

# Bachelorarbeit

Julius Rublack

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

24.04.2023

# Das Influenza Virus

## Übersicht

**Geschätzte jährliche Hospitalisierungen:**  
**3 - 5 Millionen**

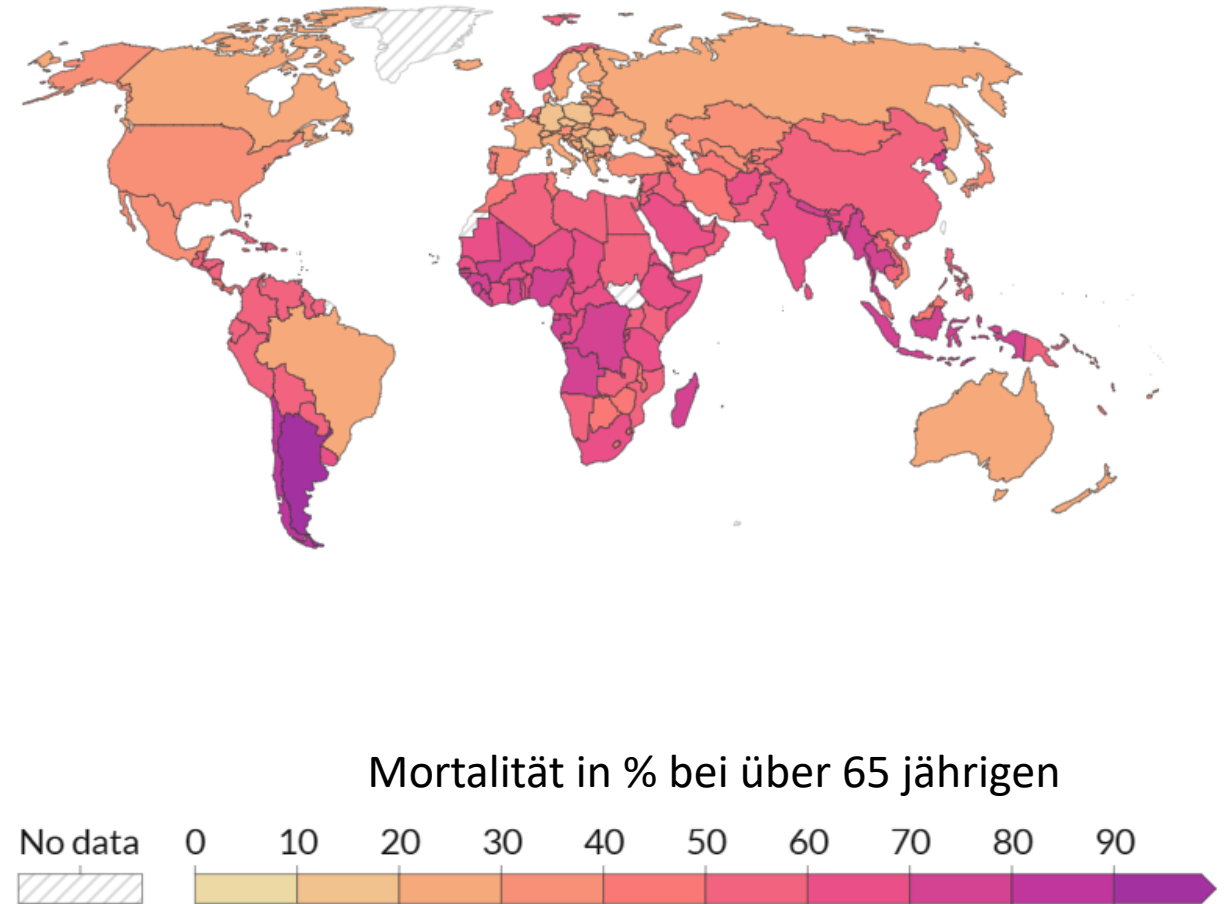
**Geschätzte jährliche Todeszahlen:**  
**250.000 – 650.000**

# Das Influenza Virus

## Übersicht

**Geschätzte jährliche Hospitalisierungen:  
3 - 5 Millionen**

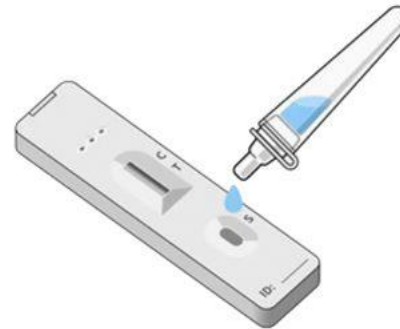
**Geschätzte jährliche Todeszahlen:  
250.000 – 650.000**



# Patientennahe Detektion

## Das „Point-of-Care testing“ (POCT)

### Protein basierte Testmethoden (lateral flow)



Bildquelle: <https://falkirkhscp.org/>

- Ergebnis in 15-20 Minuten
- Kostengünstig und vielseitig
- **Sensitivitäten von 70 % aufwärts**
- **Anfällig für Mutationen oder neue Subtypen**

### Nukleinsäure basierter Nachweis (RPA)



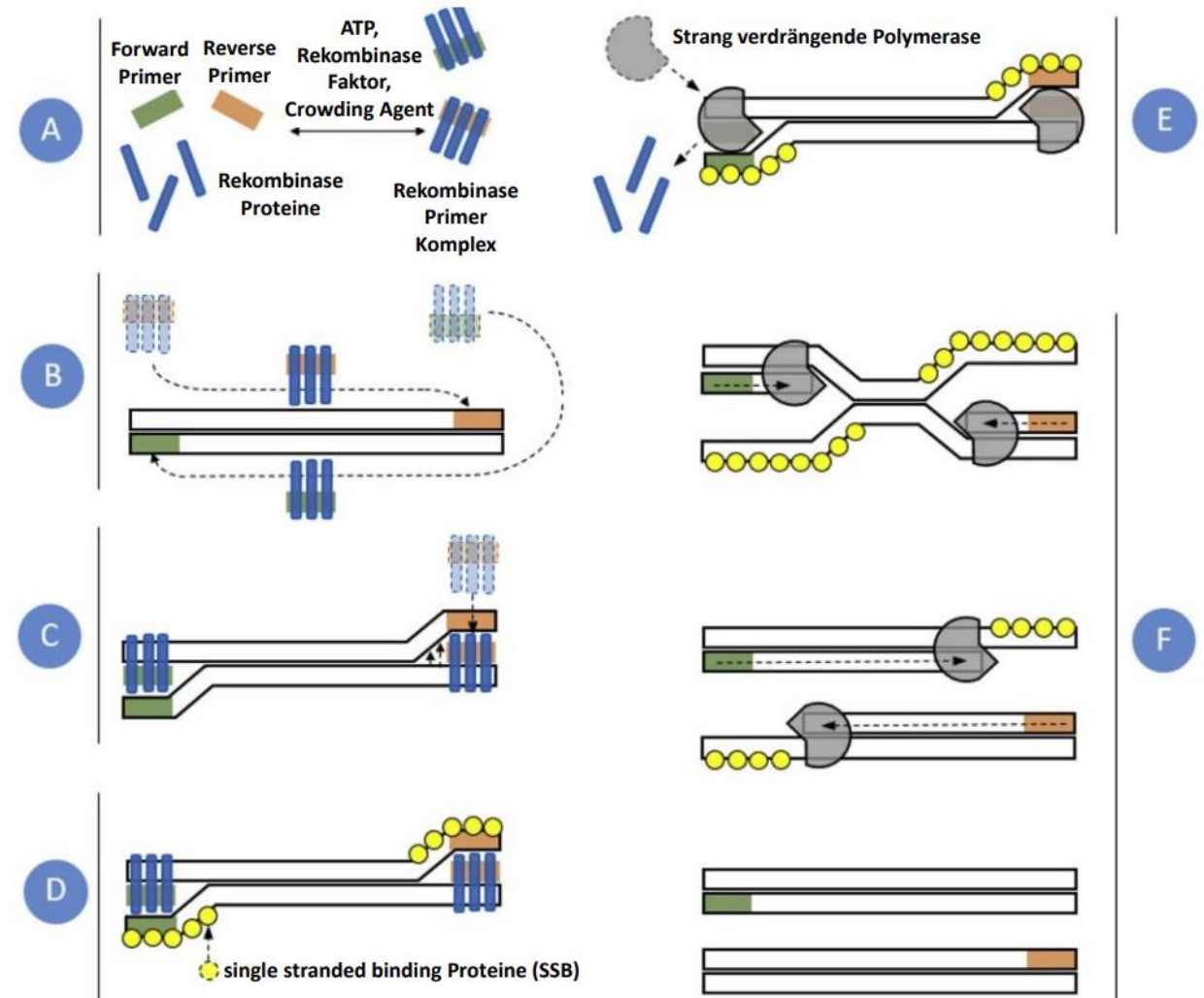
- Ergebnis in 20 Minuten
- Vielseitig und Robust
- **Hoch Sensitiv durch Nukleinsäure Amplifikation**
- **Konservierte Genabschnitte können über viele Subtypen hinweg detektieren**

Bildquelle: <https://rebopharm24.de/>

# Die RPA

## Rekombinase Polymerase Amplifikation

- Isothermes Amplifikationssystem
  - Amplifikation bei konstanten 38-42 °C
- Primer-Bindung basiert auf dem Rekombinase-Mechanismus des T4-Bakteriophagen
- Enzymatische Spaltung des DNA-Doppelstrangs statt thermische Denaturierung bei 95 °C
- „Crowding Agent“ führt zu einer viskosen Reaktionslösung
  - Zusätzliches Mischen während der Reaktion um der Viskosität entgegen zu wirken

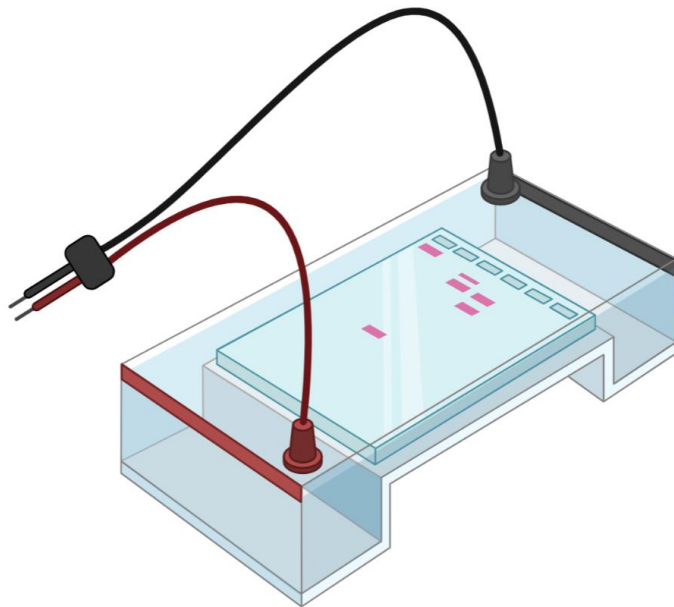


# Die RPA

## Detektion der Reaktion

### Endpunkt-Detektion

Auswertung über Gel-Elektrophorese nach der abgeschlossenen Reaktion

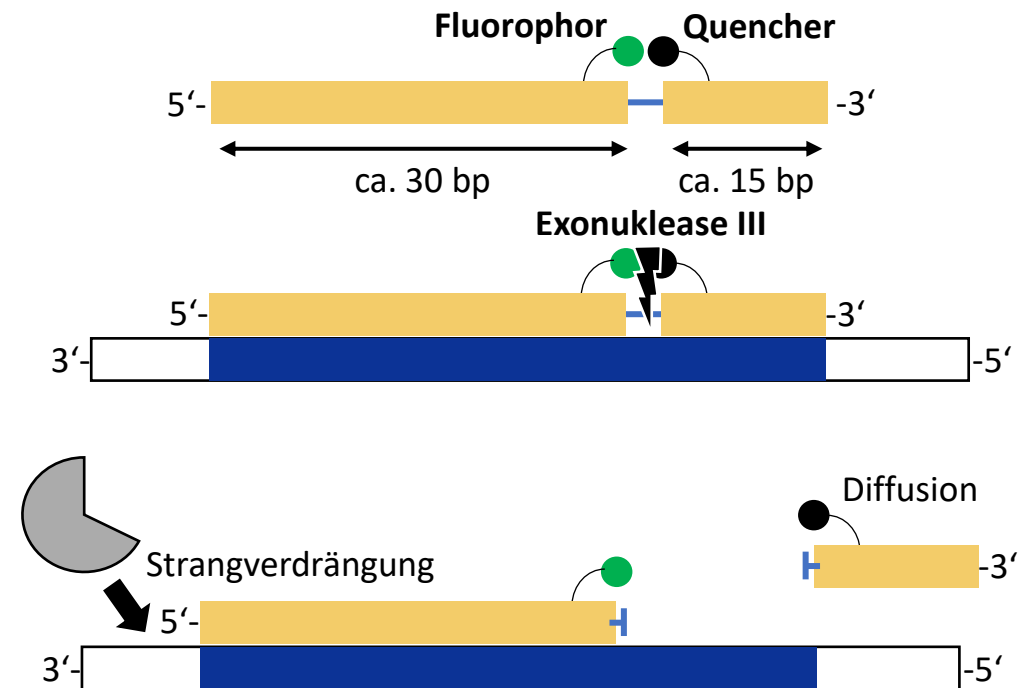


Bildquelle: <https://www.biorender.com>

### Echtzeit-Detektion

Zugabe von Fluoreszenz-Sonden während der Reaktion

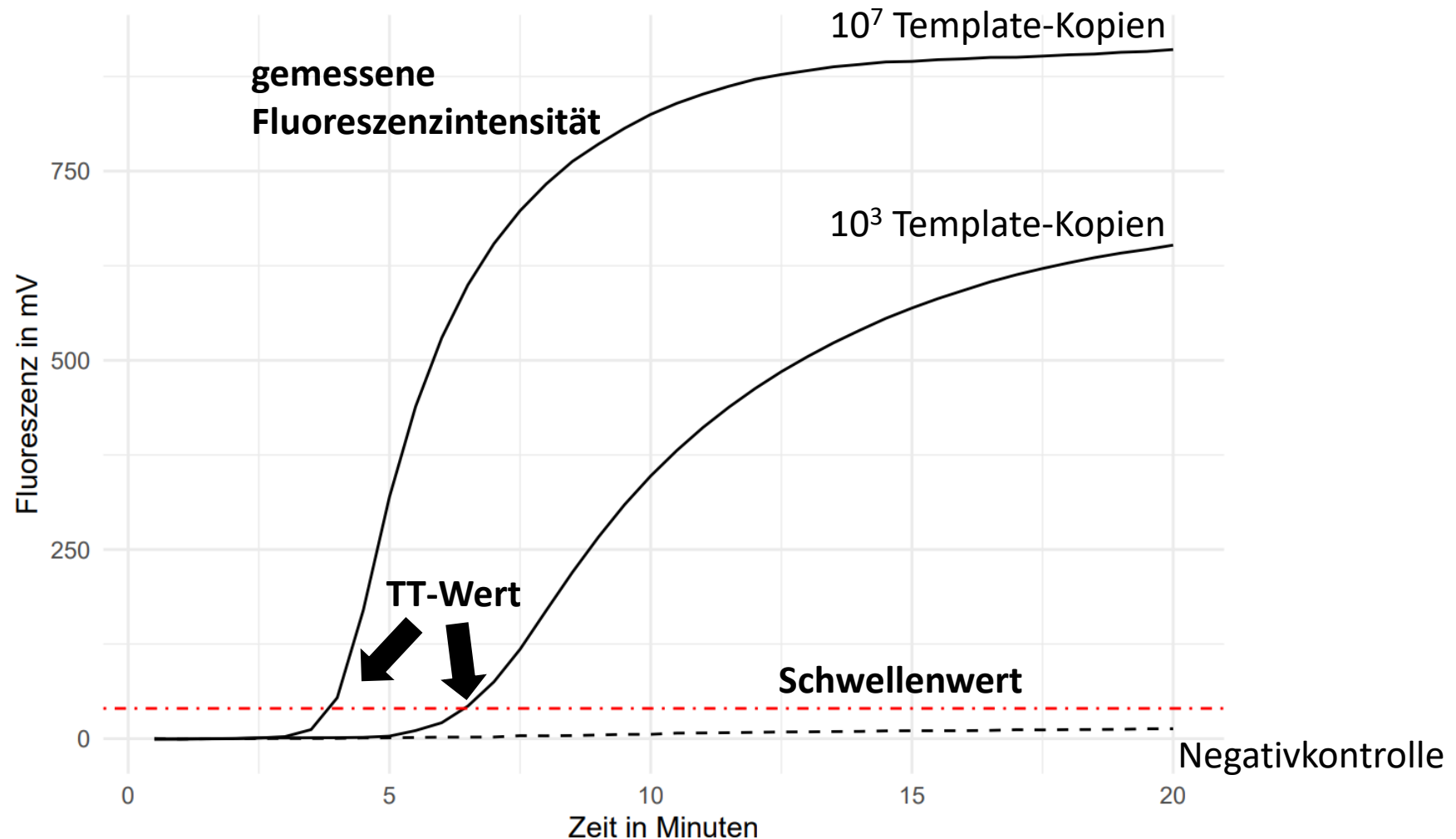
#### Exo-Sonde



Bildquelle: modifiziert nach Lobato & OSullivan 2018

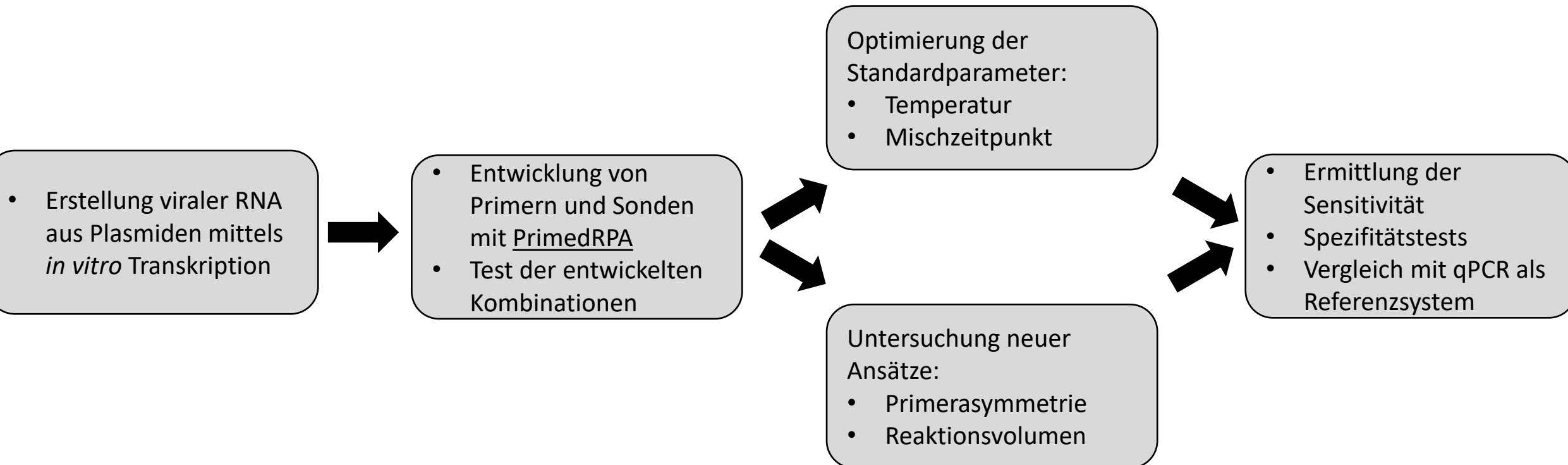
# Die RPA

## Echtzeitdetektion der Reaktion



# Ziel der Arbeit

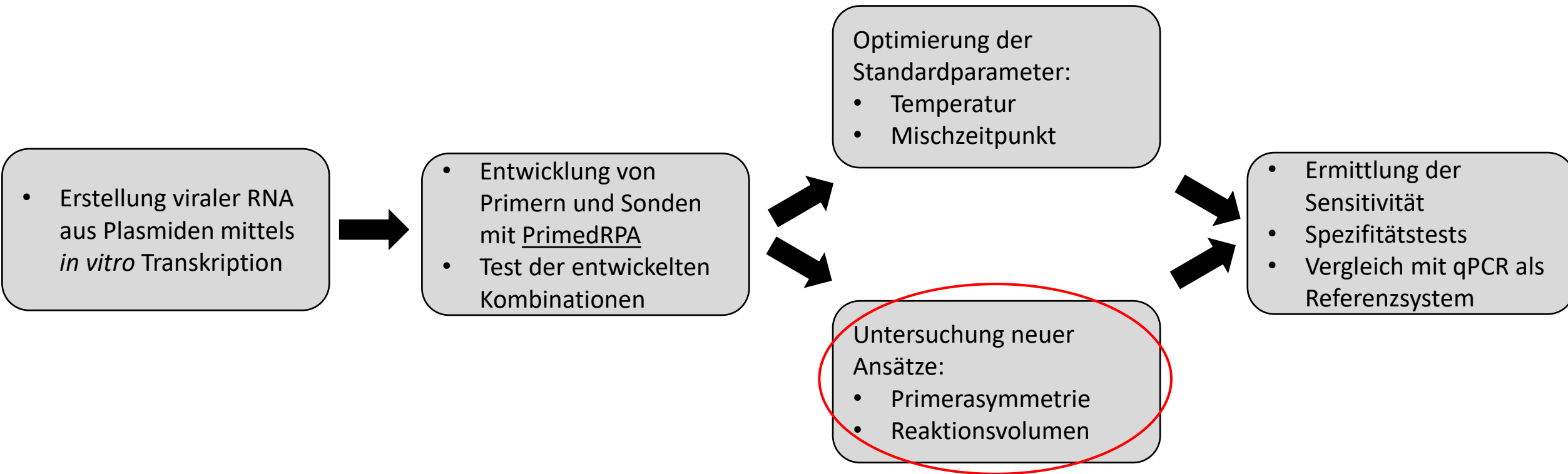
## Entwicklung und Optimierung einer RT-RPA für jeweils Influenza A und Influenza B für die POCT





# Ziel der Arbeit

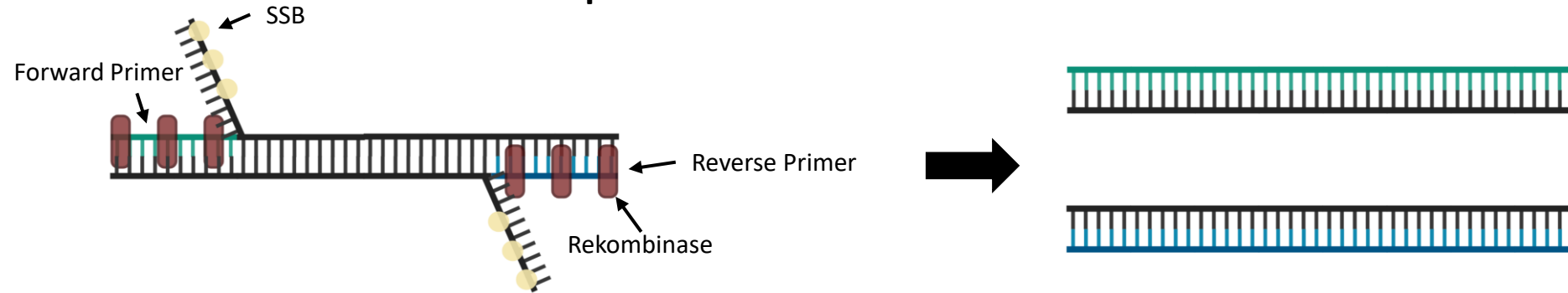
## Entwicklung und Optimierung einer RT-RPA für jeweils Influenza A und Influenza B für die POCT



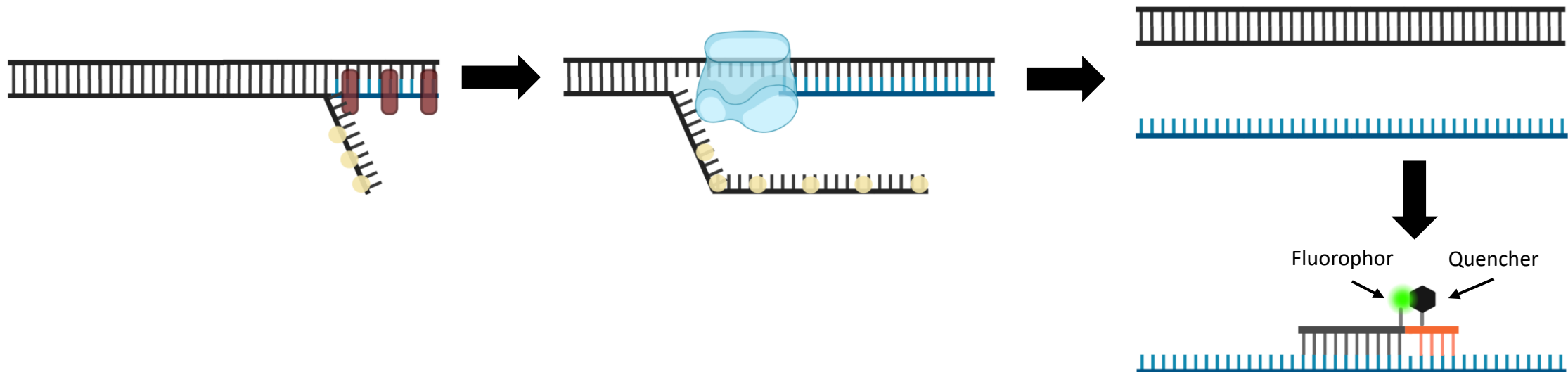
# Die Primerasymmetrie

## Das Prinzip

### äquimolare Primerkonzentration

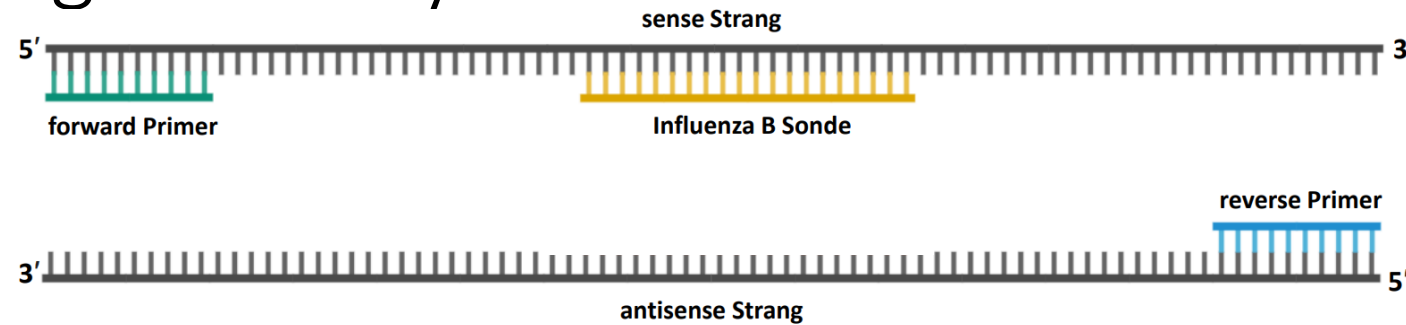


### asymmetrische Primerkonzentration



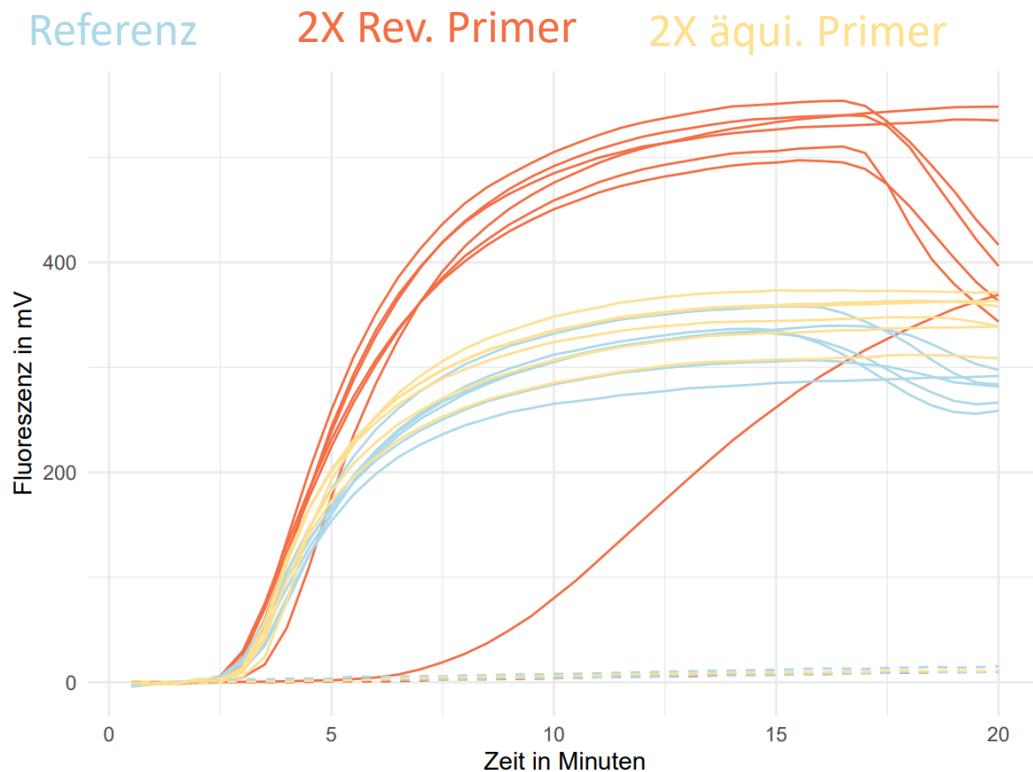
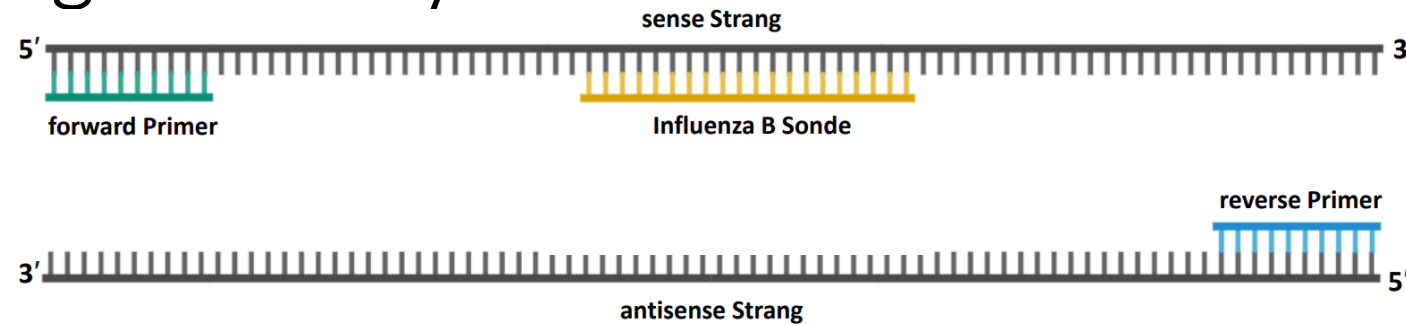
# Ergebnisse

## Entwicklung einer asymmetrischen RPA



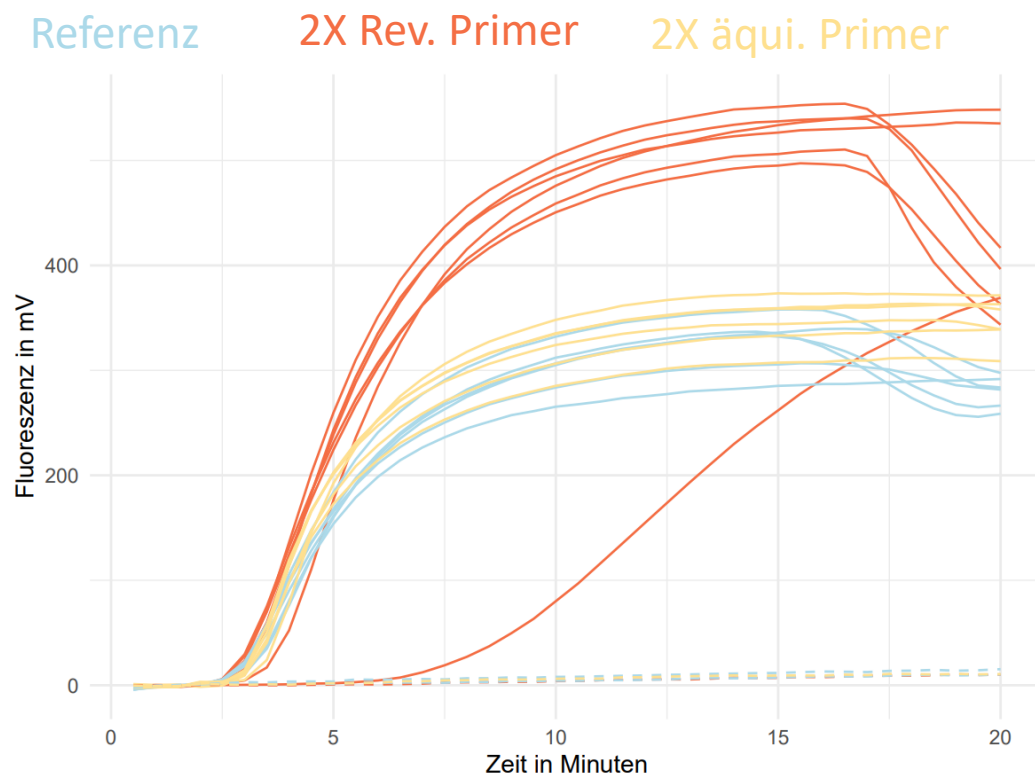
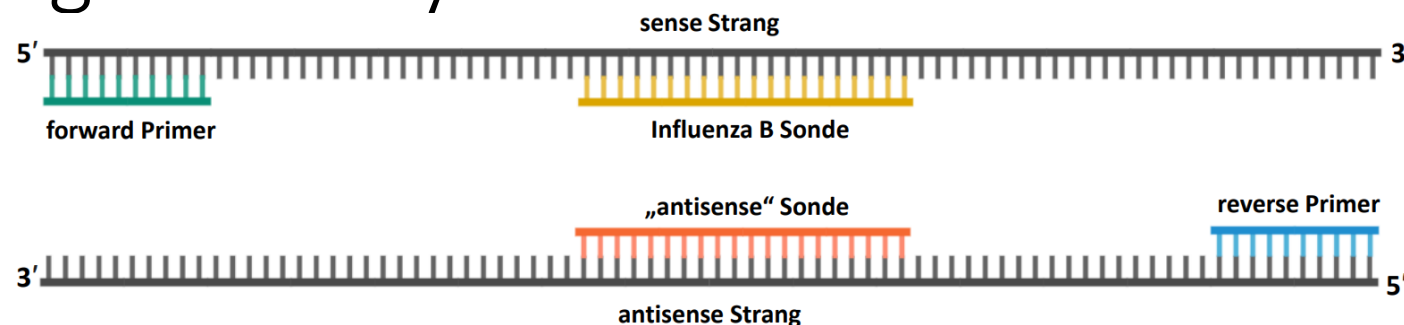
# Ergebnisse

## Entwicklung einer asymmetrischen RPA



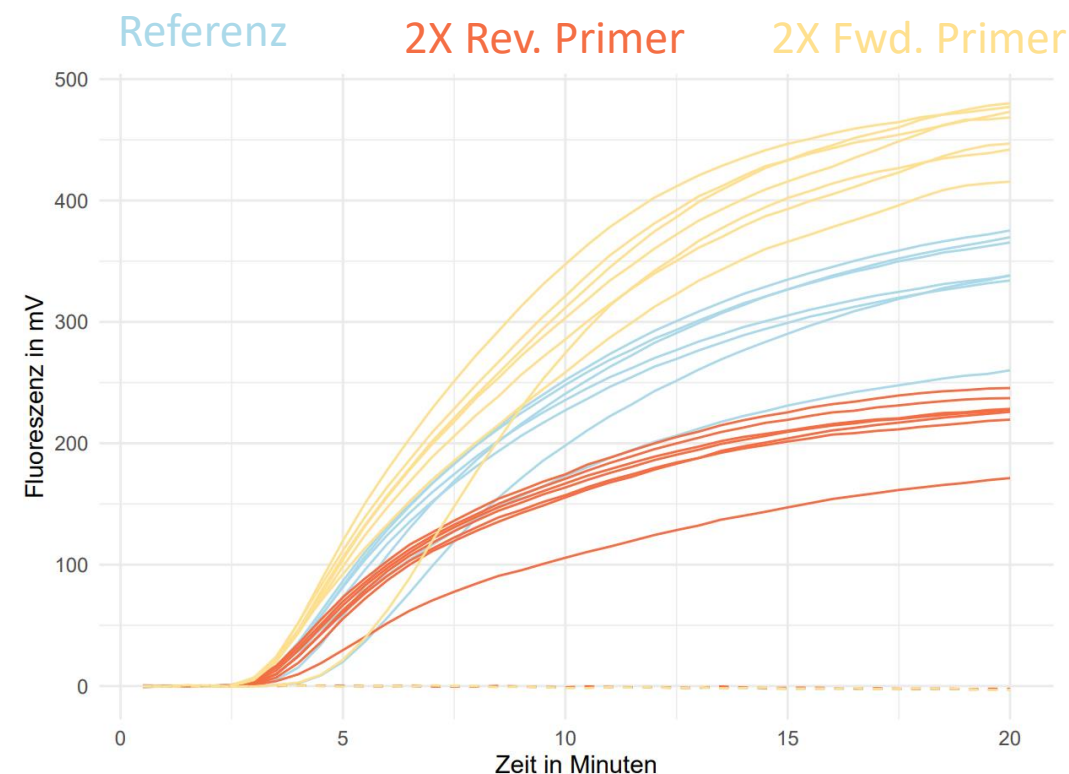
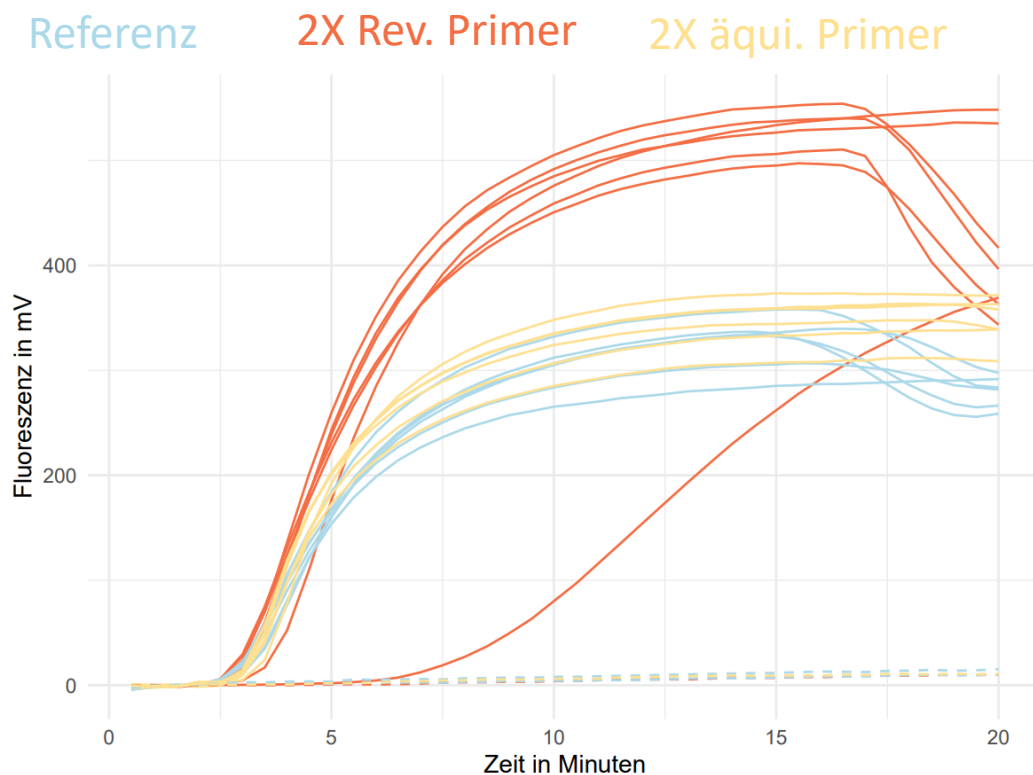
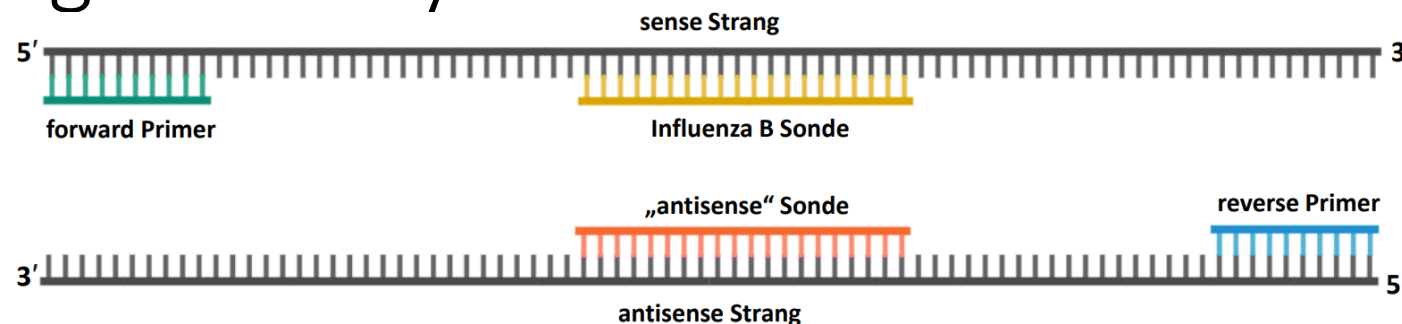
# Ergebnisse

## Entwicklung einer asymmetrischen RPA



# Ergebnisse

## Entwicklung einer asymmetrischen RPA



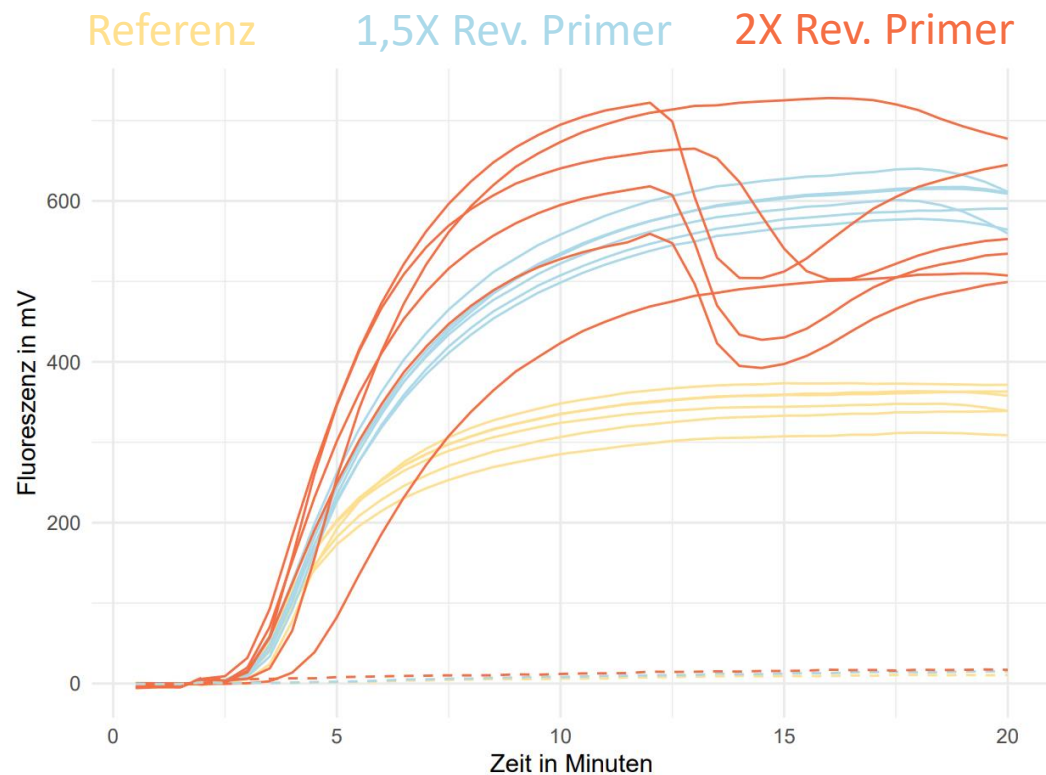
# Ergebnisse

## Optimierung der Primerasymmetrie

# Ergebnisse

## Optimierung der Primerasymmetrie

### Influenza B

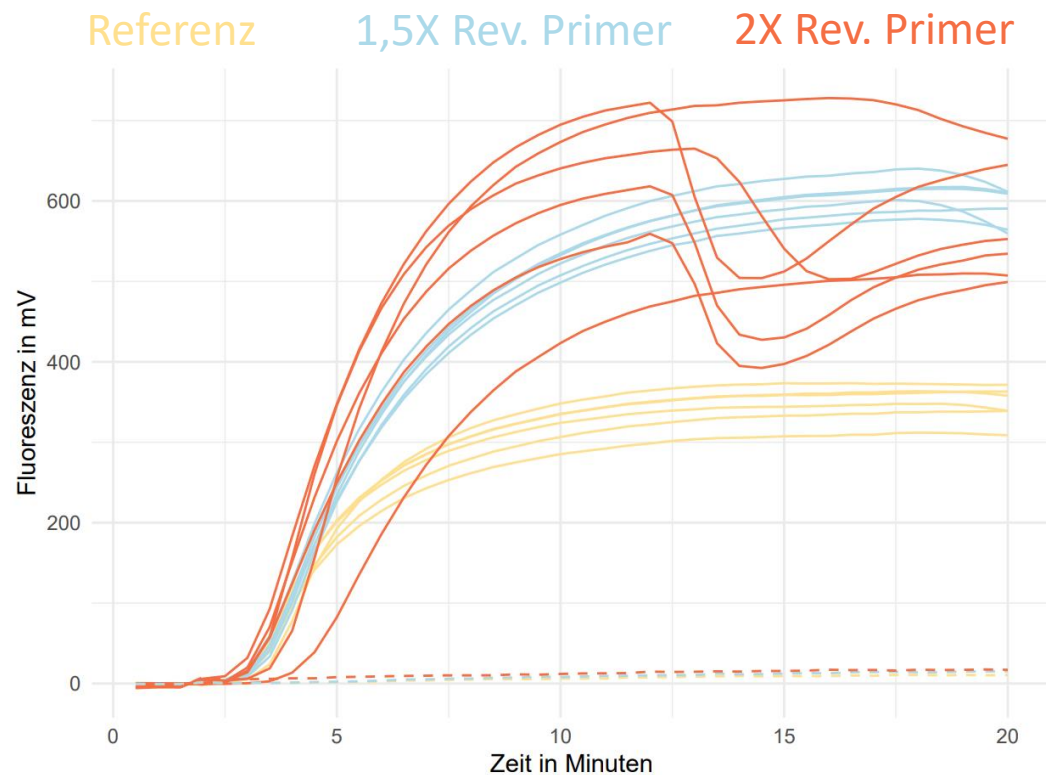




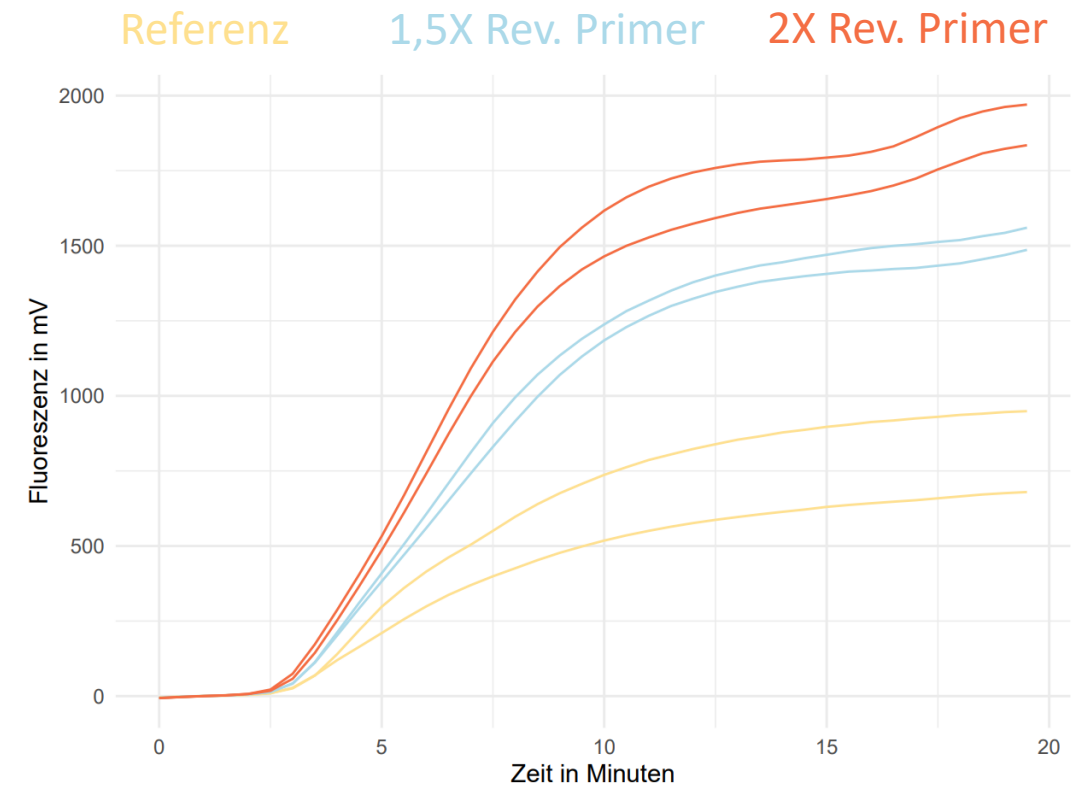
# Ergebnisse

## Optimierung der Primerasymmetrie

**Influenza B**

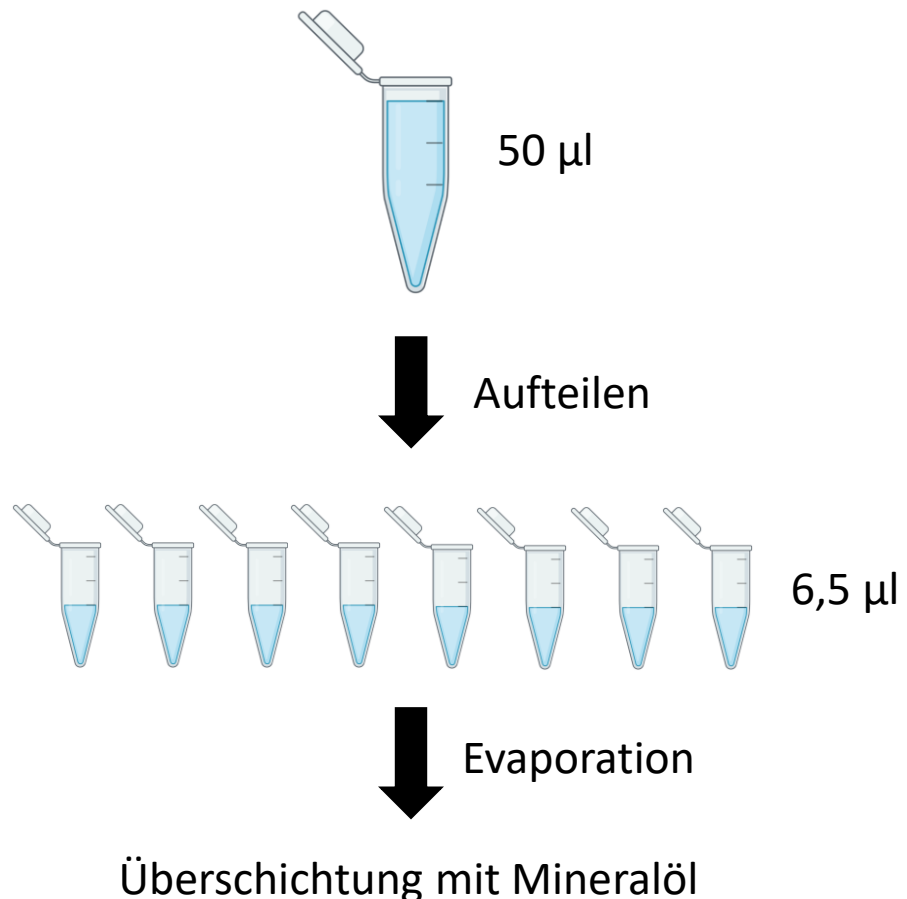


**Influenza A**



# Der niedrigvolumen Ansatz

## Vorteile und Herausforderungen



**geringes Gesamtvolumen:**  
größeres Oberflächen-Volumen  
Verhältnis



- Kostenersparnis

**gleiches Probenvolumen:**  
höheres Verhältnis zwischen  
Reaktionspuffer und Probe



- höhere Sensitivität
- geringere Abhängigkeit vom Mischschritt (Lillis *et al.* 2016)

**Microfluidik:**  
Lab-on-a-Chip System  
anwendbar



- Labor innerhalb eines handgroßen Chips
- Optimal für die POCT

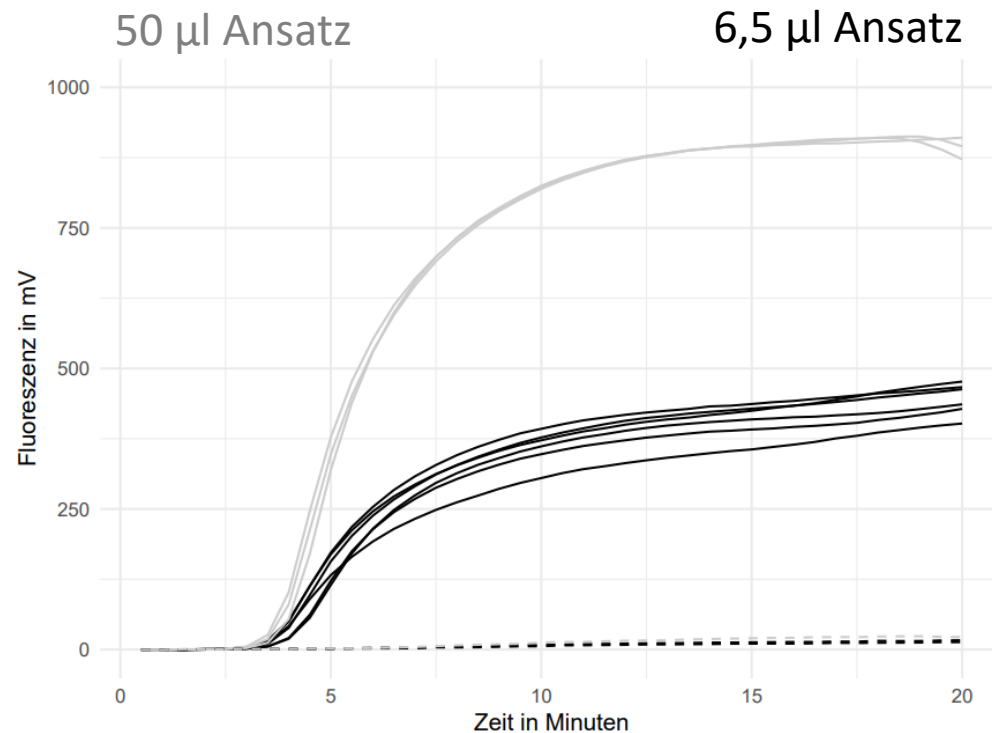
# Ergebnisse

Vergleich zwischen den Reaktionsvolumina

# Ergebnisse

## Vergleich zwischen den Reaktionsvolumina

### Influenza B

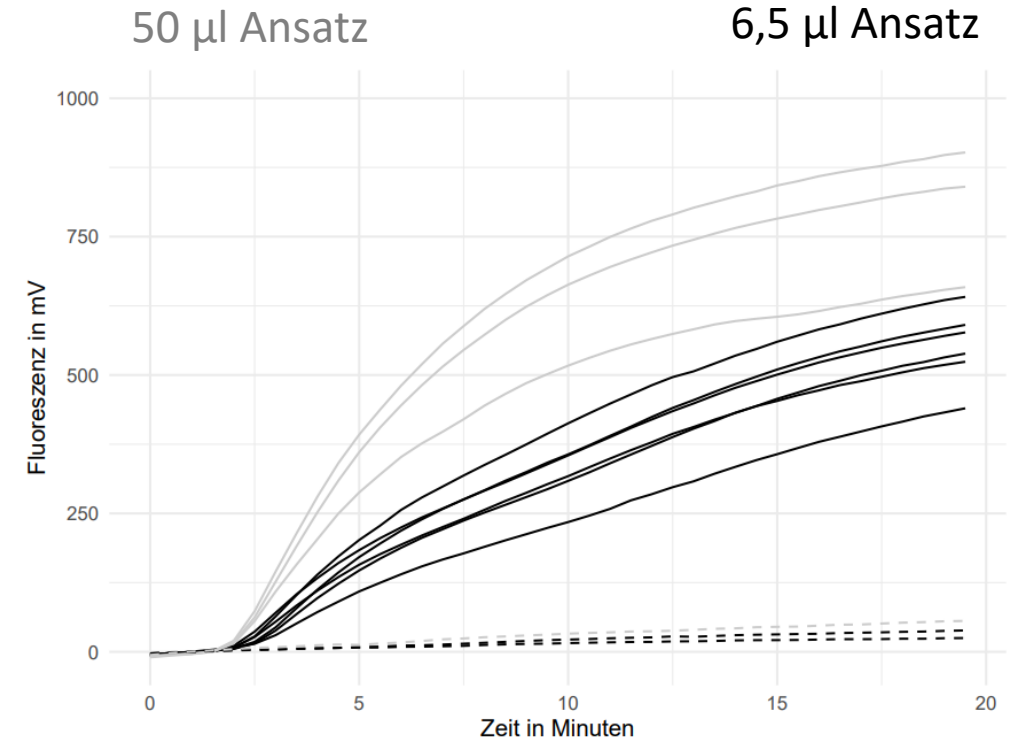
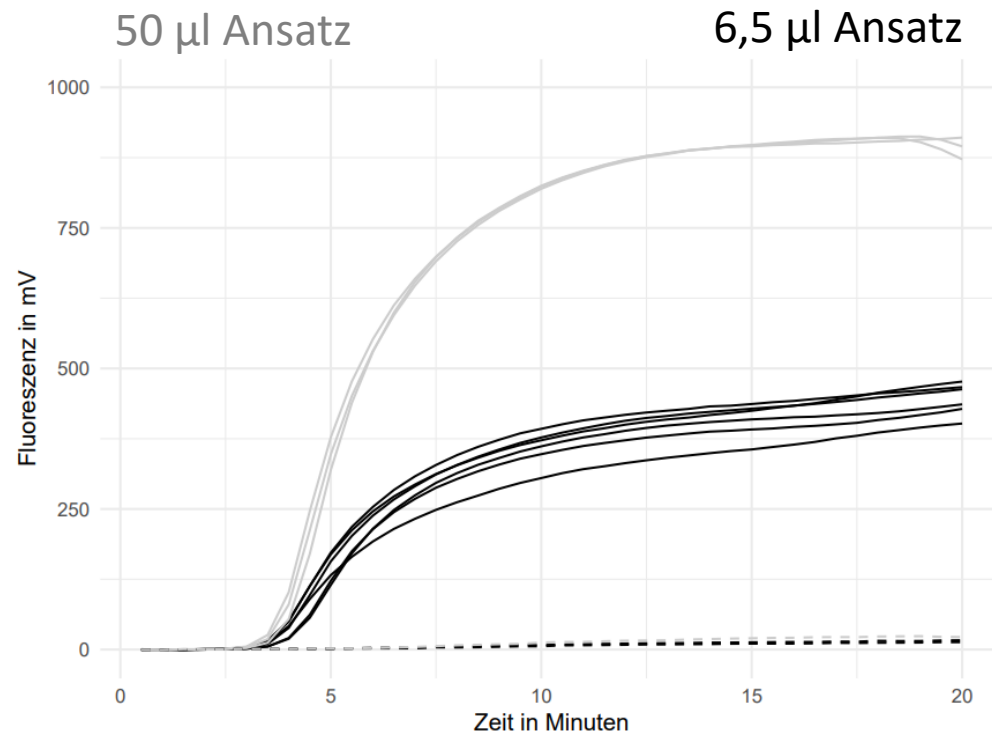


# Ergebnisse

## Vergleich zwischen den Reaktionsvolumina

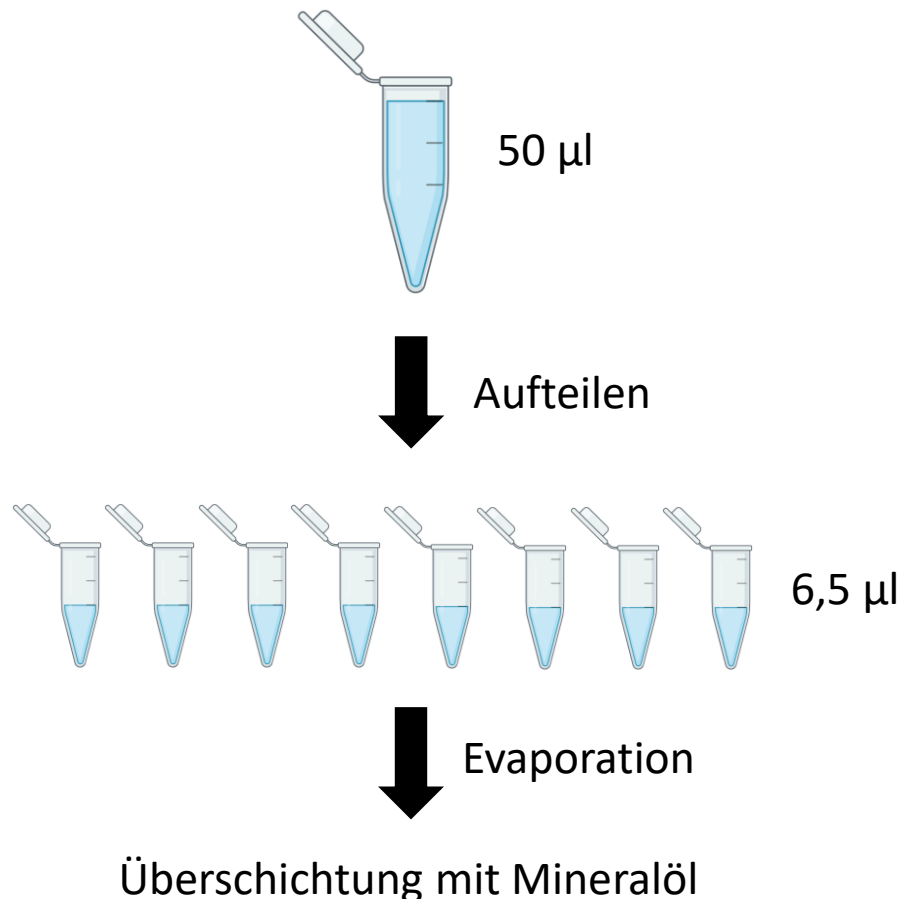
Influenza B

Influenza A



# Der niedrigvolumen Ansatz

## Vorteile und Herausforderungen



**Geringes Gesamtvolumen:**  
Größeres Oberflächen-Volumen  
Verhältnis



- Kostenersparnis

**gleiches Probenvolumen:**  
höheres Verhältnis zwischen  
Reaktion und Probe



- höhere Sensitivität
- geringere Abhängigkeit vom Mischschritt (Lillis et al. 2016)

**Microfluidik:**  
Lab-on-a-chip System  
anwendbar



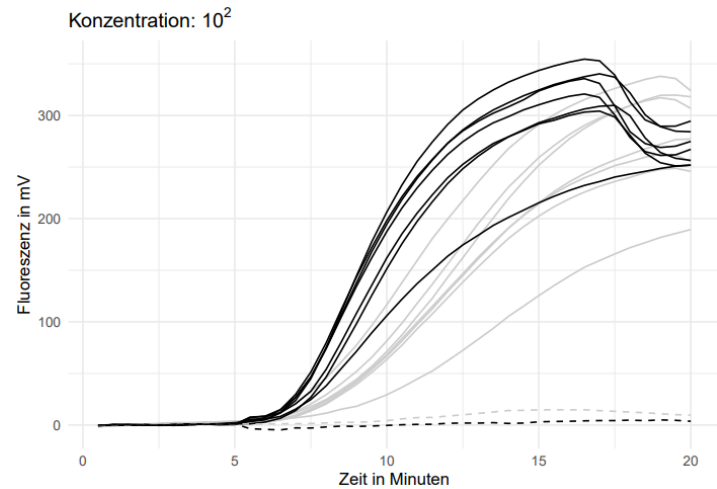
- Labor innerhalb eines handgroßen Chips
- Optimal für die POCT

# Ergebnisse Influenza B RPA

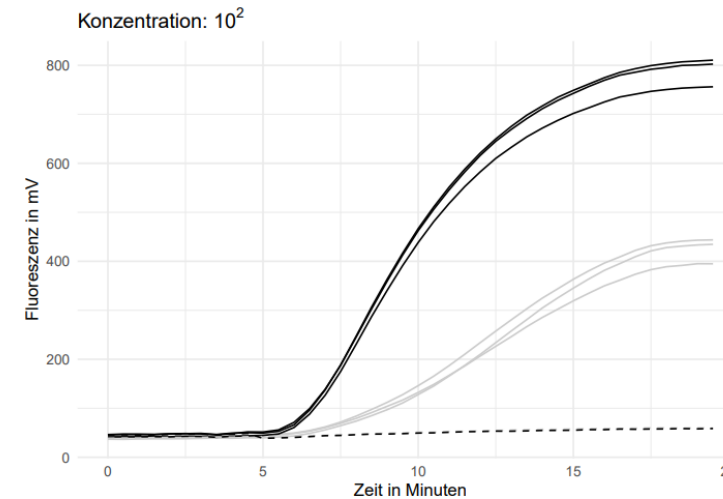
## Optimierung und Vergleich des Mischschrittes

Mischen 5 min  
nach Messbeginn  
Referenz ohne  
Mischen

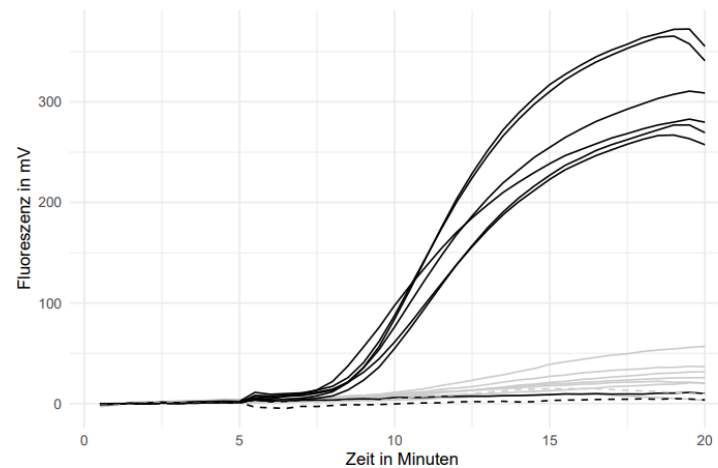
**6,5 µl Ansatz**



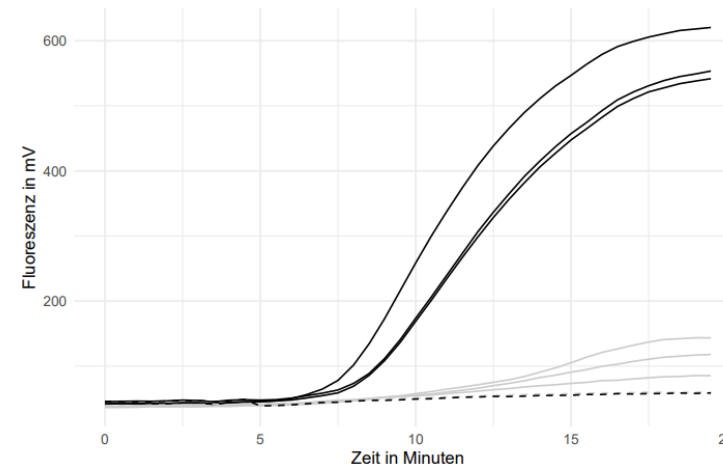
**50 µl Ansatz**



Konzentration:  $10^1$



Konzentration:  $10^1$

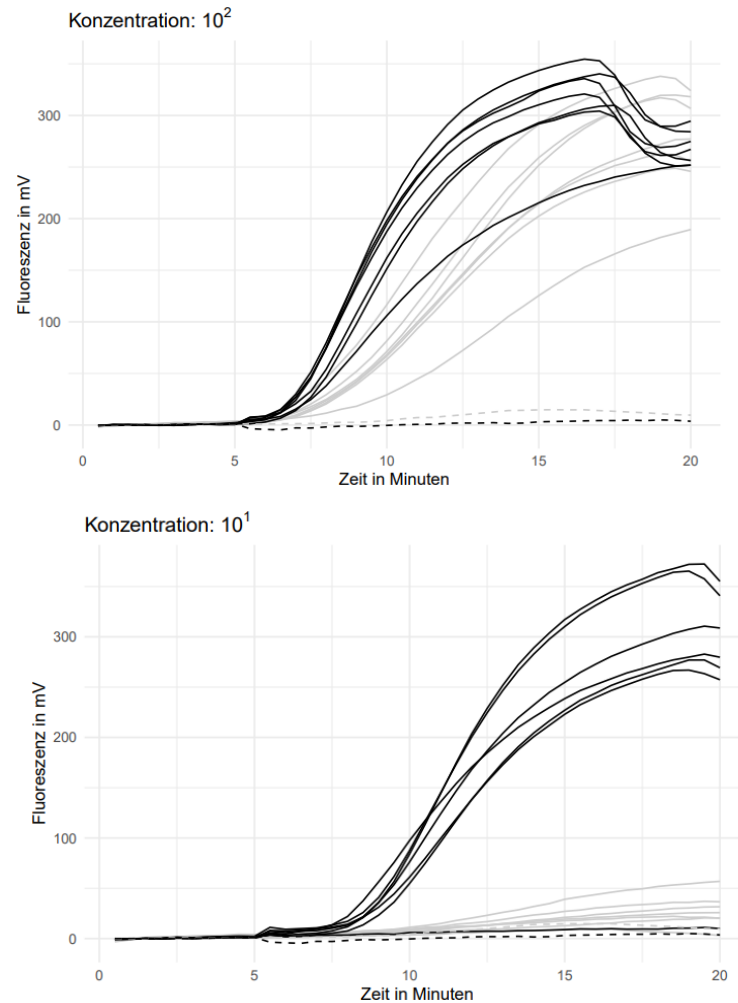


# Ergebnisse Influenza B RPA

## Optimierung und Vergleich des Mischschrittes

### 6,5 µl Ansatz

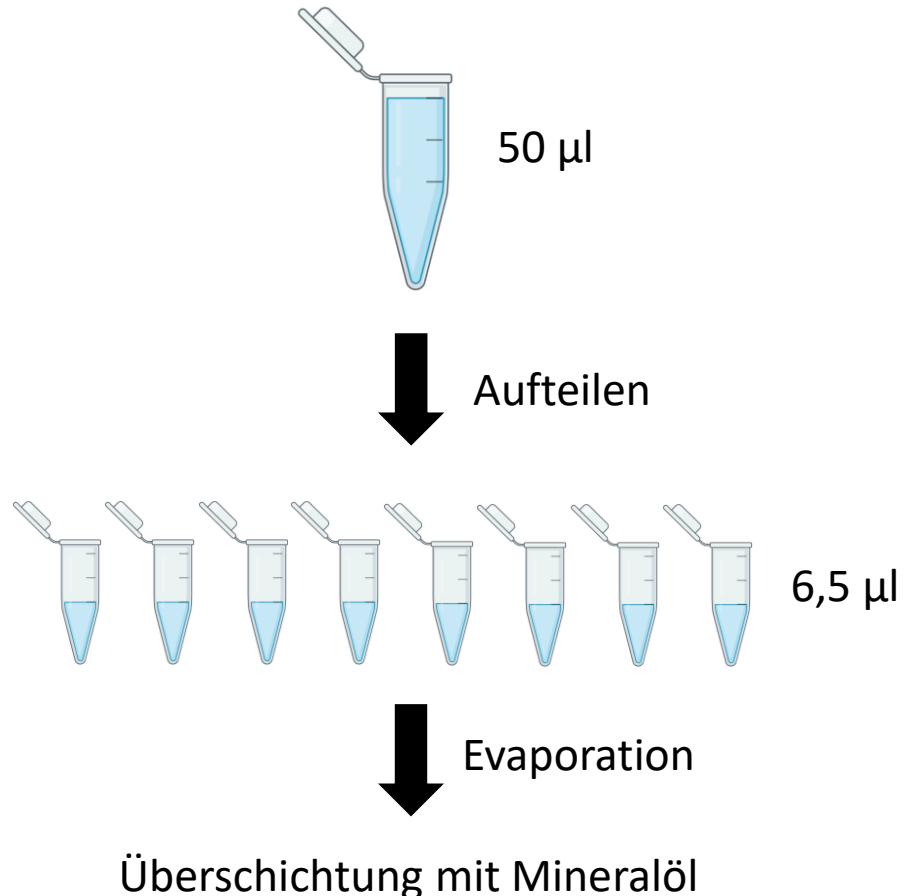
Mischen 5 min  
nach Messbeginn  
Referenz ohne  
Mischen





# Der niedrigvolumen Ansatz

## Vorteile und Herausforderungen



### Geringes Gesamtvolumen:

Größeres Oberflächen-Volumen  
Verhältnis



- Kostenersparnis

### gleiches Probenvolumen:

höheres Verhältnis zwischen  
Reaktion und Probe



- höhere Sensitivität
- geringere Abhängigkeit vom Mischschritt (Lillis *et al.* 2016)

### Microfluidik:

Lab-on-a-chip System  
anwendbar



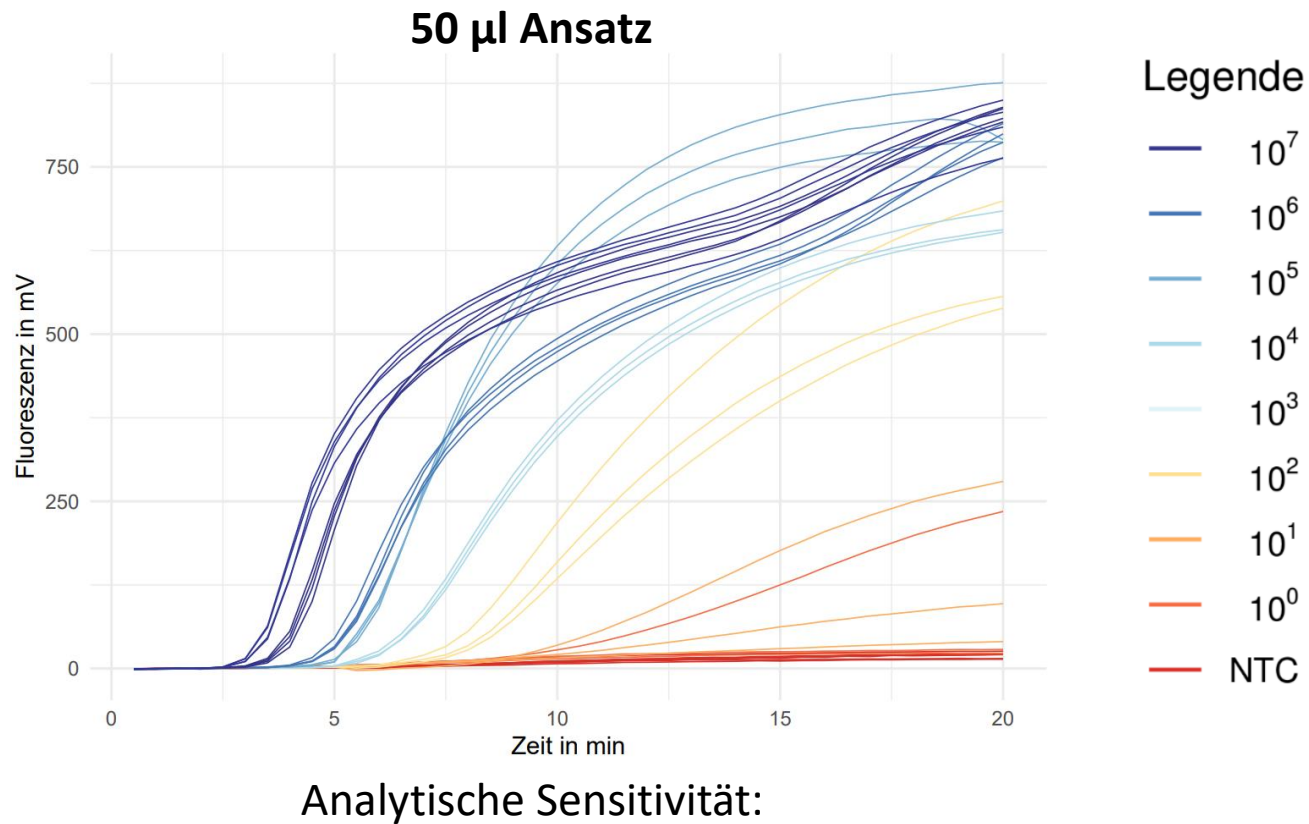
- Labor innerhalb eines handgroßen Chips
- Optimal für die POCT

# Ergbnisse Influenza B RPA

## Vergleich der Sensitivitäten

# Ergbnisse Influenza B RPA

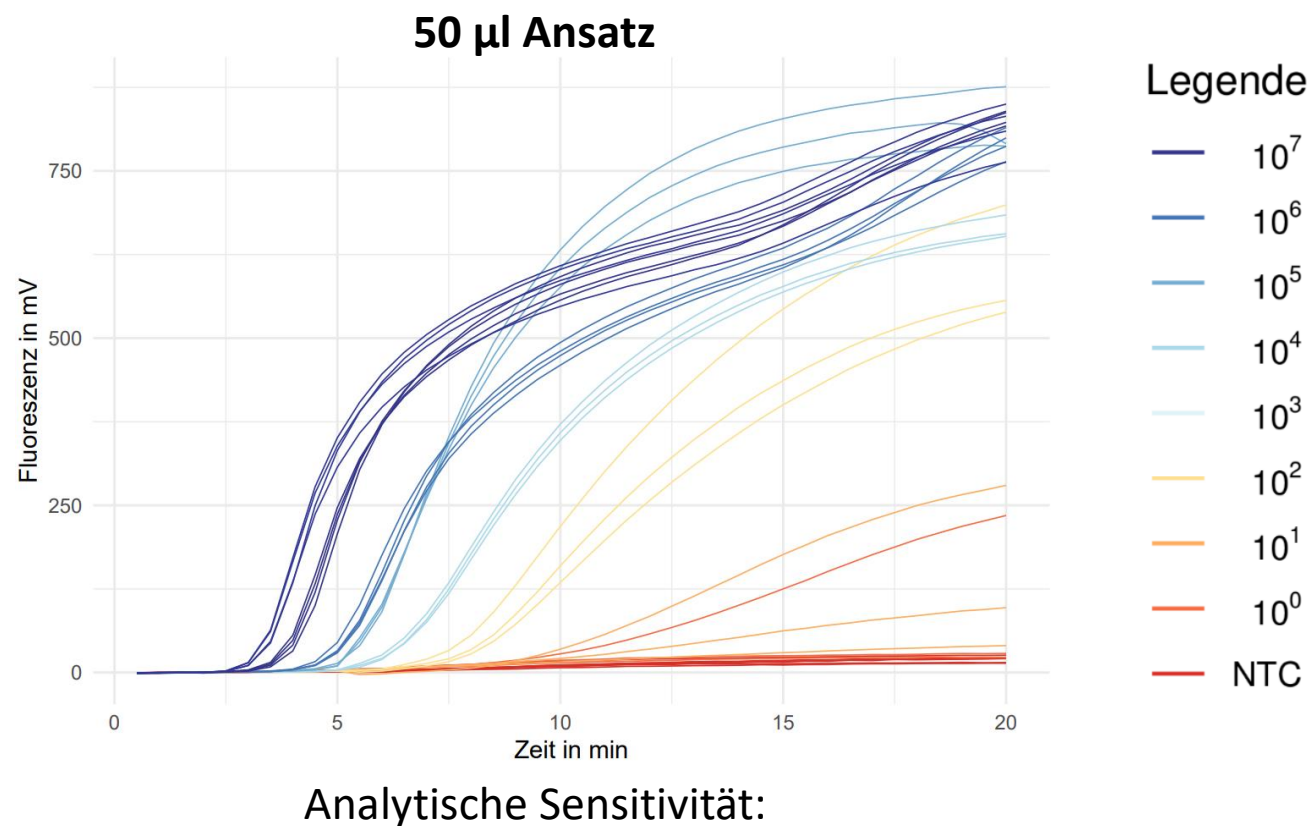
## Vergleich der Sensitivitäten



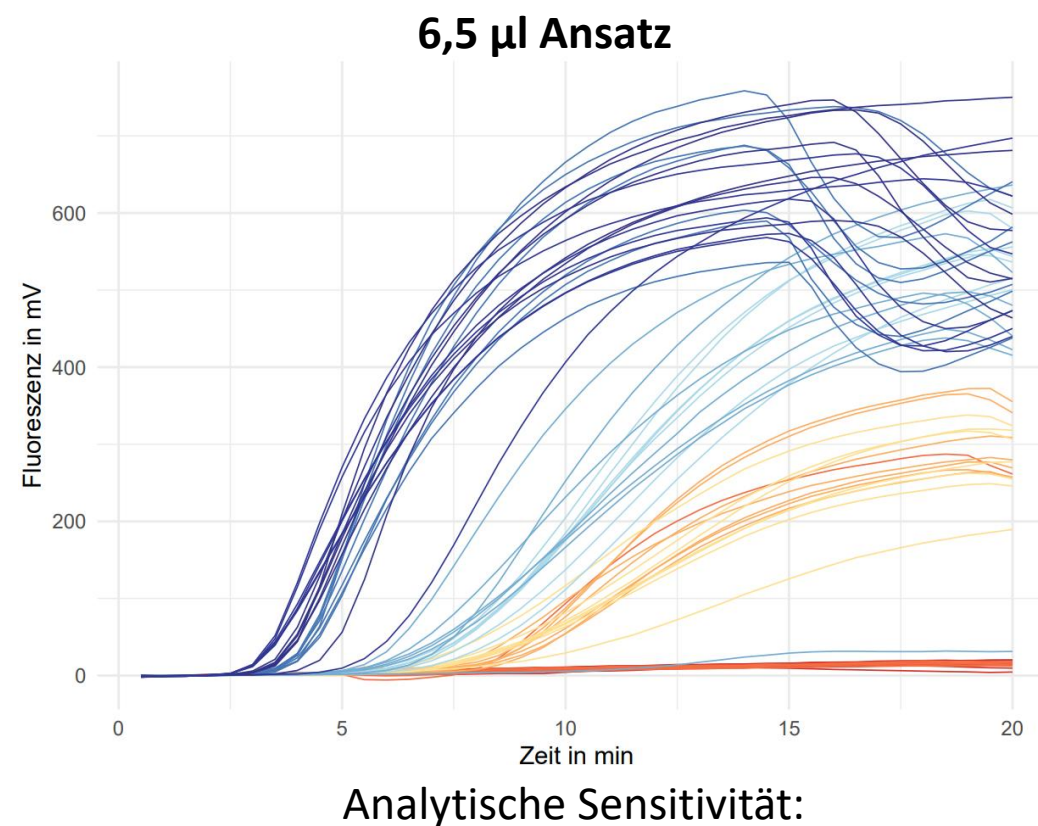
Detektionslimit von **31,6** RNA-Kopien

# Ergbnisse Influenza B RPA

## Vergleich der Sensitivitäten



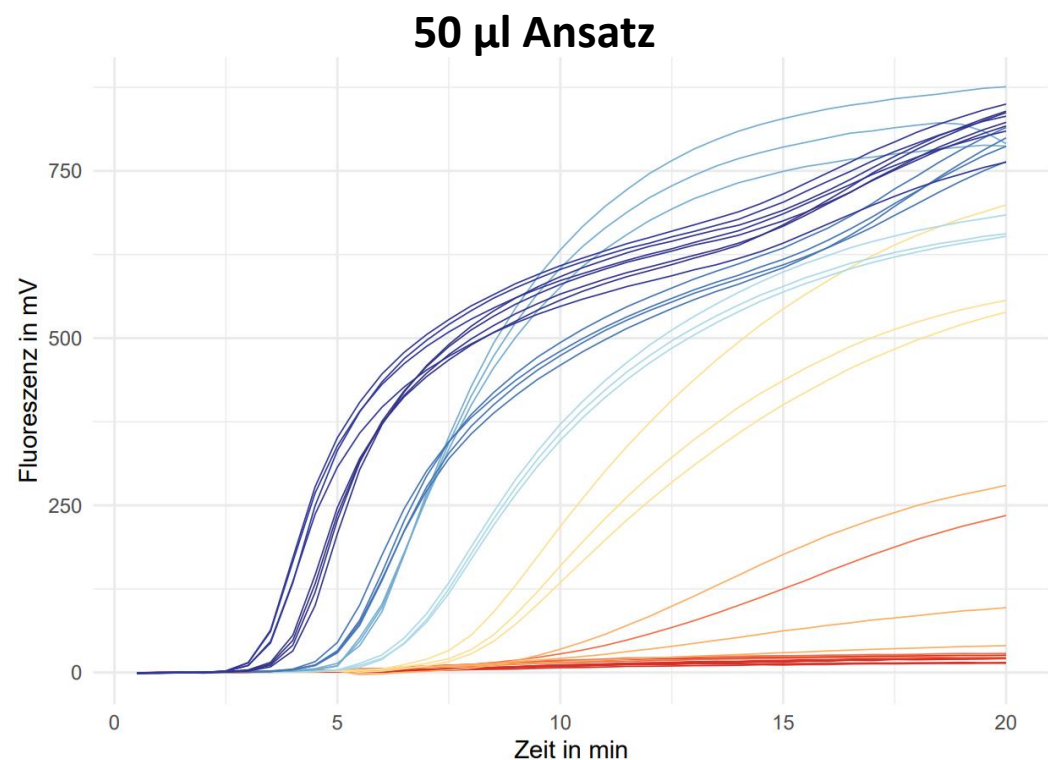
Detektionslimit von **31,6** RNA-Kopien



Detektionslimit von **14,6** RNA-Kopien

# Ergbnisse Influenza B RPA

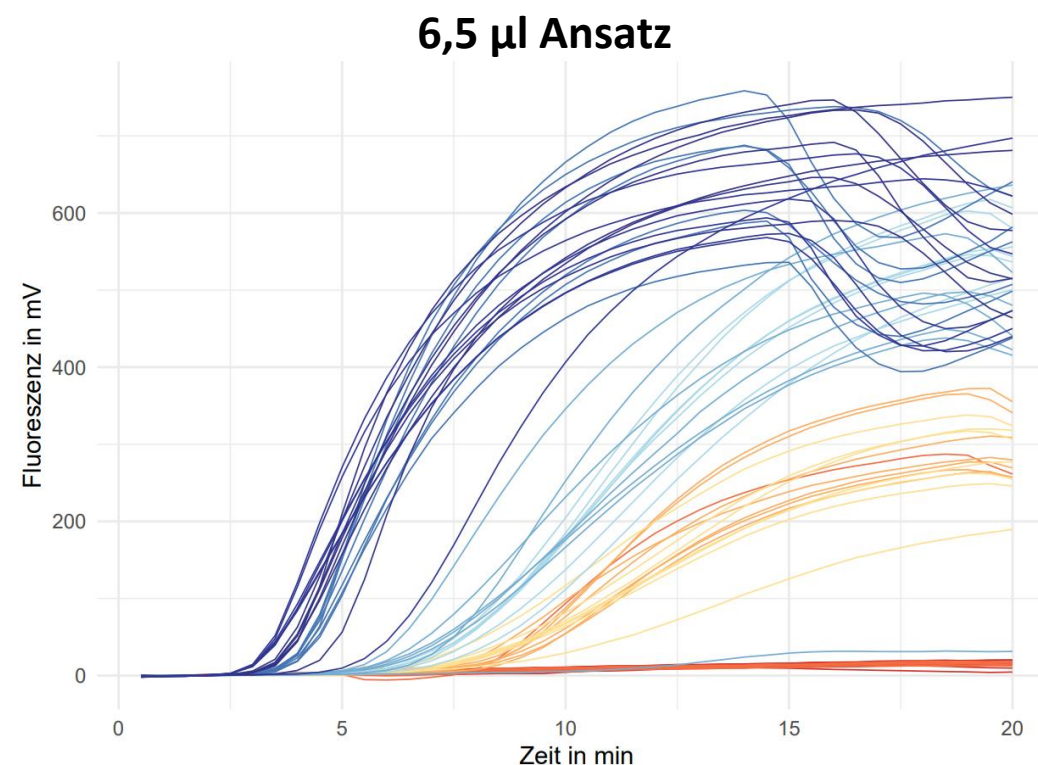
## Vergleich der Sensitivitäten



Analytische Sensitivität:

Detektionslimit von **31,6** RNA-Kopien

Legende



Analytische Sensitivität:

Detektionslimit von **14,6** RNA-Kopien

**Verbesserung von 54 %**

# Zusammenfassung

## **Primer Asymmetrie**

- Führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz
- Hängt von der Sonden-Orientierung ab
- Konnte auf beide RPA-Systeme angewendet werden

## **Niedrig-volumen Ansatz**

- Optimal für die POCT
- Geringere Abhängigkeit vom Mischen
- Führt zu einer Erhöhung der analytischen Sensitivität
- Nicht für beide RPA-Systeme anwendbar → weitere Optimierung notwendig

# Danksagung

Institut für Mikrobiologie und Virologie der MHB

Dr. rer. nat. Gregory Dame

Prof. Dr. med Frank T. Hufert

M. Sc. Iris Bachmann

M. Eng. Christian Neubert



Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Frank Hufert, and Gregory Dame. 2020. "Schnellnachweis von SARS-CoV-2 Mit Recombinase Polymerase Amplification." *BIOspektrum* 26 (6): 624–27. <https://doi.org/10.1007/s12268-020-1458-3>.

Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Martin Spiegel, Marina Schramm, Ahmed Abd El Wahed, Gerhard Dobler, Gregory Dame, and Frank T. Hufert. 2020. "Rapid Detection of SARS-CoV-2 by Low Volume Real-Time Single Tube Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Using an Exo Probe with an Internally Linked Quencher (Exo-IQ)." *Clin. Chem.* 66 (8): 1047–54. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>.

Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Helleman, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

<https://www.biorender.com>

Kim, Dae-Ki, and Barun Poudel. 2013. "Tools to Detect Influenza Virus." *Yonsei Medical Journal* 54 (3): 560. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.3.560>.

Lillis, Lorraine, Joshua Siverson, Arthur Lee, Jason Cantera, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, Dara A. Lehman, and David S. Boyle. 2016. "Factors Influencing Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Assay Outcomes at Point of Care." *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>.

Lobato, Ivan Magriñá, and Ciara K. O'Sullivan. 2018. "Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 98 (January): 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.



Paget, John, Peter Spreeuwenberg, Vivek Charu, Robert J Taylor, A Danielle Iuliano, Joseph Bresee, Lone Simonsen, and Cecile Viboud. 2019. "Global Mortality Associated with Seasonal Influenza Epidemics: New Burden Estimates and Predictors from the GLaMOR Project." *Journal of Global Health* 9 (2). <https://doi.org/10.7189/jogh.09.020421>.

WHO. 2023. "World Health Organisation-Influenza (Seasonal)." Online Verfügbar unter: [https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).

Woźniak-Kosek A, Hoser G., Kempieńska-Mirośławska B. 2014. "Detection of the Influenza Virus Yesterday and Now." *Acta Biochimica Polonica*. 61(3): 465–70. PMID: 25180218.

Yi, Hwajung, Young-Hoon Kim, Jun-Sub Kim, Nam-Joo Lee, Kyeongcheol Shin, Jang-Hoon Choi, Donghyok Kwon, Joo-Yeon Lee, and Chun Kang. 2013. "Impact of Influenza Virus Escape-Mutations on Influenza Detection by the Rapid Influenza Diagnostic Test." *Journal of Medical Virology* 85 (4): 709–15. <https://doi.org/10.1002/jmv.23484>.

