung 17: **Einfluss der Mischzeit auf die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der RT-RPA sind gezeigt, die bei A) 10^3 , B) 10^2 , C) 10^1 und D) 10^0 Kopien/Ansatz einen zusätzlichen Mischschritt im Vergleich zur RT-RPA ohne Mischschritt darstellen.

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

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

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

3.1.8 Bestimmung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA

Die Sensitivität für die Influenza B RT-RPA wurde mit den ermittelten optimalen Reaktionsparametern (40 °C, 1,5X reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 5 min) bestimmt und die Daten von den Standardvolumenansatz (50 µl) und low-volume gegenübergestellt (Kapitel 2.4.9). In Abbildung 18 sind die Fluoreszenzdaten der dekadischen Verdünnungsreihe von $2 * 10^7$ bis $2 * 10^0$ RNA-Kopien (Abbildung 18A, 18B) sowie das mittels Probit-Analyse (Kapitel 2.1.5) berechnete Detektionslimit (Abbildung 18C, 18D) und die jeweiligen Kalibriergeraden (Abbildung 18E, 18F) dargestellt. Für die Standardvolumen Influenza B RT-RPA konnte ein 95%-iges Detektionslimit von 31,6 Virus RNA-Kopien berechnet werden. Die Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der eingesetzten RNA-Konzentration wurde mit einem $R^2 = 0,93$ und einer Geradengleichung von $y = 11 - 1,3x$ bestimmt. Der angegebene p-Wert mit «0,05 zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang.

Die Sensitivität für den low-volume Ansatz der Influenza B RT-RPA zeigte ein berechnetes Detektionslimit von 14,6 Kopien. Die erstellte Kalibriergerade für die TT-Werte besitzt ein R^2 von 0,92 und eine Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$. Über den Boxplot-Test ermittelte Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 18B) wurden nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert «0,05 zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang. Die RT-RPA zeigt im low-volume Ansatz eine Erniedrigung des Detektionslimits um 15 Kopien bzw. 54 %.

Ein Vergleich zur PCR als Goldstandard-Methode zeigt ein berechnetes Detektionslimit der RT-PCR bei 11,4 Kopien in der Probitanalyse. Somit liegt die Detektionsgrenze des PCR-Systems 3,2 Kopien bzw. 22 % unter der optimierten RT-RPA im low-volume Ansatz. Damit untersucht werden kann, ob ein humarer Nukleinsäurehintergrund das Detektionslimit der optimierten low-volume RT-RPA verändert wurde eine weitere Sensitivitätsanalyse mit Referenzproben (extrahierte humane Nukleinsäure mit zugesetztem RNA-Standard, Kapitel 2.3) durchgeführt. Zusätzlich zu der Wasserkontrolle wurde eine Referenzprobe ohne zugesetzte virale RNA mitgeführt, um unspezifische Reaktionen zu analysieren. Um die humane Hintergrund-DNA zu quantifizieren wurde die Nukleinsäure-Konzentration der Kontrollproben mit dem NanoDrop (n=3) bestimmt. Es konnte eine DNA-Konzentration von $43,58 \pm 6,00$ ng/µl ermittelt werden. Es wurden alle Proben mit einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/µl detektiert, jedoch keine der Proben mit 10^2 RNA-Kopien. Somit konnte ein Detektionslimit von 1397 Kopien berechnet werden. Unspezifische Reaktionen in den Wasserkontrollen bzw. Referenzproben ohne virale RNA wurden nicht beobachtet.

Zur besseren Übersicht ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle 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 mit Referenzproben	1397 RNA-Kopien

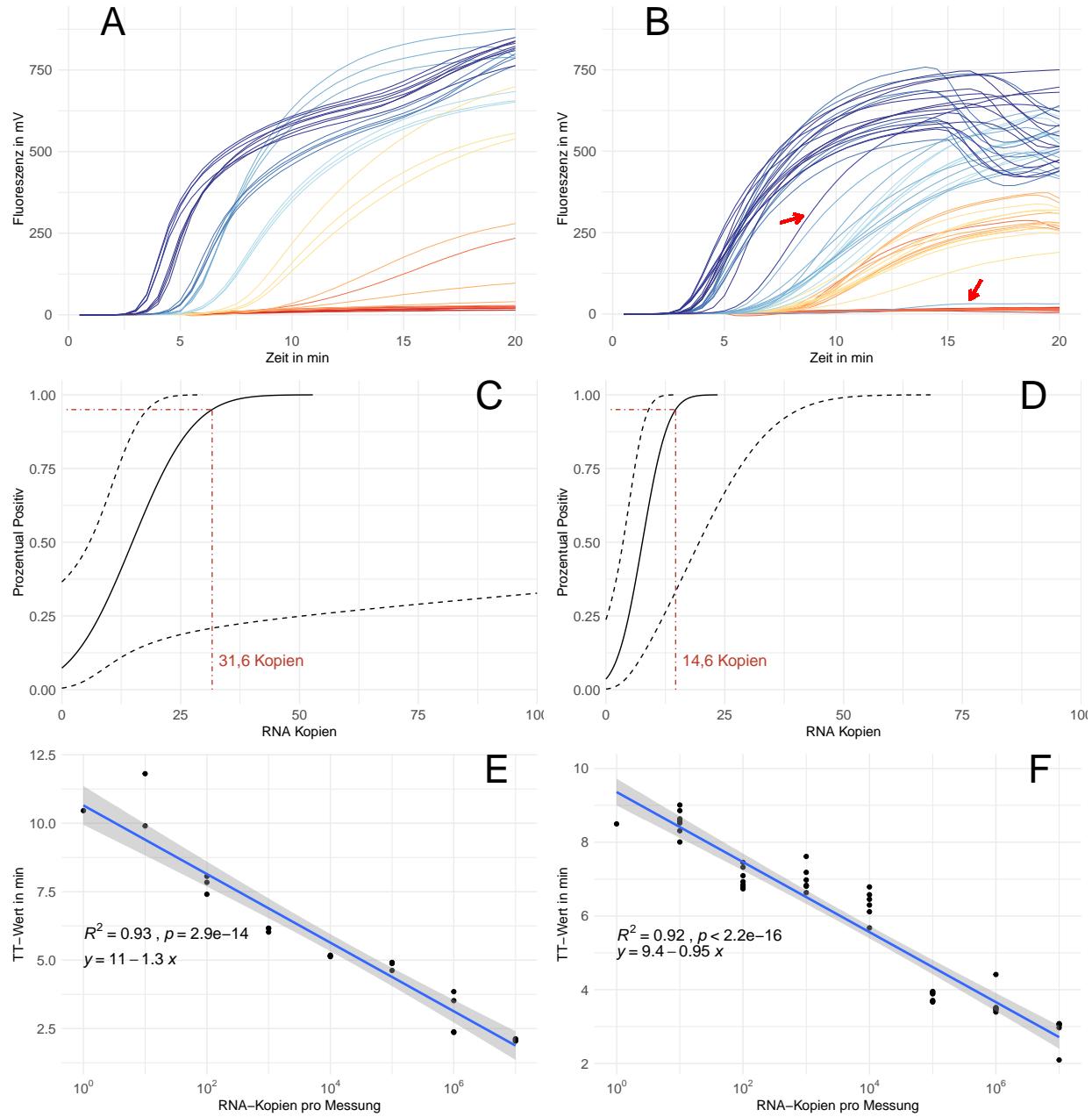


Abbildung 18: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA:**

A,B: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ und 10⁰ RNA-Kopien pro Messung 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 10⁷ und 10⁴ (roter Pfeil) wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

C,D: Probit-Analyse der Amplifikationsdaten für den 50 µl Ansatz (C) und den low-volume Ansatz (D). Die schwarz durchgezogene Linie zeigt den Probit-Regressionengraph der RT-RPA. Die schwarzen gestreiften Linien beschreiben das oberer 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.

3.1.9 Bestimmung der Spezifität der Influenza B RT-RPA

Ähnlich wie die Sensitivität ist die Spezifität ein wichtiger Parameter in der Beschreibung eines Detektionssystems. Geringe Spezifitäten führen zu falsch positiven Ergebnissen und somit zu einer ungenauen Detektion (Saah 1997). Für die Untersuchung der Spezifität wurden die in Tabelle 14 gezeigten Viren mittels der optimierten Influenza B RT-RPA (40 °C, 1,5X reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 5 min) im low-volume Ansatz auf eine Amplifikation getestet. Wie in Tabelle 14 dargestellt, konnte keine der untersuchten Viren detektiert werden.

Tabelle 14: Spezifitätsmessung der Influenza B RT-RPA

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

Notiz: (-) = Keine Amplification; hRSV = Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus; HPV = Humanes Metapneumovirus

3.2 Entwicklung und Optimierung der Influenza A RT-RPA

3.2.1 Überprüfung und Konzentrationsbestimmung Influenza A Virus Standard-RNA

Damit die Gruppe der Influenza A Viren ausreichend untersucht und abgedeckt werden kann, wurden RNA-Standards von den aktuell vorherrschenden Subtypen H1N1 und H3N2 erstellt (Kapitel 2.2.1 - 2.2.7). Die artifiziellen Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung (Kapitel 2.2.3) untersucht. Es konnten keine Sequenzfehler innerhalb der Virus-Sequenz festgestellt werden (Daten nich gezeigt). In Vorbereitung für die *in vitro* Transkription wurden die Plasmide über einen Restriktionsverdau linearisiert (Kapitel 2.2.4). Das Agarose-Gel zur Prüfung der Linearisierung ist in Abbildung 19A gezeigt. Die verdauten Plasmide (Spur 2, Spur 4) weisen eine DNA-Bande bei \approx 3300 bp. Dieses stimmt mit der Plasmidgröße von 3343 bp für beide Plasmide überein (siehe Plasmidkarten 30, 31 im Anhang). Die ungeschnittenen Kontrollplasmide (Spur 3, Spur 5) zeigen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf. Dies lässt auf eine erfolgreiche Linearisierung der Plasmide schließen. Die lineare Plasmid-DNA wurde mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7 Promotor *in vitro* transkribiert und gereinigt (Kapitel 2.2.6). Die artifiziell erstellte virale RNA wurde mittels RiboGreen Assay quantifiziert (Kapitel 2.2.7). Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 19B dargestellt. Es konnte eine Geradengleichung von $y = -190 + 3,8x$ mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,99 errechnet werden. Mithilfe dieser konnten für die viralen RNA's Konzentration von $365,3 \pm 32,4$ ng/ml (H1N1-Subtyp) beziehungsweise $247,9 \pm 22,1$ ng/ml (H3N2-Subtyp) ermittelt werden. Somit konnten entsprechende RNA-Kopienzahlen von $2,0 \times 10^8$ (H1N1-Subtyp) und $1,4 \times 10^8$ (H3N2-Subtyp) Kopien/ μ l ermittelt werden.

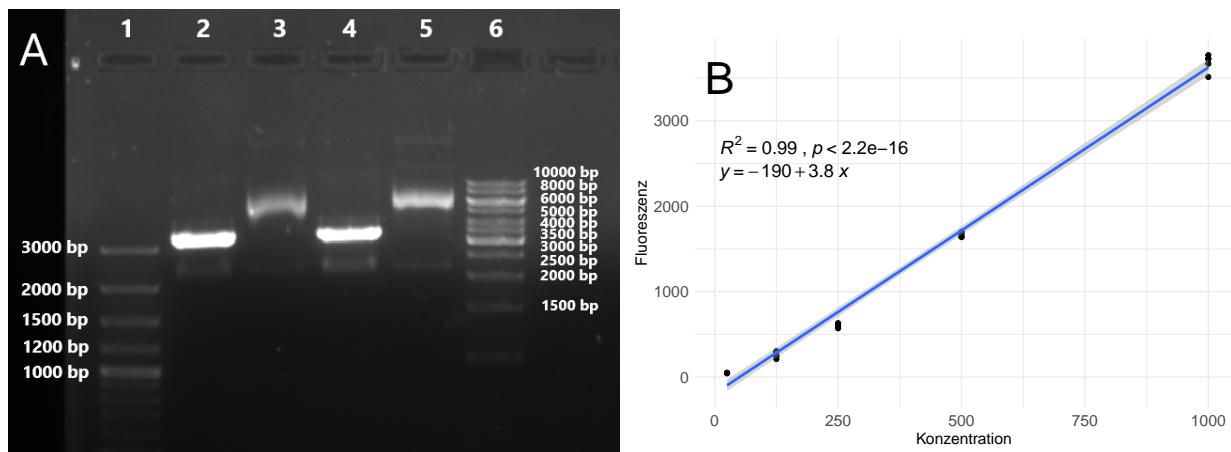


Abbildung 19: Kontrollgel der Plasmidlinearisierung und RiboGreen Kalibrationsgerade der Influenza A Standardherstellung:

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

C Kalibrationsgeraden des RiboGreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit $n=5$ durchgeführt.

3.2.2 Untersuchung der Influenza A RT-RPA Primer und Sonden

Für die Influenza A RT-RPA wurden mithilfe des PrimedRPA-Programms 8 Primer und 2 Sonden ausgewählt (Kapitel 2.1.1, Tabelle 9). Daraus konnten mit Sonde 3 zwei Kombinationen bestehend aus Forward 3 und Reverse 3.1 und 3.2 und mit Sonde 1 sechs Kombinationen mit Forward 1 oder 2 zusammen mit Reverse 1.1 - 1.8 gebildet werden.

Zur Ermittlung einer geeigneten Primer-Sonden-Kombination wurden die insgesamt 8 Kombinationen in der Standard RPA auf Amplifikation bei einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien pro Ansatz getestet (Kapitel 2.4.4). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 20 in Grau gezeigt. Es ist zu erkennen, dass alle gewählten Primer/Sonden-Kombinationen einen linearen Fluoreszenzverlauf mit einem Anstieg zwischen 7 - 10 Minuten und einer maximalen Fluoreszenzauslenkung um 100 - 150 Einheiten aufweisen. Von den untersuchten Kombinationen konnten 3/8 keine positiven Amplifikationen aufweisen. Da die Fluoreszenzdaten aller untersuchten Primer-Sonden-kombinationen Ähnlichkeiten aufweisen wurde keine der Kombination als passen gewählt. Alternativ wurde die bereits beschriebene Primer-Sonden-Kombination von Ehnts (2013) mit degenerierten Basen modifiziert und auf Amplifikation getestet (Ehnts 2013). Aufgrund einer degenerierten Base am 3'-Ende des forward Primers wurde die Kombination um zwei weitere alternative Forward Primer (Forward E.2 und Forward E.3) ergänzt und ebenfalls untersucht (siehe Tabelle 9).

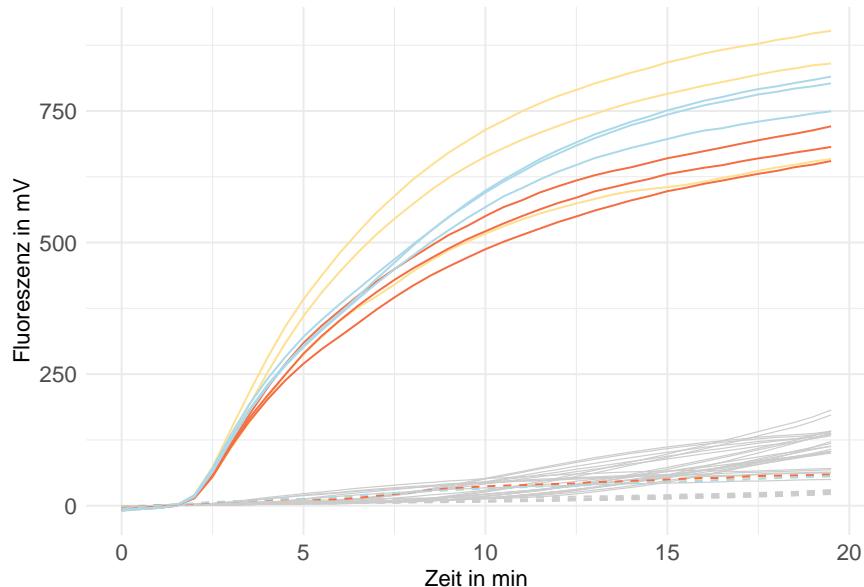


Abbildung 20: **Primerscreening der entwickelten Influenza A RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 9 angegeben Primer und Sonden. Alle Kombinationen der mit PrimedRPA designten Primer und Sonden sind in grau dargestellt. Die Kombinationen abstammend vom entwickelten System von Ehnts (2013) sind farbig dargestellt, wobei die Kombination mit Forward E in gelb, die Kombination mit Forward E.2 in orange und die Kombination mir Forward E.3 in blau abgebildet sind. Alle Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

Die Fluoreszenzdaten der drei neuen Primer/Sonden-Kombinationen sind Farbig in Abbildung 20 dargestellt. Die Ehnts-Kombinationen besitzen im Durschnitt eine maximale Fluoreszenzauslenkung von ≈ 750 Einheiten und erreichen höhere Werte als die PrimedRPA-Kombinationen. Dabei zeigen die Kombination mit den

alternativen forward Primer (orange, blau) niedrigere Fluoreszenzauslenkungen als die Kombination mit dem Forward E Primer (gelb). Des Weiteren besitzen die Ehnts-Kombinationen niedrigere TT-Werte mit $3,18 \pm 0,08$ min als die PrimedRPA-Kombinationen wobei kein signifikanter Unterschied (statistische Auswertung, Tabelle 23, Anhang) zwischen den Ehnts-Kombinationen ermittelt werden konnte. Aufgrund der höchsten Fluoreszenzauslenkung wurde die Primer-Sonden-Kombination bestehend aus Forward E, Reverse E und Sonde E ausgewählt und für alle weiteren Influenza B RT-RPA verwendet.

3.2.3 Verringerung des Reaktionsvolumen der Influenza A RT-RPA

Die low-volume Applikation der RPA bietet, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, für die POCT relevante Vorteile und kann in Lab-on-a-chip System für eine vereinfachte Handhabung eingesetzt werden. Zur Prüfung, ob die in Kapitel 3.2.2 gewählte Primer-Sonden-Kombination auf den low-volume Ansatz adaptiert werden können, wurde ein Vergleich zwischen der Standard RPA (50 μ l, grau) und dem low-volume Ansatz (6,5 μ l, schwarz) bei einer eingesetzten Kopienzahl von 10^8 RNA-Kopien/ μ l durchgeführt (Kapitel 2.4.5). Die Fluoreszenzdaten sind in 21 dargestellt. Der low-volume Ansatz der Influenza A RT-RPA zeigt eine ähnlich wie bei der Influenza B RT-RPA eine niedrigere Fluoreszenzauslenkung im Vergleich zum 50 μ l Ansatz. Jedoch weißt die low-volume RPA zusätzlich signifikant höhere TT-Werte ($4,19 \pm 0,43$ min) als die Standard-RPA ($3,17 \pm 0,12$ min, statistische Auswertung, Tabelle 24, Anhang) auf. Somit zeigt der low-volume Ansatz eine schlechtere Amplifikation als die Standard-RPA. Des Weiteren besitzt der Fluoreszenzgraph der low-volume RPA einen untypischen linearen Verlauf. Aus diesem Grund wurde eine Adaption an den low-volume Ansatz als Nachteilig eingestuft und nicht weiter verfolgt.

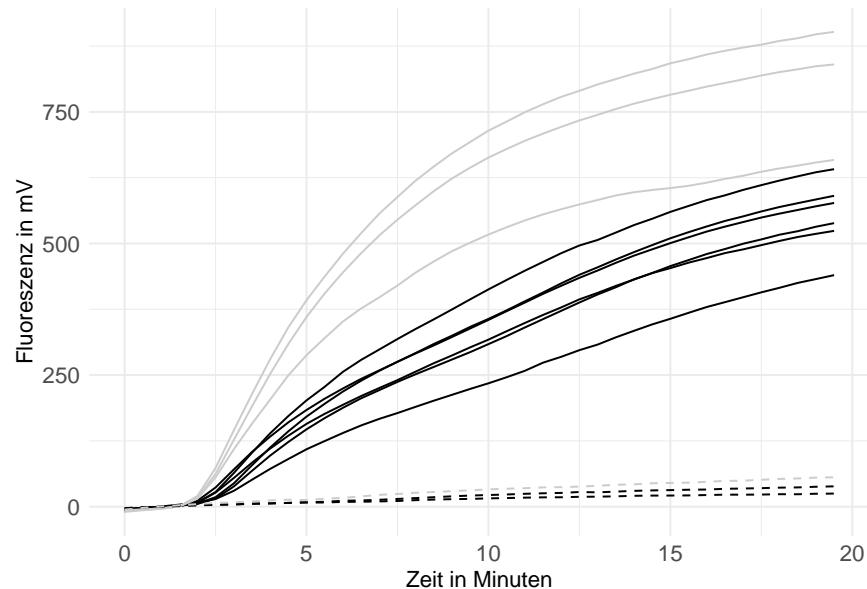


Abbildung 21: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im low-volume -Ansatz (schwarz) bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $n=6$ (siehe 2.4.3) mit dem in 3.2.2 angegebenen Primer-Sonden-Set. Als Virus-RNA wurden 10^8 RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 μ l Ansatz (grau) mit den gleichen Reaktionsparametern in $n=3$ mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

3.2.4 Optimierung der Reaktionstemperatur der Influenza A RT-RPA

Unterschiedliche Reaktionstemperaturen können, wie am Beispiel der Influenza B RT-RPA zu sehen (Kapitel 3.1.4) einen Einfluss auf die Amplifikation der RT-RPA ausüben. Zur Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur der Influenza A RT-RPA wurde das Temperaturintervall zwischen 38 °C und 42 °C innerhalb der Standard-RPA (50 µl) bei 10^8 Kopien pro Ansatz untersucht (Kapitel 2.4.6). Die Fluoreszenzdaten der Temperaturoptimierung bei 38 °C (blau), 40 °C (gelb) und 42 °C (orange) sind in Abbildung 22A dargestellt. Es ist zu beobachten, dass eine höhere Reaktionstemperatur zu niedrigeren TT-Werten führt. So gibt es signifikante Unterschiede (statistische Auswertung, Tabelle 25, Anhang) zwischen allen untersuchten Reaktionstemperaturen, wobei 42 °C die niedrigsten TT-Werte mit $3,69 \pm 0,11$ aufweist. Die RT-RPA's bei 40 °C und 38 °C besitzen TT-Werte von $4,28 \pm 0,12$ min (40 °C) und $4,76 \pm 0,11$ min (38 °C). Die Reaktion bei 38 °C zeigt eine niedrigere durchschnittliche Fluoreszenzauslenkung von ≈ 700 Einheiten während die Reaktionen bei 40 °C und 42 °C mit einer Ausnahme bei 42 °C maximale Fluoreszenzwerte von über 1000 Einheiten aufweisen. Aufgrund der niedrigsten TT-Werte und dementsprechend zeitigsten Anstieg wurde eine Reaktionstemperatur von 42 °C als optimal gewählt und für die weiteren Influenza A RT-RPAs verwendet.

3.2.5 Optimierung der asymmetrischen Primer-Konzentration der Influenza A RT-RPA

Wie in den Kapitel 3.1.5 und 3.1.6 gezeigt führt eine asymmetrische Erhöhung der Reverse Primer-Konzentration in der low-volume RPA zu einer höheren Fluoreszenzauslenkung. Um diesen Effekt auf die Standard RPA zu adaptieren und für Influenza A RT-RPA zu nutzen wurde eine Optimierung der asymmetrischen Primer-Konzentration in der Standard-RPA bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/µl und 42 °C durchgeführt. Dabei wurde eine 1,5X erhöhte (0,625 µM) und eine 2X erhöhte (0,9 µM) reverse Primer-Konzentration mit der Referenz (keine veränderte Primer-Konzentration) verglichen (Kapitel 2.4.7). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 22B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der reverse Primer-Konzentration wie erwartet zu einer Erhöhung der maximalen Fluoreszenzintensität führt. So ist eine Erhöhung der Fluoreszenz zwischen der 1,5X erhöhten Primer-Konzentration (gelb) und der Referenz mit normaler Primer-Konzentration (blau) um rund 750 Einheiten zu beobachten. Eine weitere Erhöhung um rund 300 Fluoreszenzeinheiten ist bei der 2X erhöhten reverse Primer-Konzentration (orange) zu sehen. Ein Vergleich der TT-Werte war durch die begrenzte Probenanzahl nicht möglich. Alle TT-Werte liegen um $3,71 \pm 0,27$ min und keine markanten Unterschiede sind zu erkennen. Des Weiteren zeigt die 2X erhöhten reverse Primer-Konzentration ein anfängliches Dichting (markiert durch den roten Pfeil). Um dieses bei zukünftigen Messungen zu vermeiden, wurden eine 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration als Optimal festgelegt und für die weiteren RT-RPA's verwendet.

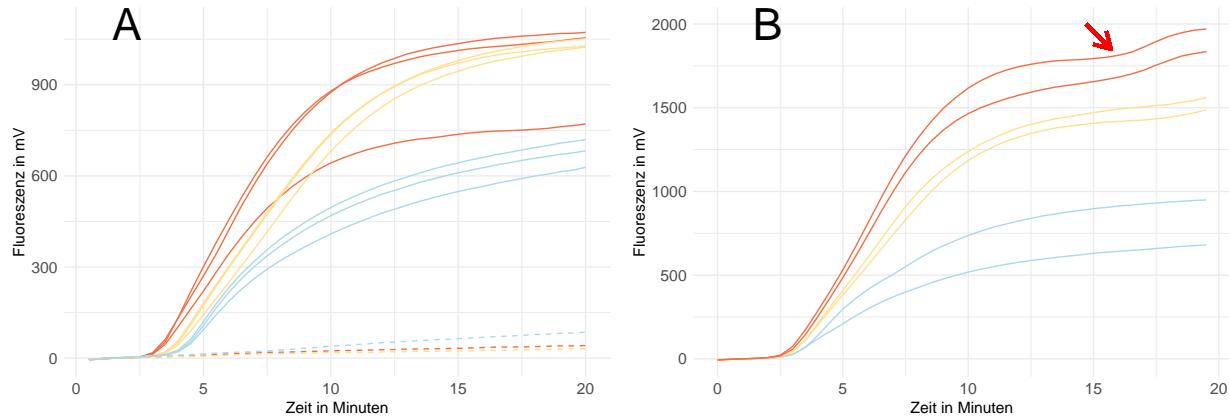


Abbildung 22: Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymmetrie der Influenza A RT-RPA: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 50 μ l Ansatz.
A: Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (blau), 40 °C (gelb) und 42 °C (orange) mit 10^8 RNA-Kopien/Ansatz. Messung in n=3 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.
B: Optimierung der Primerasymmetrie mit 1,5X erhöhter reverse Primer-Konzentration (gelb) und 2X erhöhter reverse Primer-Konzentration (orange) sowie mitgeführter Referenz (blau, 1X Primer-Konzentration) bei einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/Ansatz. Messung in n=2 pro Primer-Konzentration. Der rote Pfeil zeigt anfängliches Ditching bei der 2X erhöhten reverse Primer-Konzentration.

3.2.6 Optimierung der Mischzeit der Influenza RT-RPA

Wie in Kapitel 1.4.5 beschrieben führt ein zusätzlicher Mischschritt zu einer besseren Amplifikation. Ebenfalls konnte Anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden, dass der Mischschritt in der Standard-RPA einen großen Einfluss bei niedrigen RNA-Konzentrationen (10^4 Kopien abwärts) auf die Amplifikation ausüben kann. Für die Optimierung des Mischschrittes für die Influenza A RT-RPA wurden 5 Mischzeitpunkte (7 min, 5 min, 3 min, 2 min und 90 sek) bei einer Temperatur von 42 °C, einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l durchgeführt (Kapitel 2.4.8). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 23 dargestellt. Wie in Abbildung 23A zu sehen, führen die Mischzeiten bei 5 Minuten (orange) und 7 Minuten (blau) zu einer deutlich niedrigeren Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (ohne Mischen, gelb). Dabei hebt sich die RT-RPA mit einem Mischschritt nach 7 Minuten nicht von den mitgeführten Wasserkontrollen ab und weist in der Auswertung (Kapitel 2.1.3) 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 (statistische Auswertung, Tabelle 26, Anhang) als die Referenz ($9,05 \pm 0,58$ min) auf. Des Weiteren ist eine plötzliche Abnahme der Fluoreszenz bei den beiden Messreihen (markiert durch einen roten Pfeil) zu erkennen, welche jedoch nicht als Ditching bewertet wird sondern von der Unterbrechung der Messung zusammen mit dem Mischschritt herrührt. Die Messungen mit einem Mischschritt nach 3 Minuten (rot) zeigen im Gegensatz zu den Messungen mit einem Mischen nach 5 min beziehungsweise 7 min ähnliche Fluoreszenzwerte wie die Referenz. Ein signifikanter Unterschied zwischen den TT-Werten konnte nicht festgestellt werden. Werden die Mittelwerte der beiden Messreihen mit $9,05 \pm 0,58$ min (Referenz) und $8,00 \pm 0,73$ min (Mischen nach 3 min) einzeln betrachtet ist ein zeitigerer jedoch nicht signifikanter Anstieg bei der Messreihe mit Mischen nach 3 min zu erkennen (statistische Auswertung, Tabelle 26, Anhang). In Abbildung 23B sind die Messreihen mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 90 sek (blau) und 2 min (orange) zusammen mit der Referenz (gelb) gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass der Mischschritt nach 90 Sekunden zu einer niedrigeren

Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz führt und zusätzlich eher einen linearen 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 mittleren TT-Werte mit $7,77 \pm 0,34$ min (Mischen nach 2 min) und $9,05 \pm 0,58$ min (Referenz) einzeln, lässt sich, ähnlich wie bei dem Mischschritt nach 3 min, ein zeitigerer Anstieg bei dem Mischschritt nach 2 min erkennen. Aufgrund der höchsten Fluoreszenzauslenkung am Ende der Messung wurde ein Mischschritt nach 2 Minuten als Optimal festgelegt.

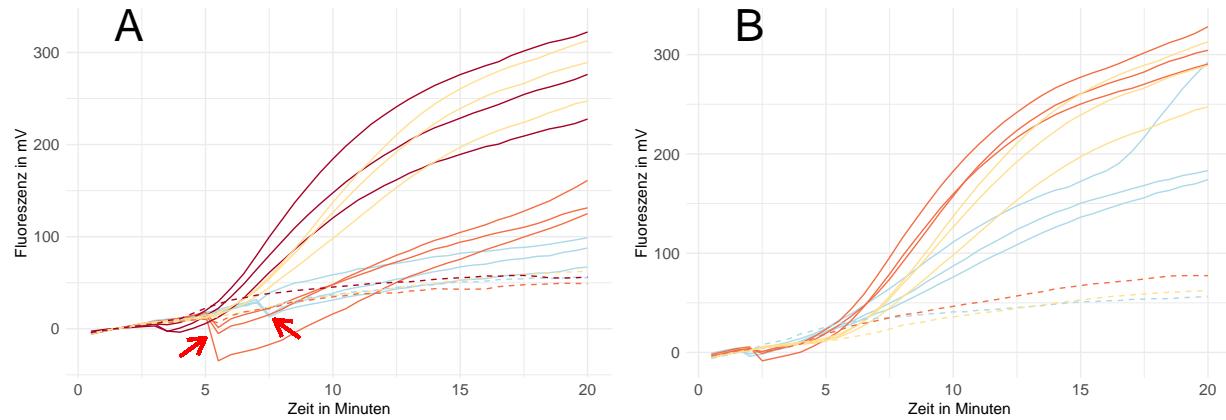


Abbildung 23: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Reaktion.

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

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

3.2.7 Ermittlung der Sensitivität der Influenza A RT-RPA

Analog zur Influenza B RT-RPA (Kapitel 3.1.8) wurde die analytische Sensitivität zur Beschreibung der Influenza A RT-RPA für beide Subtypen in der standard RPA (50 µl) ermittelt und mit der RT-PCR verglichen (Kapitel 2.4.9). Die Messungen erfolgten mit den als optimal bestimmten Reaktionsparametern (42 °C, Mischen nach 2 min, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration). Für die Berechnung wurde der Schwellenwert für den p-Wert des Shapiro-Wilk-Test in Kapitel 2.1.3 auf 0,05 angepasst. Die Abbildung 24 zeigt die Fluoreszenzdaten der dekadischen Verdünnungsreihe ($2 * 10^7$ bis $2 * 10^0$) für die jeweiligen Subtypen (Abbildung 24A,B), die daraus ermittelten Kalibriergeraden der TT-Werte im Zusammenhang mit der eingesetzten RNA-Konzentration (Abbildung 24C,D) und das berechnete Detektionslimit (Abbildung 24E). Für beide Subtypen (H1N1, H3N2) konnten jeweils 2 von 3 positive Amplifikationen bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von $2 * 10^2$ Kopien/µl detektiert werden. Bei niedrigeren RNA-Konzentrationen konnten keine weiteren positiven Amplifikationen erfasst werden. In dem Fluoreszenzdaten für den H1N1-Subtyp (siehe Abbildung 24A) ist ein linearer Anstieg der Fluoreszenz bei der eingesetzten RNA-Konzentration von 10^1 Kopien/µl zu beobachten (markiert mit rotem Pfeil), welcher eine maximale Fluoreszenzintensität von über 950 Einheiten erreicht. Dieser konnte in der Auswertung nicht als positiv ermittelt werden und wurde als Messfehler eingestuft. Die Kalibriergerade lässt sich für beide Subtypen mit der Gleichung von $y = 11 - 1,2x$ beschreiben. Der Messfehler sowie generell negative Amplifikationen wurden hierbei vernachlässigt. Bei beiden Subtypen liegt der ermittelte p-Wert <0,05, was einen starken und signifikanten linearen Zusammenhang 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.

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

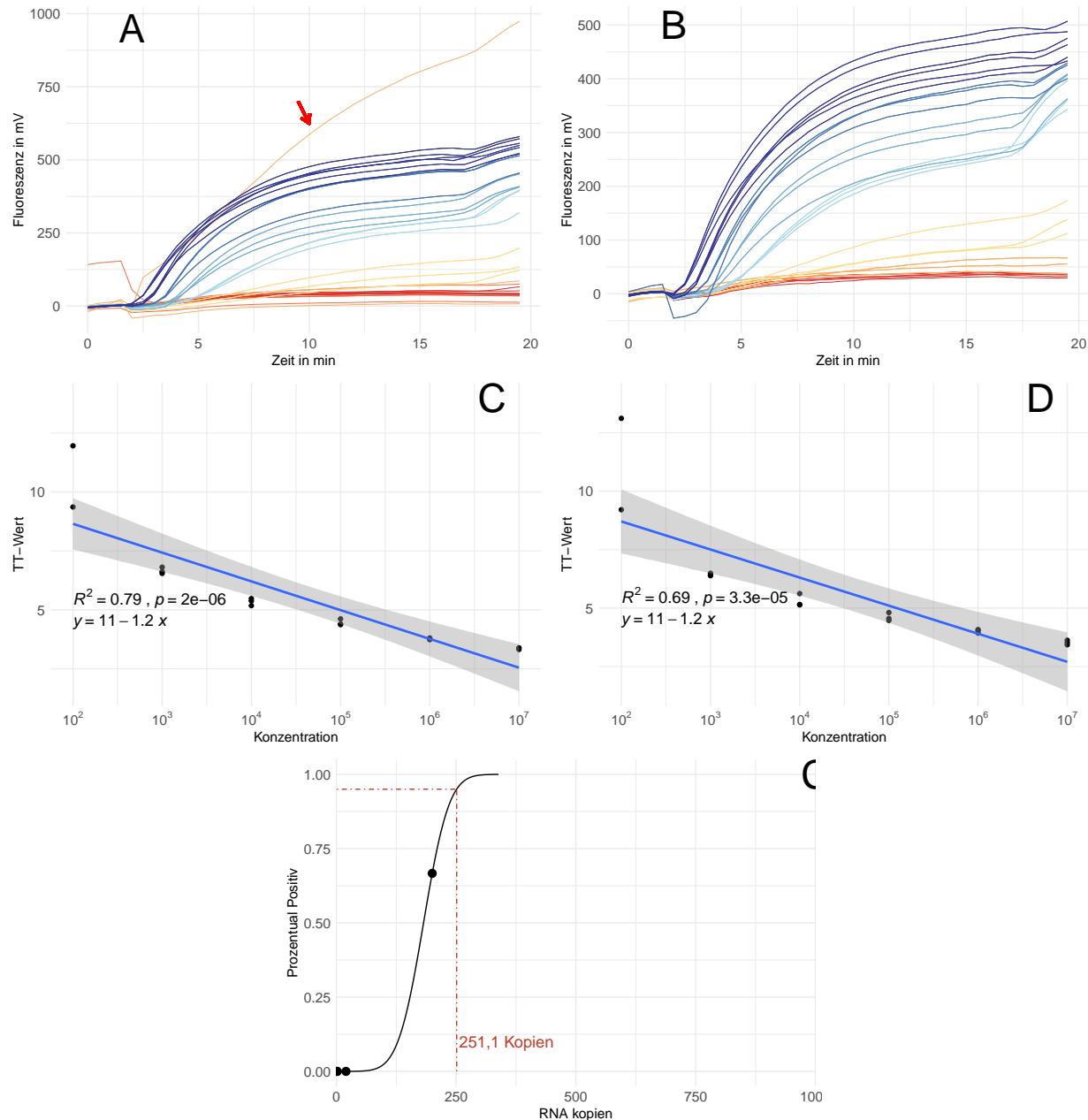


Abbildung 24: **Sensitivitätsanalyse der Influenza A RT-RPA:**

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

3.2.8 Einfluss des Sondendesigns auf die Influenza A RT-RPA

Wie in Kapitel 2.1.1 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 A RT-RPA mit den gewählten optimalen Parametern ($42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration, Mischen nach 2 min) mit beide Sondentypen durchgeführt (Kapitel 2.4.10). Der Vergleich der beiden Sondentypen bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μl ist in Abbildung 25 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die *dt-quenched* Sonde eine höhere Fluoreszenzauslenkung als die *iQ*-Sonde im Verlauf der Reaktion annimmt. Des Weiteren zeigt die Wasserkontrolle der *iQ*-Sonde im Vergleich zu der *dt-Quenched*-Sonde ein stetiges, unspezifisches Hintergrundsignal bei ≈ 50 Einheiten, während bei *dt-Quenched*-Sonde nur minimale Hintergrundsignale detektiert wurden. Es konnte ein signifikanter Unterschied (statistische Auswertung, Tabelle 27, Anhang) zwischen den TT-Werten mit $4,89 \pm 0,07\text{ min}$ (*iQ*) und $4,53 \pm 0,05\text{ min}$ (*dt-Quenched*) festgestellt werden. Generell lässt sich festgestellt, dass die *dt-Quenched* Sonde höhere Fluoreszenzwerte annimmt und zu einem zeitigeren Signal führt.

Um den beschriebenen Effekt der *dt-Quenched* Sonde auf die Sensitivität zu untersuchen wurde eine Sensitivitätsanalyse analog zu Kapitel 3.2.7 mit der *dt-Quenched* Sonde für beide Subtypen durchgeführt. Mit der *dt-Quenched* Sonde konnten alle Reaktion mit einer RNA-Ausgangskonzentration von $2 * 10^2$ Kopien/ μl als positiv Detektiert werden und dementsprechend Detektionslimit für beide Subtypen bei 147,5 RNA-Kopien berechnet werden. Das Entspricht einer Sensitivitätsverbesserung 49 % für beide Subtypen.

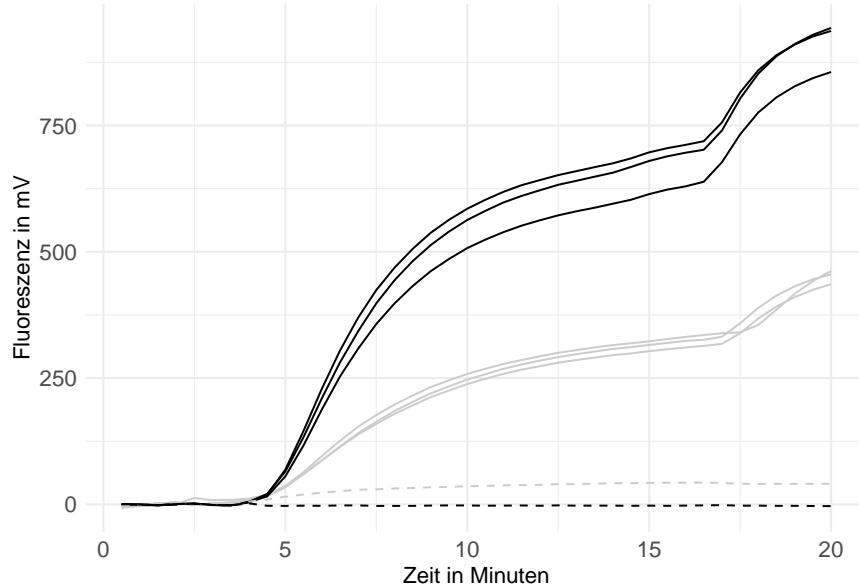


Abbildung 25: **Einfluss der Sondenmodifikation auf die Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Vergleichs zwischen der *iQ*-Sonde (grau) und der *dt-quenched* Sonde (schwarz, Modifikationen siehe Abbildung 9) mithilfe der Influenza A RT-RPA. Die Messung wurde dabei mit den optimalen Reaktionsparametern ($42\text{ }^{\circ}\text{C}$, mischen nach 2 min, 1,5X reverse Primer-Konzentration) bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μl (H1N1-Standard) in $n=3$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

Wie in Kapitel 3.1.8 anhand der Influenza B RT-RPA gezeigt werden konnte, übt ein humana Nukleinsäure Probenhintergrund im low-volume Ansatz einen Einfluss auf das Detektionslimit aus. Um einen möglichen Einfluss der Referenzproben auf das Detektionslimit der optimierten Influenza A RT-RPA im Standard Vo-

lumen (50 μ l) mit der *dt-Quenched* Sonde zu untersuchen, wurde eine Sensitivitätsanalyse mit den Referenzproben analog zu [3.2.7](#) durchgeführt. Neben der Wasserkontrolle wurde eine Referenzprobe ohne zugesetzte Influenza A RNA mitgeführt, um unspezifische Reaktionen mit der humanen Nukleinsäure zu untersuchen. Es konnte dabei keine Verringerung der Sensitivität, sowie keine unspezifischen Reaktionen mit dem humanen Nukleinsäure Hintergrund festgestellt werden. Dementsprechend liegt das Detektionslimit unverändert für beide Subtypen bei 147,5 RNA-Kopien.

Zur besseren Übersicht ist der Vergleich der verschiedenen ermittelten Sensitivitäten in Tabelle [15](#) dargestellt.

Tabelle 15: Vergleich der verschiedenen Detektionslimits der Influenza A RT-RPA

Messung	H1N1-Subtyp	H3N2-Subtyp
RT-RPA im 50 μ l Ansatz	251,1 RNA-Kopien	251,1 RNA-Kopien
RT-PCR	13,1 RNA-Kopien	32,2 RNA-Kopien
RT-RPA mit dT-Quenched Sonde	147,5 RNA-Kopien	147,5 RNA-Kopien
RT-RPA mit dT-Quenched Sonde und Referenzproben	147,5 RNA-Kopien	147,5 RNA-Kopien

3.2.9 Bestimmung der Spezifität der Influenza A RT-RPA

Ähnlich wie bei der Influenza B RT-RPA wurde Spezifität als wichtiger Parameter zur Beschreibung der optimierten Influenza A RT-RPA untersucht. Die Messung erfolgte mit der *dT-Quenched*-Sonde und den optimierten Reaktionsparametern (42 °C, Mischen nach 2 min, 1,5X erhöhte reverse Primer-Konzentration). Die getesteten Viren sowie die Auswertung der Amplifikation sind in Tabelle [16](#) gezeigt. Es konnten keine der untersuchten Viren detektiert werden.

Tabelle 16: Späzifitätsmessung der Influenza A RT-RPA

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

Notiz: (-) = Keine Amplification; hRSV = Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus; HPV = Humanes Metapneumovirus

4 Diskussion

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

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

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

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

Da das M1-Gen auf dem Genomsegment 7 durch seine Funktion das am stärksten konservierte Gen ist (McCauley & Mahy 1983), wurde dieser Bereich für die Influenza A RT-RPA ausgewählt um die beiden Subtypen H1N1 und H3N2 zu detektieren. Dieser Genomabschnitt wird ebenfalls von RT-PCR-Systemen zur Detektion verwendet (Daum *et al.* 2007; Suwannakarn *et al.* 2008; NCIRD 2021). Trotz der hohen Konservierung des Gens besitzt das Gensequenz-Alingment (Abbildung 26) der beiden Subtypen H1N1 und H3N2 etliche Basenfehlpaarungen. Diese Fehlpaarungen sind schematisch in Abbildung 26 als rote Linien dargestellt. Die größte Homologie (90,4 %) ist im Bereich zwischen 10 bp und 250 bp zu beobachten. Aus diesem Grund wurden auch alle mittels PrimedRPA designten und von Ehnts (2013) entwickelten Primer in diesen Bereich gelegt.

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

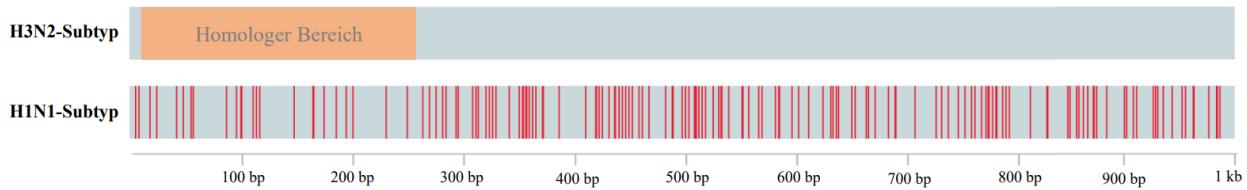


Abbildung 26: **Alignment des Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyps:** Alignement des Genomsegments 7 zwischen dem H1N1-Subtyp (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2-Subtyp (GenBank Nr.: MT244214). Die Skala gibt die Sequenzlänge in bp an. Die roten Striche stehen für Basenfehlpaarungen im H1N1 Subtyp im Vergleich zum H3N2 Subtyp. Der orange markierte Bereich gibt den Sequenzabschnitt mit der größten Homologie an.

werden.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, sind die ausgewählten Primer-Soden-Kombinationen des PrimedRPA Programms unbrauchbar. Bei der Influenza B RT-RPA (Abbildung 12) konnten hingegen alle ausgewählten Primer-Sonden-Kombinationen zumindest klar positive Amplifikationen zeigen. Somit ist eine deutliche Differenz hinsichtlich der Funktionalität des PrimedRPA Programms für die Entwicklung von Primer-Sonden-Kombinationen zu beobachten. Dies könnte an den verwendeten Sequenzvorlagen liegen, da bei Influenza A im Gegensatz zu Influenza B etliche Basenfehlpaarungen in Sequenz vorhanden waren. Die entwickelten Primer wiesen jeweils bis zu 3 Basenfehlpaarungen über den Primer verteilt je nach Subtyp auf. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass bis zu 6 Fehlpaarungen in RPA-Primern eine RPA nicht vollständig inhibieren (Boyle *et al.* 2013). Somit kann die unfunktionalität der Primer nicht durch die Anzahl der Basenfehlpaarungen erklärt werden. Des Weiteren konnten Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015) zeigen, dass vor allem Fehlpaarungen am 3' und 5'-Ende des Primers die RPA entscheidend inhibieren (Boyle *et al.* 2013; Higgins *et al.* 2022). Dabei besaßen sowohl der von Ehnts (2013) entwickelte Forward E Primer als auch der vom Programm designete Primer Forward 1 eine Basenfehlpaarung am 3'-Ende. Bei beiden Primern wurde die Fehlpaarung durch ein generierte Basen ausgeglichen, jedoch nicht komplett vermieden, da innerhalb der Primergemischs die Hälfte der Primer immer noch die Fehlpaarung aufwiesen (Liang *et al.* 2022). Um die Basenfehlpaarung des Forward E Primers gänzlich zu vermeiden, wurden zwei alternative Primer (Forward E.2 und E.3) entwickelt, welche um eine Position verschoben waren (Tabelle 9). Jedoch zeigte sich, dass die alternativen Primer ohne 3'-Mismatch leicht schlechtere Fluoreszenzauslenkungen aufwiesen, als der Forward E Primer (Abbildung 20). Dies spricht gegen die Beobachtungen Higgins *et al.* (2022) und Daher *et al.* (2015), welche beschreiben, dass gerade Fehlpaarungen am 3'-Ende großen negativen Einfluss auf die RPA nehmen und somit die Primer ohne Fehlpaarung bessere Amplifikationen zeigen müssten. Jedoch bezogen sich beide Studien nur auf die Primer und ließen die Sonde außer Acht, welche jedoch ebenfalls Fehlpaarungen bei der Influenza A RT-RPA aufwies (Boyle *et al.* 2013; Higgins *et al.* 2022). Liu *et al.* (2019) konnte zeigen, dass Fehlpaarungen in der Sonde bis hin zu einer vollständigen Inhibierung und sogar zu falsch positiven Amplifikationen der RPA führen können (Liu *et al.* 2019). Das könnte eine mögliche Erklärung zur großen Diskrepanz, zwischen dem von Ehnts (2013) entwickelten RPA-System und dem mit PrimedRPA designten Primer-Sonden-Kombinationen innerhalb der Influenza A RT-RPA sein. Zwar besitzt die von Ehnts (2013) entwickelte Sonde (Sonde E) ebenfalls Basenfehlpaarungen diese könnten jedoch die RT-RPA nur teilweise inhibieren, während die Fehlpaarungen der PrimedRPA-Sonden (Sonde 3.1 und Sonde 1.1) zu einer unfunktionalen RT-RPA führen.

Des Weiteren ist bei der Primerauswahl der Influenza B RT-RPA (Abbildung 12) 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 und somit durch eine sterische Hinderung die Amplifikation einschränken (Saisuk *et al.* 2019). So konnte beispielweise Wei & To (2003) innerhalb einer PCR zeigen, dass eine RNA-Sekundärstruktur trotz der hohen Temperaturen in der RT-PCR die Amplifikation inhibierte (Wei & To 2003). Wie in Kapitel 1.2.1 erwähnt sind die jeweiligen Enden eines Genomsegmentes komplementär zueinander und bilden im Virion eine Loop-Struktur aus (Modrow *et al.* 2010). Betrachtet man die Hybridisierungspositionen, der für die Influenza A RT-RPA entwickelten Primer und Sonden liegen diese am Anfang der Genomsequenz bei ≈ 50 bp bis ≈ 200 bp (Abbildung 26), während die Influenza B RT-RPA Primer und Sonden mittig in der Sequenz bei ≈ 650 bp und ≈ 730 bp liegen. Somit könnte diese Loop-Struktur in vitro durch die sterische Hinderung eventuell die Amplifikation der Influenza A RT-RPA inhibieren, während Amplifikation der Influenza B RT-RPA durch seine Lage nicht beeinflusst wird. Damit könnte sich der Unterschied zwischen der Influenza A RT-RPA und der Influenza B RT-RPA erklären lassen, jedoch müssten RNA-Strukturanalysen durchgeführt werden, um dies zu bestätigen.

4.2 Mischzeitpunkt und Sensitivität in der RT-RPA mit reduzierten Reaktionsvolumen

Durch geringe thermische Konfektion und durch den „*crowding agent*“ wird die Diffusion der Reagenzien während der RT-RPA erschwert und es kommt zu lokaler Reagenzien-Knappheit (Lillis *et al.* 2016). Deshalb wird ein zusätzlicher Mischschritt vor allem bei niedrigen template-Konzentrationen empfohlen, welcher zu einer erneuten Homogenisierung der Reaktion führt (Piepenburg *et al.* 2006; Lillis *et al.* 2016). Lillis *et al.* (2016) konnten jedoch zeigen, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens auf 5 μ l die Notwendigkeit des zusätzlichen Mischschrittes eliminiert (Lillis *et al.* 2016). Wie in Kapitel 3.1.3 gezeigt wurde das klassische Reaktionsvolume von 50 μ l auf 6,5 μ l reduziert, was einem leicht höheren Volumen als dem von Lillis *et al.* (2016) entspricht. Beim Vergleich der Mischzeit in Bezug auf das unterschiedliche Volumen stellt sich heraus, dass der Mischschritt bei der low-volume RPA einen deutlichen Einfluss bei erst 10^1 RNA-Kopien ausübt (siehe Abbildung 17) und die maximale Fluoreszenz und die Anzahl der positiven Amplifikationen von 3/7 auf 7/7 verbessert. Im 50 μ l Ansatz hingegen kann schon eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenz und eine signifikante Verbesserung des TT-Wertes bei 10^4 RNA-Kopien beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden dass eine Volumenreduzierung, den Einfluss des Mischschrittes minimiert, dieser jedoch entgegen der Beobachtungen von Lillis *et al.* (2016) bei niedrigen Konzentrationen (10^1 und 10^0) immer noch essentiell ist und zu deutlichen Verbesserungen der RPA führt. Lillis *et al.* (2016) arbeiteten allerdings mit einer geringeren Volumen (5 μ l zu 6,5 μ l) und ohne Mineralöl-Überschichtung, welches die Vergleichbarkeit schwierig macht. Es kann jedoch anhand den Daten in der vorliegenden Arbeit und den von Lillis *et al.* (2016) festgestellt werden, dass eine Verringerung des Reaktionsvolumen die Notwendigkeit des Mischschritts bei höheren Konzentrationen (10^4 und 10^3) eliminiert (Lillis *et al.* 2016). Eine mögliche Begründung liegt darin, dass einerseits durch das verringerte Volumen ein größeres Verhältnis zwischen hinzugefügter Probe und Reaktionsmix besteht und dadurch eine bessere Diffusion zwischen Probe und Reaktionsmix stattfindet. Andererseits führt das geringere Volumen zu einem größeren Oberflächen-Volumen Verhältnis, welches zu einer besseren Wärmeübertragung und dementsprechend einer stärkeren Konvektion führt (Böckh & Wetzel 2017).

Des Weiteren zeigt die low-volume Influenza B RT-RPA, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens

zu einer Sensitivitätserhöhung von über 50 % führt. Der ähnlicher Effekt konnte, wenn auch nicht in dieser Ausprägung, konnte ebenfalls durch Lillis *et al.* (2016) nachgewiesen werden (Lillis *et al.* 2016). Die Sensitivitätsverbesserung lässt sich eventuell durch das erhöhte Verhältnis zwischen eingesetzter Probe und RPA-Reaktion und der erhöhten Konvektion erklären, welche zu einer bessere Diffusion in der Reaktion führen und somit Amplifikation positiv beeinflussen.

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

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

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

4.3 Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays

Das analytische Detektionslimit der optimierten RT-RPA für den Influenza B Virus liegt in der klassischen RPA (50 μ l) bei 31,6 bzw. im low-volume Ansatz (6,5 μ l) bei 14,6 RNA-Kopien (Tabelle 13). Im Vergleich zu der getesteten RT-PCR vom NCIRD (2021) konnte eine Differenz von nur 3 Kopien zum low-volume Ansatz festgestellt werden. Somit liegen beide Detektionslimits in der gleichen Größenordnung. Bei dem Vergleich mit anderen RT-PCR Systemen, welche in der Literatur beschrieben sind, liegt das analytische Detektionslimit der RT-RPA eine Größenordnung unter den der RT-PCR (Wu *et al.* 2008; Ni *et al.* 2021). Somit besitzt die entwickelte und für den low-volume Ansatz optimierte Influenza B RT-RPA eine vergleichbare bzw. niedrigere analytische Sensitivität wie die RT-PCR als Goldstandard in der Diagnostik. Beim Vergleich mit einer RT-RPA von Liang *et al.* (2022) konnte ein ähnlichen Detektionslimit ermittelt werden, da beide Systeme einzelne RNA-Moleküle detektieren können (Abbildung 17D) (Liang *et al.* 2022).

Die optimierte Influenza A RT-RPA differenziert im Vergleich zur Influenza B RT-RPA in *puncto* Sensitivität mit der untersuchten Influenza A RT-PCR (siehe Tabelle 15). Sie zeigt eine deutlich schlechtere Sensitivität

und liegt im Vergleich zur Literatur rund 10 - 100 mal über den Detektionslimits von PCR- und RPA-Assays (Wu *et al.* 2008; Ni *et al.* 2021; Liang *et al.* 2022). Die vergleichsweise niedrige Sensitivität der hier weiterentwickelten Influenza A RT-RPA lässt sich möglicherweise wie in 4.1 diskutiert durch die erhöhte Anzahl an Basenfehlpaarungen in Primern und Sonde oder die eventuelle Bildung von Sekundärstrukturen erklären. Bei der Zugabe sogenannter „background“ Nukleinsäure (Abschnitt 2.4.9) zum Reaktionsgemisch, zur Simulation einer potentiellen Patientenprobe, konnte eine deutliche Verringerung in der low-volume Influenza B RT-RPA (siehe Tabelle 13) beobachtet werden, während die Influenza A RT-RPA keine Reduktion aufweist (siehe Tabelle 15). Eine Erklärung könnte die unterschiedlichen Reaktionsvolumina der verschiedenen RT-RPA-Assays zusammen mit dem eingeführten humanen Hintergrund liegen. Im Standardvolumen (50 µl) ist die DNA-Konzentrationen versuchsbedingt geachtet und hat damit möglicherweise geringere inhibitorische Einflüsse. Wie in 1.2 erwähnt, können große Mengen an genetischer DNA die RPA inhibieren. Dabei hängt die Inhibition neben der Konzentration der genetischen DNA auch von der Konzentration des eingesetzten zu amplifizierenden Materials ab (Rohrman & Richards-Kortum 2015). Da innerhalb der verwendeten Nukleinsäure-Extraktionsmethode kein DNase-Verdau Schritt durchgeführt wird (QIAGEN 2020) bleibt die genetische DNA in den Extrakten erhalten. Durch das geringere Volumen des low-volume Ansatzes (6,5 µl) und dem gleichbleibendem Volumen der eingesetzten Probe könnte durch das höhere Proben-Reaktions-Verhältnis (1 µl Probe auf 5,5 µl Reaktion) eine geringere Menge an Hintergrund-DNA benötigt werden um die Reaktion zu inhibieren. Im Gegensatz dazu ist bei der klassischen RPA ein deutlich geringeres Proben-Reaktions-Verhältnis (1 µl Probe auf 49 µl Reaktion) vorhanden, wodurch im Endeffekt eine geringere Hintergrund-DNA Konzentration in dem 50 µl Ansatz-Volumen vorhanden ist. Der Arbeit von Rohrman & Richards-Kortum (2015) zufolge sorgt eine eingebrachte DNA-Konzentration von 500 ng in der klassischen RPA bei einer Template-Konzentrationen von 10^2 RNA-Kopien für eine komplette Inhibition der Detektion (Rohrman & Richards-Kortum 2015). Rechnet man die für die Inhibition benötigte Konzentration der genetischen DNA auf das Reaktionsvolumen des low-volume Ansatz runter, würden 62,5 ng ausreichen, um eine vollständige Inhibition auszulösen. Die ermittelte DNA-Konzentration der Referenzproben liegt bei rund 45 ng/µl (Kapitel 3.1.8) und somit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Eine Inhibition der RPA im low-volume Ansatz bei niedrigen Kopien-Anzahlen scheint daher plausibel.

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

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

Kopien/ μ l VTM Transportmedium enthalten, während Nasal-Abstriche mit $6,3 \cdot 10^3$ Virus Kopien/ μ l VTM und Rachen-Abstriche mit $2,5 \cdot 10^3$ Virus Kopien/ μ l VTM deutlich geringere Viruslasten aufweisen Ngaosuwankul *et al.* (2010). Die für die Influenza A ermittelte Sensitivität in den simulierten Referenzproben kann mit einem Detektionslimit von 147,5 RNA-Kopien für beide Subtypen (Tabelle 15) nachweisen. Eventuelle Komplikationen könnten bei Patienten unter zwei Jahren auftreten, da die Viruslast nahe an der Detektionsgrenze liegt. Für eine sichere Detektion ist generell ein nasopharyngealer Abstrich zu empfehlen, da dieser die größte Viruslast aufweist und damit falsch negative Ergebnisse am ehesten vermieden werden können. Für Influenza B konnte in einer Studie von Alves *et al.* (2020) eine durchschnittliche Viruslast in allen Altersgruppen von rund $3,2 \cdot 10^3$ Virus Kopien/ μ l VTM festgestellt werden. Ausnahme bildeten dabei Patienten über 59 Jahren, da hier nur ein Datensatz verfügbar war und somit keine einheitliche Aussage getätigt werden konnte (Alves *et al.* 2020). Eine andere Studie von Tsou *et al.* (2012) untersuchte die Viruslast speziell bei Kindern und konnte im Durchschnitt sehr geringe Werte von 3,9 Virus Kopien/ μ l VTM feststellen. Jedoch wurden innerhalb dieser Studie große Schwankungen innerhalb der Viruslast festgestellt (zwischen 45 und $2 \cdot 10^6$ Virus Kopien/ml VTM) sowie eine negative Korrelation zwischen Viruslast und Zeitpunkt der Probenentnahme (Tsou *et al.* 2012).

Das ermittelte Detektionslimit für die Influenza B RT-RPA unter Verwendung der reinen, artifiziellen Standard RNA wäre mit 14,6 RNA-Kopien (Tabelle 13) in der Lage die meisten Patientenproben zu detektieren. Betrachtet man jedoch den starken Verlust der Sensitivität bei den Referenzproben mit genomicscher humarer Hintergrund DNA könnten mögliche falsch Negative gerade bei Kinderpatienten auftreten. Hier liegt das ermittelte Detektionslimit von 1397 RNA-Kopien (Tabelle 13) weit über der von Tsou *et al.* (2012) ermittelten Viruslast für das Influenza B Virus. Nach Alves *et al.* (2020) könnten zwar alle Patienten, inklusive der Patienten unter zwei Jahren, detektiert werden, jedoch befindet sich hier die Viruslast am Detektionslimit. Generell lässt sich sagen, dass die entwickelte Influenza B RT-RPA laut Literatur ein zu hohes Detektionslimit besitzt um zuverlässig Influenza B detektieren zu können. Um trotzdem eine eventuelle Detektion zu ermöglichen, sollte eine zeitnahe Proben Entnahme erfolgen, um so möglichst hohe Viruslasten zu erreichen (Tsou *et al.* 2012).

4.4 Entwicklung der asymmetrischen RT-RPA

Eine asymmetrische Erhöhung der reverse Primer-Konzentration bei einer gleichbleibenden Forward Primer-Konzentration führt zu einer erhöhten Fluoreszenz (Kapitel 3.1.5). Wie bereits beschrieben, sorgt die asymmetrische Verteilung der Primer vermutlich dazu, dass im Verlauf der Reaktion mehr einzelsträngige DNA in sense entsteht, wenn der reverse-Primer (antisense) in deutlich höheren Konzentration der Reaktion zur Verfügung steht. Der asymmetrische Ansatz innerhalb RPA wurde bereits von Wang *et al.* (2019) genutzt, um mittels eines enzymkatalysiertem Farbumschlags *Fusarium proliferatum* nachzuweisen (Wang *et al.* 2019). Kersting *et al.* (2014) kombinierte die asymmetrische RPA, um mit der entstandenen einzelsträngigen DNA ein Nachweis mittels Microarray durchzuführen (Kersting *et al.* 2014). Derzeit ist die Verwendung einer asymmetrischen Primerverteilung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sonden in der Literatur nur innerhalb der qPCR bekannt. So konnte Poddar (2000) mithilfe von „molecular beacon“ nachweisen, dass durch eine 50-fache Primerasymmetrie, die zur Sonde komplementäre DNA-Sequenz zusätzlich als einzelsträngige DNA in höheren Mengen vorliegt. Dadurch konnten die „molecular beacon“ häufiger hybridisieren und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen (Poddar 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte vermutlich, dass das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RPA mittels Exo-Sonden angewendet werden. Die Experimente mit der RT-RPA für Influenza B legen dies

nahe (Kapitel 3.1.5). So kann durch die asymmetrische Erhöhung des Revese-Primers eine höhere Fluoreszenzauslenkung beobachtet werden. Die Erhöhung des Forward Primers (sense) (Abbildung 15A) führte wieder zu einer aequimolaren, jedoch im Vergleich zur Standard-RPA erhöhten Primerkonzentration. Dadurch wurde vermutlich keine einzelsträngige sense DNA in der Reaktion gebildet und die Hybridisierungskinetik der Sonde wurde nicht erhöht. Dementsprechend ist auch ein Rückgang an Fluoreszenzsignal zu beobachten, da die Sonde zur Spaltung durch die Exonuklease ein Hybridisierungs-Event benötigt, welches nur noch während der Amplifikations-Reaktion der RPA stattfindet (Lobato & OSullivan 2018). In diesem Versuchsansatz muss jedoch noch zusätzlich die Reaktion der reversen Transkriptase betrachtet werden, da diese mit einer eigenen Enzymkinetik zur Bildung einer komplementären DNA bei einer sense RNA den antisense Primer für seine Reaktion nutzt. Bei dem *vice versa* Versuch den sense Primer betreffend (Abbildung 15B) trifft dies jedoch nicht zu. In dem weiteren Versuch konnte durch die Verwendung der antisense Sonde (Tabelle 8), welche komplementär zum antisense Strang ist, gezeigt werden, dass nun eine Fluoreszenzsignalerhöhung stattfindet, wenn der Forward primer asymmetrisch erhöht wird. Des Weiteren konnte ein schwächeres Fluoreszenzsignal beobachtet werden wenn eine reverse Primer-Asymmetrie vorhanden ist. Dementsprechend liegt vermutlich bei der Erhöhung des forward primers der komplementäre antisense Strang vermehrt und einzelsträngig vor, wodurch die Hybridisationskinetik der Sonde begünstigt wird und mehr Sonde bei erfolgreicher Hybridisation gespalten wird. Dabei sind die Ergebnisse der Fluoreszenzerhöhung bezüglich der Primerasymmetrie für die beiden Sonden umgekehrt. So führt bei der Sense-Sonde eine reverse Primer-Asymmetrie und bei der antisense Sonde eine forward Primer-Asymmetrie zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal. Daraus lässt sich Ableiten, dass die Hybridisierungsposition der Sonde (sense oder antisense) mit der Primerasymmetrie zusammenhängt.

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

4.5 Einfluss von Modifikationen der Exo-Sonde auf die RT-RPA

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

entwickelten Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* (2020) die *iQ*-Sonde, bei der das Quencher-Molekül an das Phosphat-Rückgrat der DNA gekoppelt wird (Abbildung 9) und somit die starke Abhängigkeit von der T-N-T Sequenz umgangen wird. Somit können Exo-Sonden variabler an die Zielsequenz angepasst werden (Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* 2020). In dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede innerhalb der Influenza A RT-RPA zwischen den beiden Sondentypen *iQ*-Sonde und *dT-Quenched*-Sonde ermittelt werden (Kapitel 3.2.8). So führt die *dT-Quenched*-Sonde im Vergleich zu der *iQ*-Sonde zu einer Sensitivitäts-erhöhung von 50 % für beide Subtypen sowie ein erhöhte Fluoreszenzauslenkung. Des Weiteren besitzt die *iQ*-Sonde nach der normalisierung der Daten ein niedriges Hintergrundrauschen um den Wert 0, während die *iQ*-Sonde ein stetiges Hintergrundrauschen um die 50 Fluoreszenzeinheiten zeigte. Das unspezifische Hintergrundrauschen der *iQ*-Sonde ist dabei bei allen durchgeführten RT-RPA's in dieser Arbeit zu beobachten. Eine weitere Versuchsreihe mit der Influenza B RT-RPA war durch die speziellen Sequenz-Anforderungen der *dT-Quenched*-Sonde nicht durchführbar.

Eine mögliche Hypothese für die höhere Fluoreszenzauslenkung und der Sensitivität der *dT-Quenched*-Sonde könnte im Zusammenhang mit der verwendeten Primer-Asymmetrie liegen. Durch die eingeführte Primer-Asymmetrie liegt der zur Sonde komplementäre DNA-Strang einzelsträngig vor (Kersting *et al.* 2014). Dementsprechend könnte die Sonde unabhängig von der Strangverdrängungsaktivität der Polymerase hybridisieren und im hybridisierten Zustand von der Exonuklease gespalten werden (Lobato & OSullivan 2018). Nach der Spaltung würde keine Verdrängung durch die Polymerase stattfinden und die Sonden-Fragmente müssen sich durch Diffusion voneinander trennen. Durch den dT gekoppelten Quencher könnte im hybridisierten Zustand der Sonde eine sterische Abstoßung zwischen Quencher, Fluorophor und gegenüberliegender A Base bestehen. Bei der Spaltung der Sonde könnte diese sterische Abstoßung für eine bessere Diffusion des Quenchers von dem Fluorophor sorgen was möglicherweise zu einem erhöhtem Signal und zu einer besseren Detektion führt. Laut dieser Hypothese würde bei der von Behrmann, Bachmann, Spiegel, *et al.* (2020) entwickelten *iQ*-Sonde keine solche Abstoßung vorliegen, da der Quencher über das Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA gekoppelt ist und somit eventuell außerhalb der Doppelhelix liegt. Betrachtet man die mittlere Schmelztemperatur (Tm) des Quencher-Fragments der Influenza A Sonde (Sonde E, Tabelle 9) liegt diese bei 53 °C (berechnet mittels Promega Tm-Rechner¹³). Dementsprechend würde nach der Spaltung der Sonde die Diffusion des Quencher-Fragments ohne weitere Abstoßungseffekte bei der gewählten Reaktionstemperatur von 42 °C geringer sein.

Das beobachtete geringere Signal-Rauschen der Wasserkontrolle der dT-Quenched Sonde lässt sich vermutlich auf den erhöhten Abstand zwischen Fluorophor und Quencher zurückführen. Wie in der von Förster (1948) entwickelten Formel zu sehen, ist die Energie-Übertragungsrate (F_{kl}) von der Fluoreszenzabklingzeit (τ_0), dem Förster-Radius (R_0) und dem Abstand zwischen Fluorophor und Quencher (R_{kl}) abhängig (siehe Formel (7)). R_0 ist dabei für verschiedene Fluorophorpaare unterschiedlich und wird zur Vereinfachung $R_0 = 1$ gesetzt (Förster 1948). Dadurch wird die sehr starke Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Fluorophor und Quencher verdeutlicht. Dementsprechend können kleine Veränderungen des Abstandes zu einem deutlich schlechteren Energietransfer, also zu einem schlechteren Fluoreszenz-Quenching führen. Da die *dT-Quenched* Sonde durch die dT-Kopplung von Fluorophor und Quencher beide Moleküle näher zusammenbringt als es bei der *internally quenched* Sonde der Fall ist, findet demnach eine besseres Quenching des Fluoreszenzsignals statt. Dieses drückt sich in dem in Abbildung 25 beobachteten geringeren Hintergrund-Signal aus.

¹³<https://www.promega.de/resources/tools/biomath/tm-calculator/>

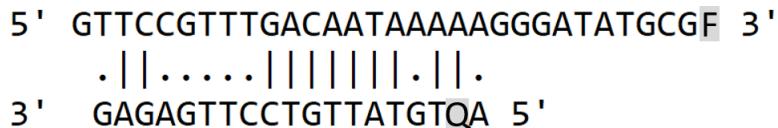
$$F_{kl} = \frac{R_0^6}{\tau_0 * R_{kl}^6} \quad \text{mit} \quad R_0 = 1 \quad F_{kl} = \frac{1}{\tau_0 * R_{kl}^6} \quad (7)$$

4.6 Der “Ditching”-Effekt innerhalb der RT-RPA

Die spontane Abnahme des Fluoreszenzsignals ab im späteren Verlauf der Messung konnte an mehreren Stellen dieser Arbeit beobachtet werden (Abbildungen 14, 17B, 15A, 18B, 22B). Dabei scheint dieses Phänomen speziell innerhalb der RPA aufzutreten und wurde, laut aktueller Literaturlage, weder bei der PCR noch innerhalb anderen isothermen Amplifikationen (LAMP, NASBA etc.) beobachtet. Lutz *et al.* (2010) beschrieben dieses Phänomen innerhalb der RPA als Ditching, lieferten jedoch keine weiteren Erklärungen zu dem Sachverhalt (Lutz *et al.* 2010). Das Ditching scheint dem theoretisch ablaufendem Reaktionsverlauf zu widersprechen. Durch die exponentielle Spaltung der Fluoreszenzsonden werden immer mehr Quencher-Fragmente von den Fluorophor-Fragmenten räumlich voneinander getrennt werden und somit (exponentiell) mehr Fluoreszenz-Signal detektierbar ist. Nach einiger Zeit sind wichtige Substrate verbraucht, die Reaktion kommt zum Erliegen und das Fluoreszenz-Signal erreicht ein Plateau (Moody *et al.* 2016). Beim Ditching hingegen scheint sich das Fluoreszenz-Signal sogar zu verringern, d.h. die Fluoreszenz sinkt unterhalb des Levels der zuvor gemessenen Intensität, und steigt nach kurzer Zeit darauf wieder an.

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

Andererseits könnte eine Hybridisierung des Fluorophor-Fragmentes mit dem Quencher-Fragmente der Sonde erfolgen (Abbildung 27), welche das Fluorophor-Molekül mit dem Quencher-Molekül wieder in räumliche Nähe bringt. Jedoch besitzt dieses Dimer eine Bindungsenergie (ΔG) von nur -2,48 kcal/mol bei 37 °C und ist demnach bei 40 °C nicht sonderlich stabil (Abbildung 27). Des Weiteren liegen Quencher und Fluorophor innerhalb des Dimers etliche Nukleotide voneinander entfernt, welches die Energie-Übertragungsrate durch die Entfernung verringert und somit das Quenching erschwert. Eine weitere Eigenart liegt in der erneuten Steigung der Fluoreszenz. Dies könnte bedeuten, dass die Zusammenlagerung von Quencher und Fluorophor reversibel und zeitabhängig, für nur einen kurzen Zeitraum stattfindet. Des Weiteren wurde das Ditching innerhalb der Variation der Reaktionsparameter nur bei den höheren Temperaturen, einer höheren Primerasymmetrie und den als optimal ermittelten Mischschritt beobachtet (Kapitel 3.1.4, 3.1.6 und 3.1.7). Wie in Kapitel 4.4 erklärt, führt die Primerasymmetrie dazu, dass mehr Sonde gespalten wird. Ähnlich wie bei der Primerasymmetrie sorgt eine höhere Temperatur, durch die verbesserte Enzymkinetik (Jaeger *et al.* (Anon. 2018)) vermutlich zu einer schnelleren Amplifikation und somit zu einer erhöhten Spaltung der Sonde. Der zusätzliche Mischschritt beschleunigt durch die Homogenisierung ebenfalls die Reaktion und führt wie die anderen Parameter zu einer schnelleren Sondenspaltung. Dementsprechend könnte es einen Zusammenhang zwischen der Menge der gespaltenen Sonde und dem Ditching geben.



ΔG 37°C -2,48 kcal/mol

Abbildung 27: **Hybridisation der Influenza B Sonden-Fragmente:** Hydes Fluorophor-Fragmentes mit dem Quencher-Fragment der Influenza B *iQ*-Sonde. Die Bindungsenergie (ΔG) bei 37 °C wurde mit dem Programm PerlPrimer ([Marshall 2004](#)) berechnet. Fluorophor (F) und Quencher (Q) sind grau hinterlegt.

4.7 Automatische Auswertung der Amplifikationen mittels Statistik

Anahnd des Untersuchung der Primer und Sonden-Kandidaten für die Influenza A RT-RPA (Abbildung 20) und der Influenza B RT-RPA Mischschritt-Optimierung (Abbildung 17C) konnte aufgezeigt werden, dass die manuelle Einschätzung, ob Amplifikationen qualitativ positiv bzw. negativ sind, schwierig ist. Dies kann zu Komplikationen führen, da je nach Anwender Grenzfälle ein bzw. ausgeschlossen werden und somit falsch positive und falsch negative Testergebnisse entstehen. Eine automatisierte statistische Auswertung soll die Anwendung unterstützen und für einheitliche Ergebnisse sorgen. Innerhalb der qPCR und RPA (quelle) wird dafür zumeist ein Schwellenwert verwendet, wobei Reaktionen als positiv gelten, wenn sie diesen Schwellenwert überschreiten ([Bustin et al. 2009](#)). Jedoch hängt diese Auswertungsmethode stark von der Wahl des Schwellenwerts ab, welcher je nach verwendetem Gerät und Hersteller anders berechnet bzw. bestimmt wird ([Waidi Folorusno Sule 2020](#)). Zusätzlich kann die Fluoreszenzkurve einer Amplifikation von weiteren Zufallsfaktoren wie beispielsweise verschiedenen starke Fluorophore oder Sensorfehlern beeinflusst werden ([Spiess et al. 2015](#)). Dies kann dazu führen, dass starke Veränderungen des Schwellenwertes entstehen und aufgrund dessen je nach Gerät und Test unterschiedliche Ergebnisse entstehen und keine Vergleichbarkeit der Daten untereinander gegeben ist. In dieser Arbeit wurde dazu eine automatische Auswertung der Fluoreszenzdaten mit weiteren statistischen Tests, unabhängig vom Schwellenwert ergänzt und damit eine einheitliche, vergleichbare und nachvollziehbare Auswertung ermöglicht. Dazu wurde das chipPCR package von Rödiger *et al.* ([2015](#)) verwendet, dass ursprünglich für eine qPCR entwickelt wurde, jedoch auch für isotherme Amplifikationen beschrieben wurde ([Rödiger et al. 2015](#)). Eine Anwendungslimitierung wurde Moody *et al.* ([2016](#)) festgestellt, die bewiesen, dass sich die Kinetik der RPA von der der PCR unterscheidet ([Moody et al. 2016](#)). Demnach ist die Kinetik der Fluoreszenzgenerierung ebenfalls unterschiedlich zur PCR und die mathematischen Modelle, angepasst auf die PCR, lassen sich nur bedingt auf die RPA adaptieren. So konnte die Berechnung des Hintergrundrauschens nicht mit dem chipPCR package durchgeführt werden, da der zeitigere Anstieg der RPA bei hohen Template-Konzentrationen dazu führte, dass das Hintergrundrauschen zu hoch berechnet wurde und über der maximalen Fluoreszenzauslenkung lag. Deshalb wurde die Methode von Ritz & Spiess ([2008](#)) als Alternative verwendet. Der im chipPCR package enthaltene *lineare Regressions-Test*, welcher viele lineare Regressionen über die jeweilige Amplifikationskurve spannt und diese auswertet, lieferte fehlerhafte Ergebnisse und konnte deshalb hier nicht verwendet. Für die Berechnung eines geeigneten Schwellenwertes wurde auf eine Methode aus dem Immuno-Assay-Bereich von Frey *et al.* ([1998](#)) zurückgegriffen, da sie die gesamten Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle zur Berechnung benutzt und somit das in Kapitel 4.5 beschriebene steigende Hintergrundsignal der *iQ*-Sonde mit einberechnet ([Frey et al. 1998](#)).

5 Zusammenfassung und Ausblick

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

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

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

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

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

6 Anhang

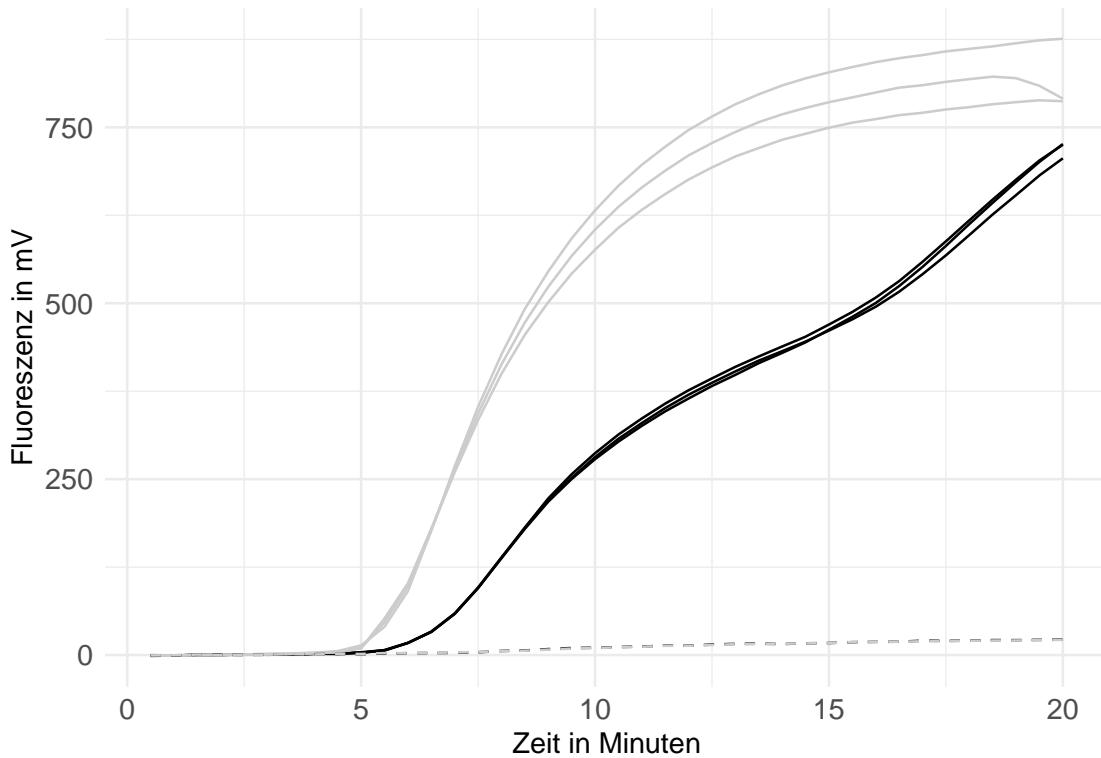


Abbildung 28: **Einfluss eines Mischschrittes nach 5 min auf die Influenza B 50 μ l RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 50 μ l Ansatz mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min (grau) und ohne zusätzliches Mischen (schwarz). Die Messung erfolgte bei 40 °C. Als Ausgangsmaterial wurden 10^4 RNA-Kopien eingesetzt. Negativkontrollen sind mit (---) gekennzeichnet.

Tabelle 17: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 12

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 18: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 13

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
50 μ l RPA	n=3	$3,36 \pm 0,01$	p = 0,20		p = 0,008	p = 0,11 ns
8 μ l 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 19: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 14

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
38 °C	n=5	$5,26 \pm 0,06$	p = 0,93		
40 °C	n=6	$3,57 \pm 0,20$	p = 0,44	p = 0,10	p = $2,89 \cdot 10^{-10}$
42 °C	n=6	$3,63 \pm 0,13$	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 = $6,29 \cdot 10^{-10}$	s ***
38 °C	42 °C	-1,89	-1,38	p = $9,13 \cdot 10^{-10}$	s ***
40 °C	42 °C	-0,18	0,28	p = 0,81	ns

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

Tabelle 20: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 16

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

Notiz: ns = nicht signifikant; s = signifikant

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

Tabelle 21: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 17A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referez	n=5	6,00 \pm 0,15	p = 0,13		
Mischen (3 min)	n=6	5,13 \pm 0,21	p = 0,15	p = 0,21	p = 2 *10 ⁻³
Mischen (4 min)	n=5	5,11 \pm 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

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

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
Referenz	n=7	7,35 \pm 0,58	p= 0,59	p= 0,25	p= 0,005	s**
Mischen (5 min)	n=7	6,53 \pm 0,25	P= 0,29			

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 20

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Forward E	n=3	3,17 \pm 0,12	p = 0,84		
Forward E.2	n=3	3,23 \pm 0,02	p = 0,69	p = 0,22	p = 0,35 (ns)
Forward E.3	n=3	3,14 \pm 0,04	p = 0,87		

Notiz: ns = nicht signifikant; s = signifikant

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

Tabelle 24: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 21

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
50 μ l RT-RPA	n=3	4,19 \pm 0,43	p = 0,99	p = 0,26	p = 0,006	s**
8 μ l RT-RPA	n=6	3,17 \pm 0,12	p = 0,90			

Notiz: ns = nicht signifikant; s = signifikant

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

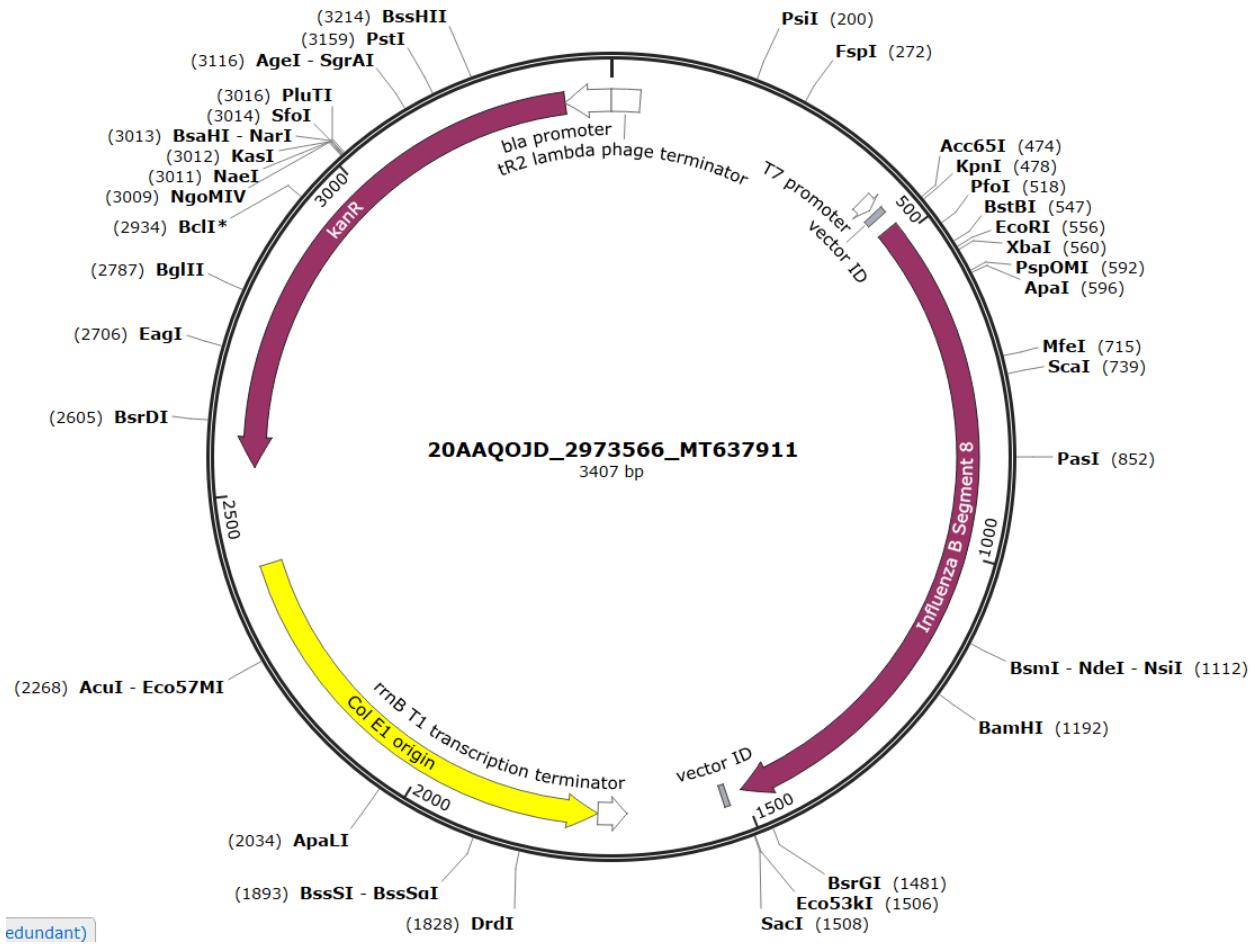


Abbildung 29: Plasmidkarte des Influenza B Plasmides für den Influenza B RNA-Standard

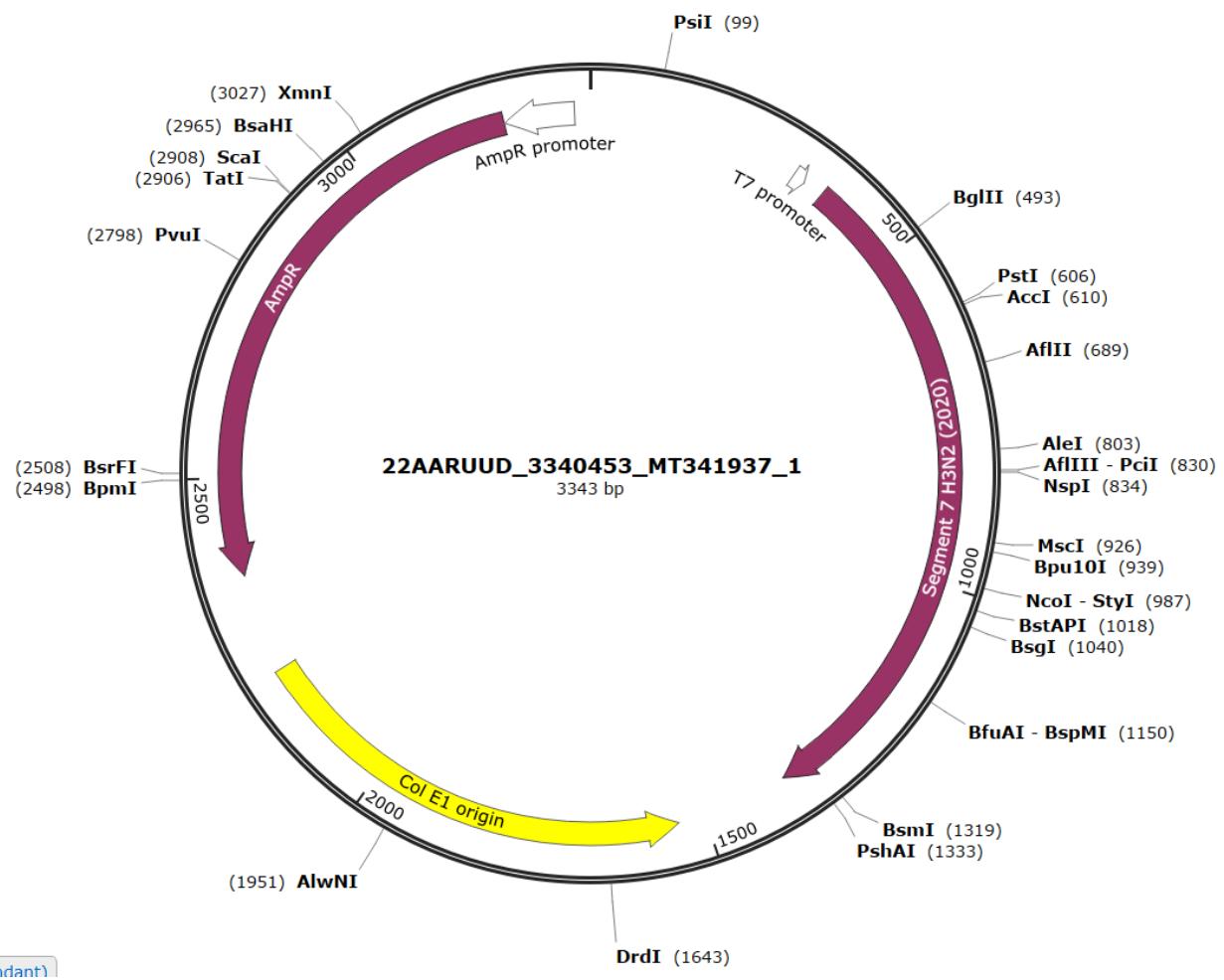


Abbildung 30: Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard

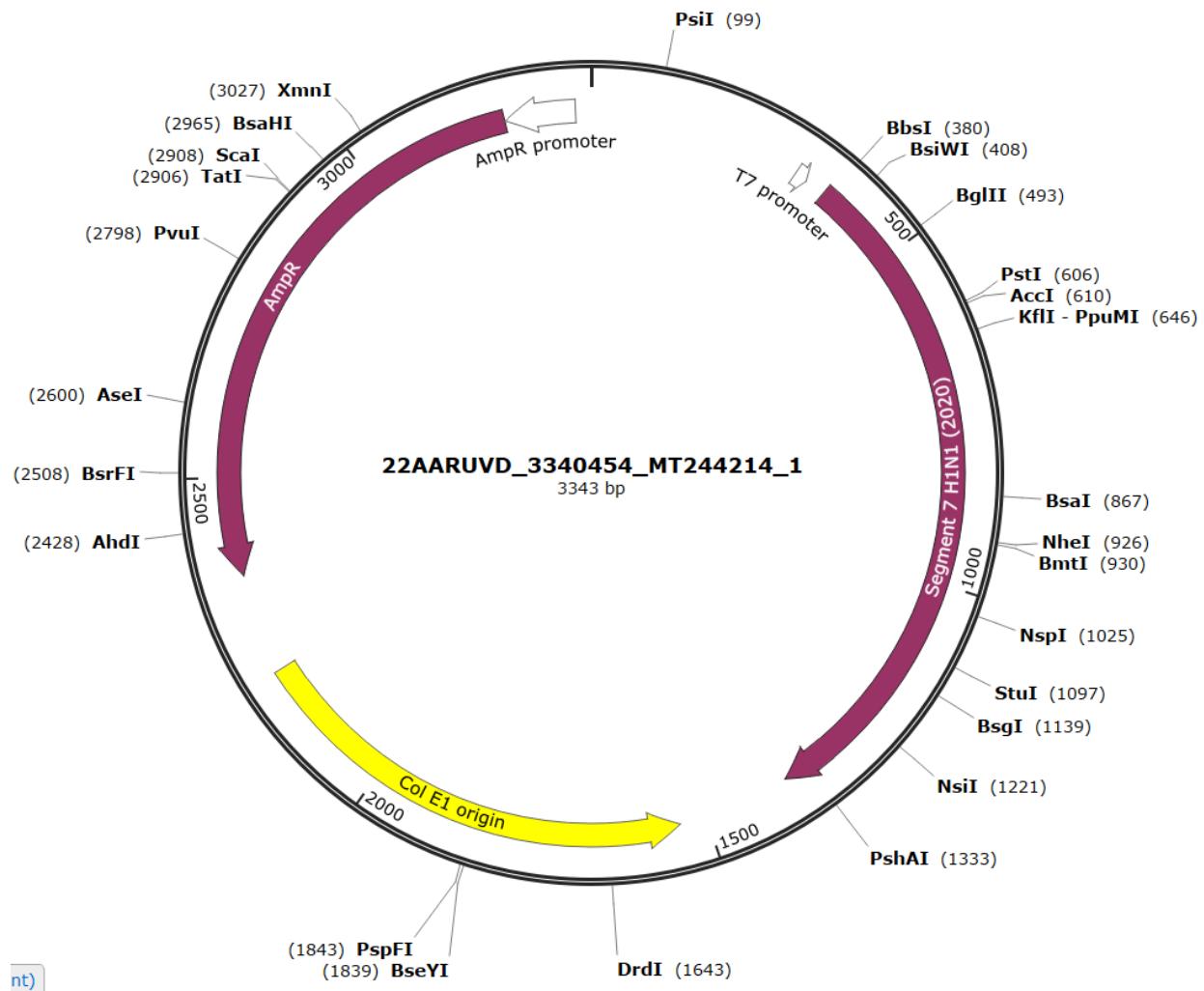


Abbildung 31: Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard

Tabelle 25: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 22A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
42 °C	n=3	3,69 ± 0,11	p = 0,65		
40 °C	n=3	4,28 ± 0,12	p = 0,43	p = 0,98	p = 8*10 ⁻⁵
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 26: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 23

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referenz	n=3	9,05 ± 0,57	p = 0,32		
5 min	n=3	15,04 ± 1,53	p = 0,70		
3 min	n=3	8,00 ± 0,73	p = 0,80	p = 0,55	p = 1,8*10 ⁻⁵
2 min	n=3	7,77 ± 0,34	p = 0,49		
90 sek	n=3	10,16 ± 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 27: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 25

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-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
dT-Quenched	n=3	$4,53 \pm 0,05$	p = 0,97			s**

Notiz: ns = nicht signifikant; s = signifikant

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

Tabelle 28: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 15A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-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
2X rev.	n=7	$3,48 \pm 0,21$	P= 0,36			ns

Notiz: ns = nicht signifikant; s = signifikant

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

Tabelle 29: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 15B

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Forward E	n=3	$3,56 \pm 0,07$	p = 0,91		
Forward E.2	n=3	$3,65 \pm 0,14$	p = 0,79		p = 0,04
Forward E.3	n=3	$3,25 \pm 0,05$	p = 0,55		$p = 5 * 10^{-5}$
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

Tabelle 30: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 28

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapiro-Wilk-Test	Levene-Test	T-Test	Aussage
Mischen nach 5 min	n=3	$5,21 \pm 0,03$	p = 0,96		p = 0,14	$p = 2,7 * 10^{-7}$
ohne Mischen	n=3	$6,48 \pm 0,01$	p = 0,99			s***

Notiz: ns = nicht signifikant; s = signifikant

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

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand als Ergebnis meiner Tätigkeit am Institut für Mikrobiologie und Virologie an der MHB Theodor Fontane.

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, welche mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, sowie Prof. Dr. med Frank T. Hufert welcher mir die Möglichkeit gab unter seiner Leitung am Institut zu Arbeiten.

Ein besonderer Dank geht dabei an meinen Zweitbetreuer Dr. Gregory Dame, welche mich nicht nur während der Laborarbeit, sondern auch während des Schreibens unterstützt, ermutigt und angespornt hat. Unter seiner Betreuung konnte ich lehrreiche Einblicke in die Virologie und Molekularbiologie bekommen. Die wissenschaftlichen Diskussionen bereiteten mir Freude und halfen mir neue Ansätze und Ideen zu finden. Seine Erfahrung weiß ich sehr zu schätzen.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Iris Bachmann, welche mir immer beratend zur Seite stand. Als Kollegin und Mitarbeiterin unterstützte und ermutigte sie mich in der Erstellung der Arbeit. Ihre Erfahrung half mir mich stetig zu verbessern.

Ein weiterer Dank geht an Tim Brauckhoff, welcher mich als Freund und Kollege unterstützte, sowie Benedikt Beilstein, Chris Freydank, Tim Stübner und Christian Neubert. Ohne Euch wäre die Laborarbeit deutlich monotoner. Eure gute Laune und Witze munterten mich auf und halfen mir durch manche schwere Wochen.

Ein besonderer Dank geht an Sophie Eisenächer, welche als mentale Stütze mich beruhigte und mich immer ermutigte. Ihre Geduld und Ruhe halfen mir durchzuhalten.

Mein Dank geht auch an alle weiteren Mitarbeiter aus dem Institut, welche mich freundlich aufgenommen haben und bei Fragen immer zu Seite standen. Ein besonderer Dank geht auch an meiner Familie und Freunde die mich in dieser Zeit geholfen und unterstützt haben.

Literaturverzeichniss

- Alberts B., Johnson A.D., Lewis J., Morgan D. & Raff M. 2017. *Molekularbiologie der zelle*. Wiley-VCH GmbH.
- Ali S.S. 2012. *Bacterial strain improvement by mutagenesis*. Lambert Academic publishers.
- Alves V.R.G., Perosa A.H., Souza Luna L.K. de, Cruz J.S., Conte D.D. & Bellei N. 2020. Influenza a(H1N1)pdm09 infection and viral load analysis in patients with different clinical presentations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200009>
- 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 recombinase 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 recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (exo-IQ). *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–1054. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>
- Behrmann O., Hügle M., Eckardt F., Bachmann I., Heller C., Schramm M., Turner C., Hufert F. & Dame G. 2020. 3D printed monolithic microreactors for real-time detection of klebsiella pneumoniae and the resistance gene blaNDM-1 by recombinase polymerase amplification. *Micromachines* 11 (6): 595. <https://doi.org/10.3390/mi11060595>

- 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.
- Boonbanjong P., Treerattrakoon K., Waiwinya W., Pitikultham P. & Japrung D. 2022. Isothermal amplification technology for disease diagnosis. *Biosensors* 12 (9): 677. <https://doi.org/10.3390/bios12090677>
- Boyle D.S., Lehman D.A., Lillis L., Peterson D., Singhal M., Armes N., Parker M., Piepenburg O. & Overbaugh J. 2013. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>
- 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>
- Chauhan R.P. & Gordon M.L. 2022. An overview of influenza a virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes* 58 (4): 255–269. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01904-w>
- 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>
- Clark D.P. & Pazdernik N.J. 2009. *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- 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.cytogf.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 erreger 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>
- Förster Th. 1948. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437 (1-2): 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
- Frey A., Canzio J.D. & Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 221 (1-2): 35–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7)
- 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.
- Glöckler 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>

- Guo M., Feng P., Zhang L., Feng C., Fu J., Pu X. & Liu F. 2022. Rapid detection of *< i>clostridium tetani* by recombinase polymerase amplification using an exo probe. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (1): 91–98. <https://doi.org/10.4014/jmb.2109.09022>
- 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., Duceatz 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., Gröneng 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. & Mustaquin 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 *< i>mycobacterium tuberculosis</i>* complex, *< i>m. Avium</i>*, and *< i>m. Intracellulare</i>* in sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2616–2622. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>
- Jaeger K.-E., Liese A. & Syldatk C. (eds)Anon. 2018. *Einführung in die enzymtechnologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- 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., Efthathiou 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>
- Johansson M.K. & Cook R.M. 2003. Intramolecular dimers: A new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry - A European Journal* 9 (15): 3466–3471. <https://doi.org/10.1002/chem.200304941>
- 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>
- Kersting S., Rausch V., Bier F.F. & Nickisch-Rosenegk M. von 2014. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Microchimica Acta* 181 (13-14): 1715–1723. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1198-5>
- 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.
- 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>
- Lin X., Liu X.-Y., Zhang B., Qin A.-Q., Hui K.-M., Shi K., Liu Y., Gabriel D. & Li X.J. 2022. A rapid influenza diagnostic test based on detection of viral neuraminidase activity. *Scientific Reports* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04538-4>
- 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/117730491>
- Marshall O.J. 2004. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20 (15): 2471–2472. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>
- Matsuoka Y., Matsumae H., Katoh M., Eisfeld A.J., Neumann G., Hase T., Ghosh S., Shoemaker J.E., Lopes T.J., Watanabe T., Watanabe S., Fukuyama S., Kitano H. & Kawaoka Y. 2013. A comprehensive map of the influenza a virus replication cycle. *BMC Systems Biology* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-97>
- McCauley J.W. & Mahy B.W.J. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochemical Journal* 211 (2): 281–294. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>
- Modrow S., Falke D., Truyen U. & Schätzl H. 2010. *Molekulare virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moody C., Newell H. & Viljoen H. 2016. A mathematical model of recombinase polymerase amplification under continuously stirred conditions. *Biochemical Engineering Journal* 112: 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.017>
- 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., Falooma 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.). *Research use only CDC flu SC2 multiplex assay primers and probes*.
- Ngaosuwankul N., Noisumdaeng P., Komolsiri P., Pooruk P., Chokephaibulkit K., Chotpitayasunondh T., Sangsajja C., Chuchottaworn C., Farrar J. & Puthavathana P. 2010. Influenza a viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virology Journal* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/1743-422x-7-75>
- Ni M., Xu H., Luo J., Liu W. & Zhou D. 2021. Simultaneous detection and differentiation of SARS-CoV-2, influenza a virus and influenza b virus by one-step quadruplex real-time RT-PCR in patients with clinical manifestations. *International Journal of Infectious Diseases* 103: 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.027>
- 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., Ermetal 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>
- Poddar S. 2000. Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus. *Molecular and Cellular Probes* 14 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0278>
- Powell M.L., Bowler F.R., Martinez A.J., Greenwood C.J., Armes N. & Piepenburg O. 2018. New fpg probe chemistry for direct detection of recombinase polymerase amplification on lateral flow strips. *Analytical Biochemistry* 543: 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.003>
- 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)
- PREMIER B. 2023. NASBA technology. *online Verfügbar unter: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html*
- 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 2020. *QIAamp® viral RNA mini handbook. For purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids, and culture supernatants.*
- QIAGEN 2021. QIAGEN® PlasmidPurification handbook. *QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega, andGiga 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., Friese 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>
- Ruiz-Villalba A., Pelt-Verkuil E. van, Gunst Q.D., Ruijter J.M. & Hoff M.J. van den 2017. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification* 14: 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>
- Saah A.J. 1997. “Sensitivity” and “specificity” reconsidered: The meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Annals of Internal Medicine* 126 (1): 91. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-126-1-199701010-00026>
- 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>
- 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. Humania 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>
- Spiess A.-N., Deutschmann C., Burdukiewicz M., Himmelreich R., Klat K., Schierack P. & Rödiger S. 2015. Impact of smoothing on parameter estimation in quantitative DNA amplification experiments. *Clinical Chemistry* 61 (2): 379–388. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230656>
- 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., Amongsin 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.2008.101>

- Tsou T.-P., Shao P.-L., Lu C.-Y., Chang L.-Y., Kao C.-L., Lee P.-I., Yang P.-C., Lee C.-Y. & Huang L.-M. 2012. Viral load and clinical features in children infected with seasonal influenza b in 2006/2007. *Journal of the Formosan Medical Association* 111 (2): 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2010.10.001>
- TwistDx 2018. TwistAmp assay desing manual. *online* Verfügbar unter: <https://www.twistdx.co.uk/support/manuals-and-software/twistamp/twistamp-assay-design-manual-v2-5/>.
- 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 influenzaa. *Clinical Infectious Diseases* 68 (6): e1–e47. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy866>
- 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>
- Vodeiko G.M., McInnis J., Chizhikov V. & Levandowski R.A. 2003. Genetic and phenotypic analysis of reassortants of high growth and low growth strains of influenza b virus. *Vaccine* 21 (25-26): 3867–3874. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00312-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00312-8)
- Wagenknecht H.-A. 2008. <I>fluorescent DNA base modifications and substitutes: Multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept</i>. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1130 (1): 122–130. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.001>
- Waldi Folorusno Sule D.O.O. 2020. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: Challenges and prospects. *The Pan African Medical Journal*. <https://doi.org/10.11604/pamj.supp.2020.35.24258>
- Wang Y., Li X., Xi D. & Wang X. 2019. Visual detection of <i>fusarium proliferatum</i> based on asymmetric recombinase polymerase amplification and hemin/g-quadruplex DNAzyme. *RSC Advances* 9 (64): 37144–37147. <https://doi.org/10.1039/c9ra05709a>
- Wei S. & To S.S.T. 2003. Influence of RNA secondary structure on HEV gene amplification using reverse-transcription and nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology* 27 (2): 152–161. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00170-1](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00170-1)
- WELCH B.L. 1947. THE GENERALIZATION OF ‘STUDENT’s’ PROBLEM WHEN SEVERAL DIFFERENT POPULATION VARLANCES ARE INVOLVED. *Biometrika* 34 (1-2): 28–35. <https://doi.org/10.1093/biomet/34.1-2.28>

- 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. Kempińska-Miroslawska B 2014. *Detection of the influenza virus yesterday and now. Acta Biochimica Polonica*. 61(3): 465–470.
- Wu C., Cheng X., He J., Lv X., Wang J., Deng R., Long Q. & Wang X. 2008. A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types a and b and subtypes H5 and N1. *Journal of Virological Methods* 148 (1-2): 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023>
- 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>
- Yi H., Kim Y.-H., Kim J.-S., Lee N.-J., Shin K., Choi J.-H., Kwon D., Lee J.-Y. & Kang C. 2013. Impact of influenza virus escape-mutations on influenza detection by the rapid influenza diagnostic test. *Journal of Medical Virology* 85 (4): 709–715. <https://doi.org/10.1002/jmv.23484>
- 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>