

Inhaltsverzeichnis

1	Ergebnisse	2
1.1	Entwicklung und Optimierung der Influenza RT-RPA	2
1.1.1	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA	2
1.1.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer	3
1.1.3	Optimierung der InfB RPA	4
1.1.4	Einfluss der Primerassymetrie auf die RT-RPA	7
1.1.5	Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA	8
1.2	Influenza A	11
1.2.1	Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA	11
1.2.2	Entwicklung der InfA-RPA Primer	12
1.2.3	Optimierung InfA	13
1.2.4	InfA Sensitivität	13
1.2.5	Entwicklung der InfB-RPA Primer	13
1.2.6	Optimierung der Infb-RPA	13
1.2.7	Primerassymetrie	13
1.2.8	Sensitivitätsanalysen und Vergleich	14
1.2.9	Spezifität	14
1.3	Influenza A	14
1.3.1	Entwicklung der InfA-RPA Primer	14
1.3.2	Optimierung der InfBARPA	14
1.3.3	Sensitivitätsanalysen und Vergleich	16
1.3.4	Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA	16
	Spezifitätstest	16

1 Ergebnisse

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

1.1 Entwicklung und Optimierung der Influenza RT-RPA

1.1.1 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA

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

zum Beginn der Arbeit war bereits ein mit dem Influenza B Plasmid (Plasmidkarte siehe Anhang ??) transformierter *e. coli* Stamm vorhanden. Dieser wurde kultiviert und anschließend das Influenza B Plasmid extrahiert (Kapitel ??). Durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung (Kapitel ??) der Influenza B Virussequenz auf dem extrahierten DNA-Plasmid konnten Sequenzfehler ausgeschlossen werden und die korrekte Virus-Sequenz bestätigt werden. In Vorbereitung für die *in Vitro* Transkription wurde das Plasmid durch einen Restriktionsverdau linearisiert und über ein Agarose-Gel überprüft (Kapitel ??). Das Kontrollgel (siehe Abbildung 1A) weist zwei unterschiedlich große DNA-Banden auf. Das linearisierte Plasmid in Spur 2 zeigt wie erwartet eine Bande bei ~3400 bp und das unverdaute Kontrollplasmid in Spur 3 eine Bande bei weit über 4000 bp. Daraus lässt sich schließen, dass die Linearisierung durch den Restriktionsverdau erfolgreich war. Das linearisierte Plasmid wurde von Puffer und Enzymrückständen befreit (Kapitel ??) und über eine *in vitro* Transkription mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7-Promotors (Kapitel ??) in RNA überführt. Die synthetisierte virale RNA wurde im letzten Schritt mit dem RiboGreen Assay (Kapitel ??) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 1B gezeigt. Es ergab sich eine Geradengleichung von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Korrelationskoeffizient R von 0,99. Mithilfe der Geradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von $476,0 \pm 7,8$ ng/ml und somit eine Kopienanzahl von $2,2 \cdot 10^8$ RNA-Kopien/μl berechnet werden.

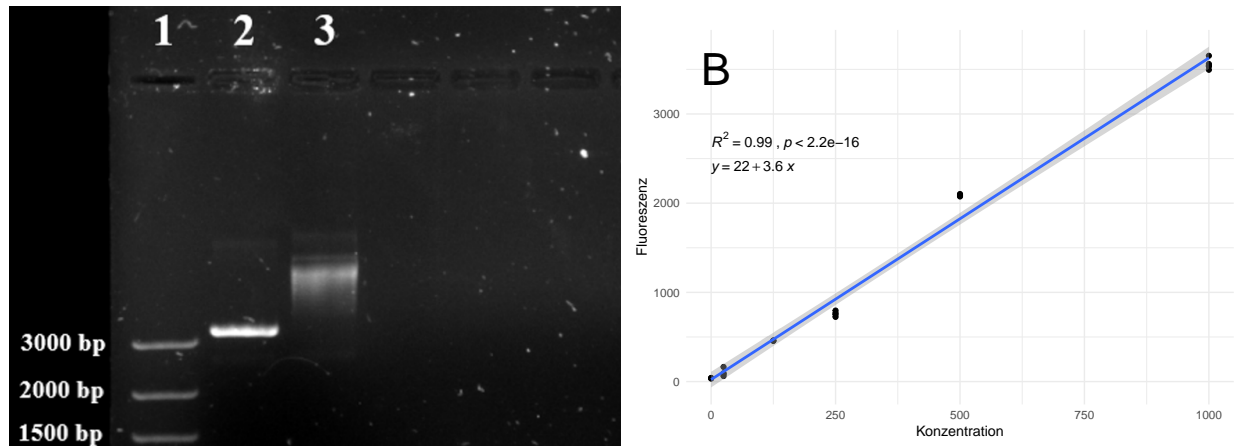


Abbildung 1: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdautem Plasmid (2), unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei ca. 3400 bp und somit unter dem mitgeführten ungeschnittenem Kontrollplasmid. Bild ist digital bearbeitet. **B:** Kalibrationsgerade des Ribogreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit n=4 durchgeführt.

1.1.2 Entwicklung der InfB-RPA Primer

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

Tabelle 1: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA

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

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

Die entwickelten Primer-Sonden-Kombinationen wurden in einem Screening Verfahren mittels RT-RPA in einer Dreifachbestimmung auf Amplifikation getestet (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich durch einen steileren Anstieg und höhere Fluoreszenzwerte im Vergleich zu den Kombinationen mit Sonde 3.1 (grau) aus. Des Weiteren lässt sich bei der Kombination mit Reverse 1.1 (schwarz, durchgängig) ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei der Kom-

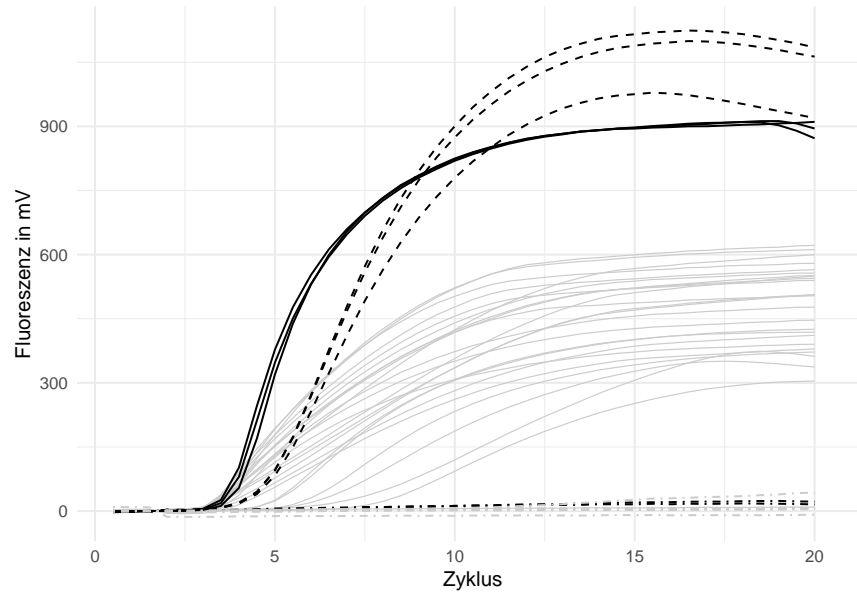


Abbildung 2: **Primerscreening der entwickelten Influenza B RT-RPA Primer-Sonden-Kombinationen:** Normalisierte Fluoreszenzdaten des Primerscreenings ($n=3$) für die in Tabelle 1 angegebenen Primer und Sonden. Alle Kombinationen mit Sonde 3.1 sind in **grau** dargestellt. Die Kombinationen mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.2 ist in **schwarz** (- - -) und die Kombination mit Sonde 1.2, Forward 1 und Reverse 1.1 in **schwarz** (—) dargestellt. Alle Negativkontrollen sind mit (· - ·) gekennzeichnet.

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

1.1.3 Optimierung der InfB RPA

Verringerung des Reaktionsvolumen (8tel Ansatz)

Für die Verringerung des Reaktionsvolumens, wurden das in 1.1.2 entwickelte Primer-Sonden-Set auf den 8-tel Ansatz überführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Messung zusammen mit einer Referenz (50 μ l Ansatz) sind in Abbildung 3 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die 8tel RPA (schwarz) im Vergleich zu der 50 μ l RPA (grau) im Verlauf der Reaktion wie erwartet, an maximaler Intensität verliert. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Anstiegszeit zwischen den beiden Reaktionsvolumen festgestellt werden. Die Mittelwerte der TT-Werte liegen bei $3,36 \pm 0,01$ (50 μ l RPA) und $3,47 \pm 0,14$ (8-tel RPA). Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

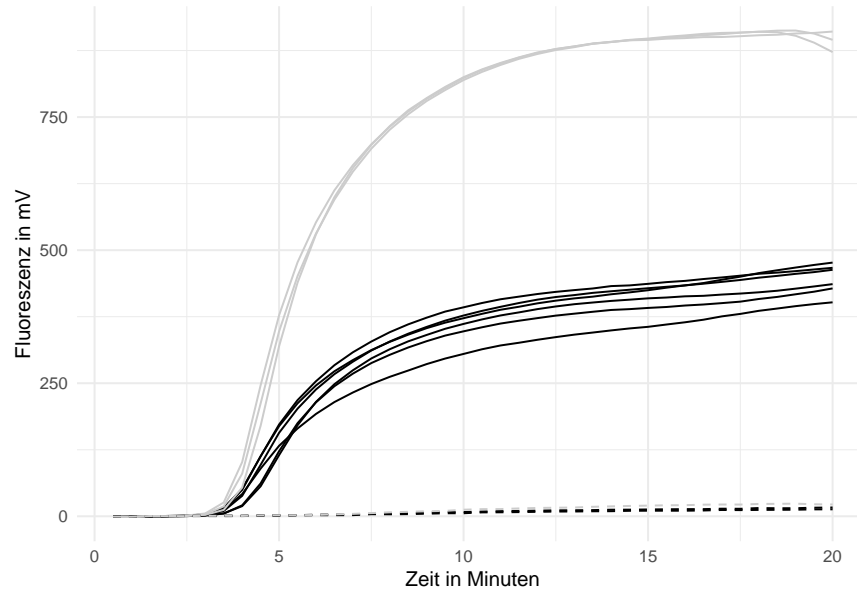


Abbildung 3: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 8 μ l-Ansatz (**schwarz**) bei 40 °C in n=6 (siehe ??8 μ lRPA)) mit dem in 1.1.2 entwickeltem Primer-Sonden-Set. Als Virus_RNA wurden 10⁷ RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 μ l Ansatz (**grau**) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Reaktionstemperatur

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

Einführen einer Reverse-Primer Assymetrie

Das Einführen einer Primer-Assymetrie sowie die Optimierung dieser wurde anhand des Reverse Primers wie in ?? beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten der variierenden Primerkonzentrationen sind in Abbildung 4B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine erhöhte reverse Primer-Konzentration mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der Referenz (keine Veränderte Reverse Primer-Konzentration, hellgrau) einhergeht. Eine signifikante Veränderung des TT-Wertes konnte nicht beobachtet werden. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs (siehe ??) sowie die Mittelwerte der TT-Werte sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt. Weiterhin lässt sich erkennen, dass bei einer doppelten Reverse Primer-Konzentration (grau) der

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

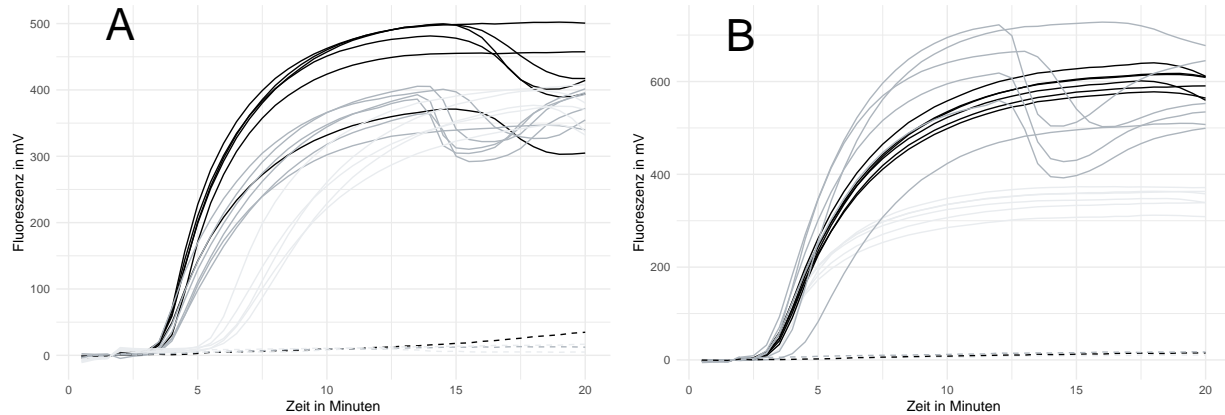


Abbildung 4: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA im 8tel-Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (schwarz) und 42 °C (grau). Messung in n=6 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerassymetrie mit 1,5x erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2X erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=6 pro Konzentration. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optminierung der Mischzeit

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

Damit der Effekt des Mischens bei niedriger Konzentration untersucht werden kann, wurden RT-RPA's mit einem Mischschritt nach fünf Minuten bei eingestzten RNA-Konzentration von 10^2 Kopien/ μ l (siehe Abbildung 5B) und 10^1 Kopien/ μ l (siehe Abbildung 5B) durchgeführt (siehe @refoptimischen). Bei 10^2 Kopien/ μ l besitzten die Reaktionen mit einem Mischschritt (schwarz) signifikant niedrigere TT-werte ($6,53 \pm 0,25$) als die Referenz (grau) ohne zusätzlichen Mischschritt ($7,35 \pm 0,58$). Des Weiteren ist bei der Messung mit Mischschritt ein Ditching nach ~16 Minuten bei 6/7 Reaktionen zu beobachten.

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

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

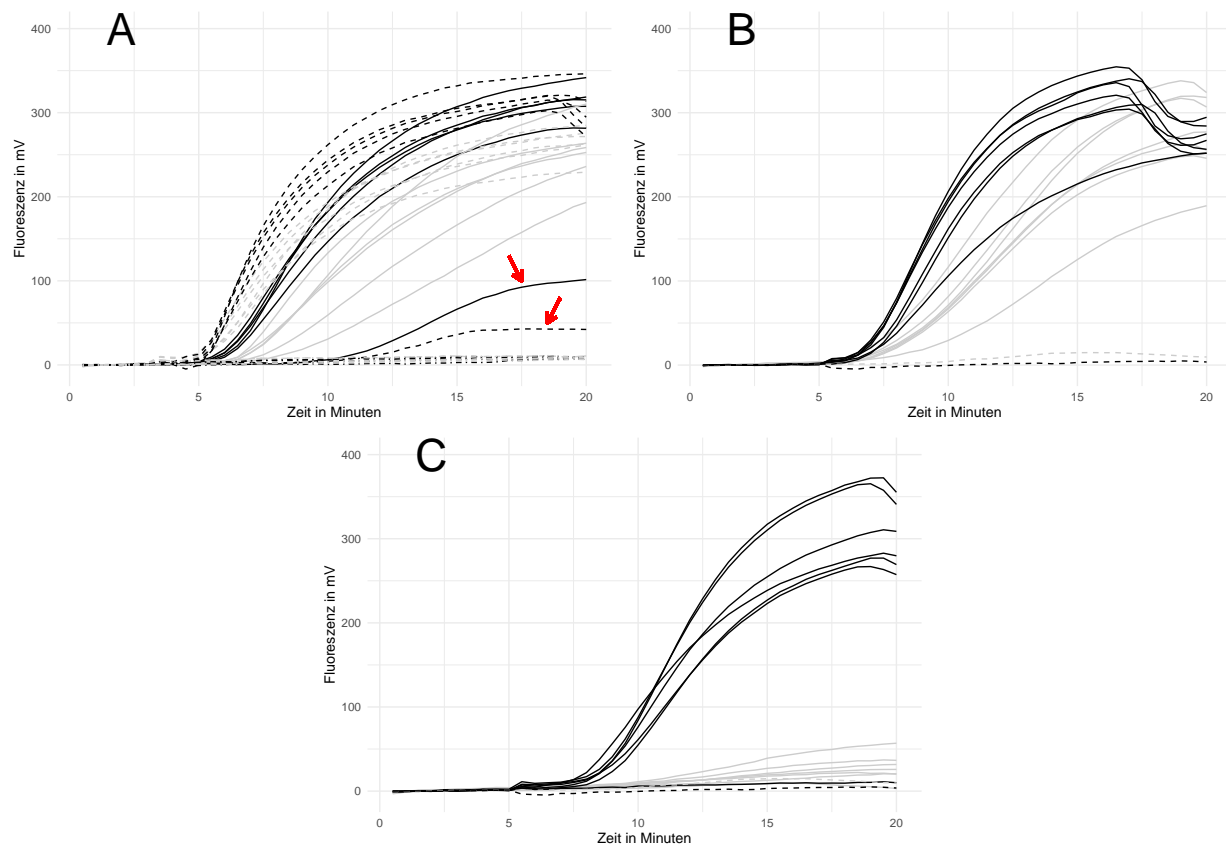


Abbildung 5: **Optimierung der Mischzeit für die Influenza B RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Optimierung des zusätzlichen Mischschrittes während der Messung. **A:** RT-RPA mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 3 min (grau, durchgezogen), 4 min (grau, gestrichelt), 5 min (schwarz gestrichelt)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

1.1.4 Einfluss der Primerassymetrie auf die RT-RPA

Wie in 1.1.3 gezeigt wurde, führt eine asymmetrische Erhöhung des Reverse Primers zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Um den Einfluss der generellen Primer-Konzentration auf die RPA zu untersuchen wurde

eine RT-RPA mit doppelter forward und reverse Primer-Konzentration (siehe ??) durchgeführt. Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 6A gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine generelle Erhöhung von Forward und Reverse Primer (grau) wieder zu einer niedrigeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer asymmetrischen Reverse Primer-Konzentration (schwarz) führt. Eine signifiante Veränderung der TT-Werte konnte nicht ermittelt werden. So liegen die TT-Werte für die Messung mit 2X-Reverse Primer bei $3,40 \pm 0,14$ und bei der Messung mit doppelter Primer-Konzentration bei $3,48 \pm 0,21$. Die markierte Amplifikationskurve (roter Pfeil) konnte als Ausreißer identifiziert werden und wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt. Die rechnerischen Daten des TT-Wert Vergleichs sind in Tabelle ?? im Anhang gezeigt.

Eine Vermutung war, dass die Hybridisation der Sonde an den Sense oder Anti-Sense Strang den DNA in Verbindung mit der Primer-Assymetrie und der daraus resultierenden erhöhten Fluoreszenzintensität steht. Um dies zu Überprüfen wurde eine erneute Messreihe mit einer am entgegengesetzten Strang hybridisierenden Sonde durchgeführt (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Messungen sind in Abbildung 6B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass hier die erhöhte Reverse Primer-Konzentration (hellgrau) die niedrigste Fluoreszenz im Vergleich zur Referenz (grau) und der erhöhten Forward Primer-Konzentration (schwarz) zeigt. Die assymerisch erhöhte Forward Primer-Konzentration zeigt hingegen die höchsten Fluoreszenzwerte und dementsprechend die beste Signalgenerierung. Des Weiteren besitzt die erhöhte Forward Primer-Konzentration signifikant niedrigere TT-Werte mit $3,25 \pm 0,05$ als die Referenz ($3,63 \pm 0,19$) und die erhöhte reverse Primer-Konzentration ($3,76 \pm 0,34$).

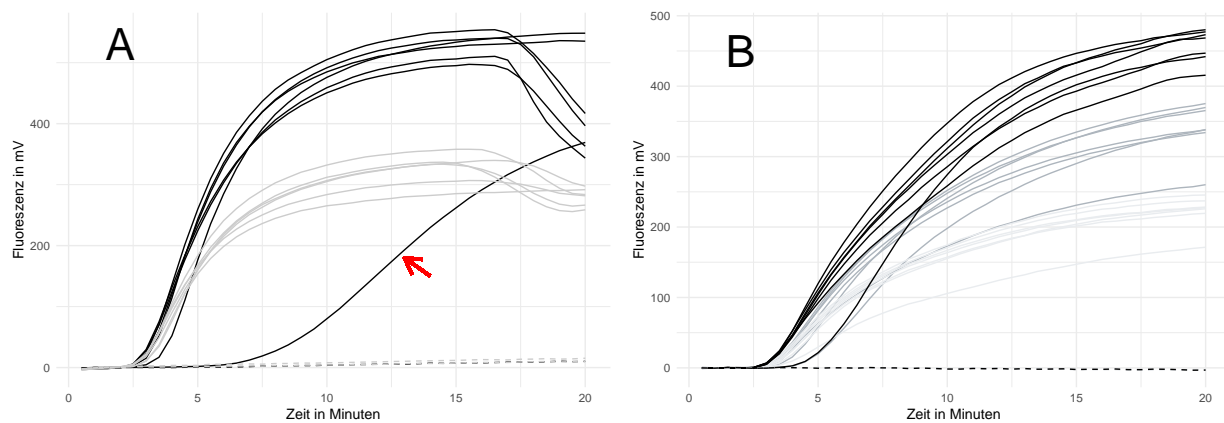


Abbildung 6: **Einfluss der Primerassymetrie auf der RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RT-RPA. **A:** Einfluss einer generellen Primererhöhung auf die Influenza B Rt-RPA. Die doppelte Primerkonzentration (jeweils $42 \mu\text{M}$ im PSM, siehe ??) ist in Grau dargestellt, während die asymmetrische Erhöhung des Reverse Primer als Vergleich in schwarz mitgeführt ist. Alle Messungen wurden in mindestens $n=6$ durchgeführt. Über den TT-Wert konnte die markierte Amplifikation (roter Pfeil) als Ausreißer identifiziert werden. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Messung der Influenza B RT-RPA bei asymmetrisch erhöhter Reverse (hellgrau) und forward (schwarz) Primer-Konzentration mit der in ?? angegebenen Sonde. Als Referenz (grau) wurde eine RT-RPA mit normaler Primer-Konzentration mitgeführt. Alle Messungen wurden in $n=7$ durchgeführt. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

1.1.5 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RT-RPA

Die Ermittlung der Sensitivität für die Influenza B RT-RPA erfolgte mit den im Kapitel 1.1.3 ermittelten optimalen Reaktionsparametern nach beschriebener Methode (siehe ??). Die Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung sowie das mithilfe der Probit-Analyse (siehe ??) ermittelte Detektionslimit sind in Abbildung

7 gezeigt. Für die Influenza B RT-RPA konnte berechnet werden, dass das System mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit 14,6 Virus RNA-Kopien detektieren kann. Des Weiteren konnte eine Kalibriergerade für die TT-Werte im Zusammenhang mit der Reaktionszeit mit einem $R^2 = 0,92$ und einer Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$ ermittelt werden. Die über den Boxplot-Test (siehe ??) ermittelten Ausreißer der TT-Werte (siehe rote Pfeile in 7A) wurden innerhalb der Kalibriergerade nicht berücksichtigt. Der angegebene p-Wert ist »0,05 was einen signifikanten linearen Zusammenhang aussagt. Zusätzlich wurde die Sensitivität für den 50 µl Ansatz der Influenza B RT-RPA mit den gleichen Reaktionsparametern ermittelt und ein Vergleich zu dem 8tel-Ansatz gezogen. Die Messung erfolgte nach der beschriebenen Methode (siehe ??). Es konnte eine Detektionslimit von 31,6 Kopien ermittelt werden. Dementsprechend konnte für die RT-RPA im 8tel-Ansatz eine Verbesserung des Detektionslimits um 46 % nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzdaten sowie die Probit-Analyse des 50 µl Ansatzes sind im Anhang unter Abbildung @ref(fig:...) gezeigt.

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

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

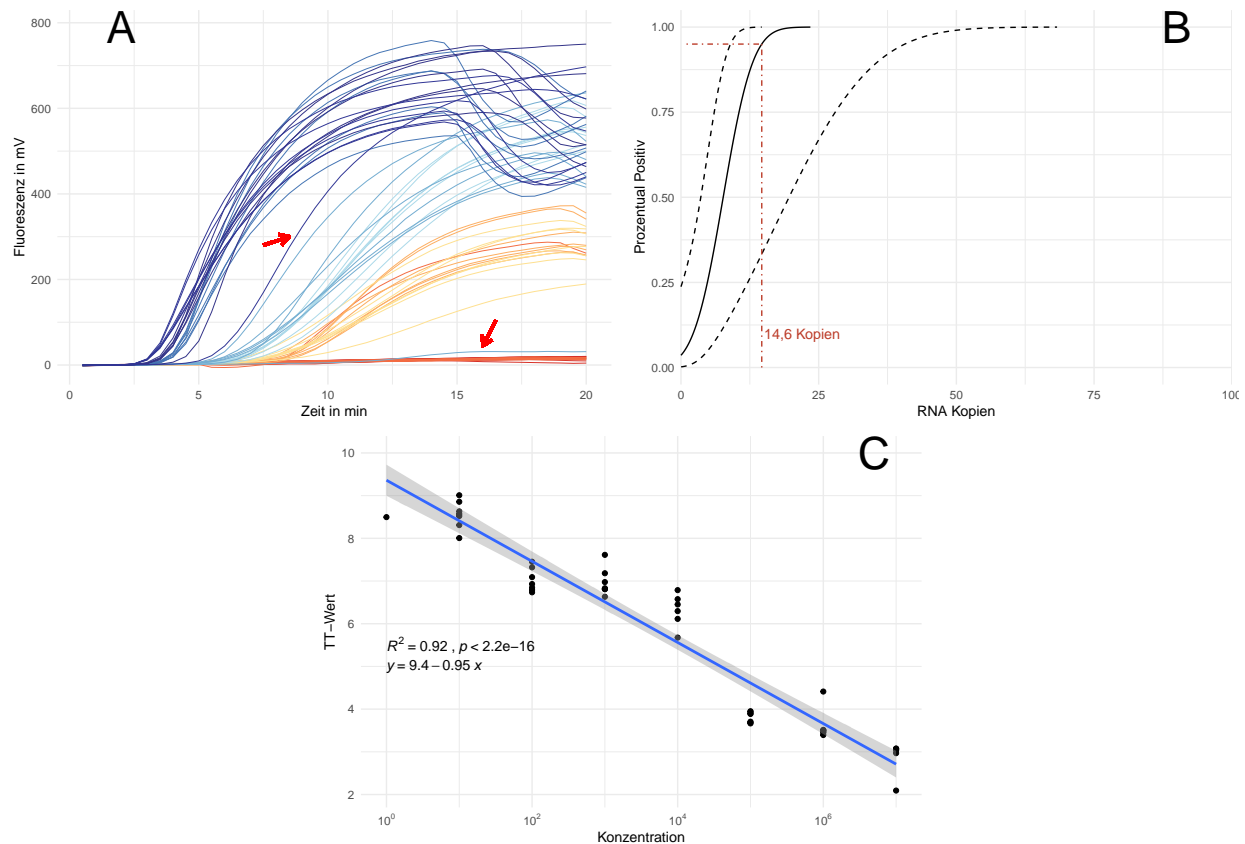


Abbildung 7: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RT-RPA:** **A:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Sensitivitätsmessung in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 und 10^0 RNA-Kopien pro Messung sowie **Negativkontrollen**. Jede Verdünnung wurde mit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

1.2 Influenza A

1.2.1 Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA

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

Für die Erstellung der Standard-RNA's wurden im ersten Schritt die entsprechenden Virus DNA-Sequenzen als teil eines DNA-Plasmids nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) in *E. coli* transformiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien kultiviert und die Plasmid-DNA extrahiert (siehe ??). Durch eine anschließende Sequenzierung (siehe ??) konnten Sequenzfehler durch Mutationen ausgeschlossen und die Integrität der Sequenz bestätigt werden. Im nächsten Schritt wurden die extrahierte Plasmide-DNA durch einen Restriktionsverdau linearisiert (siehe ??) und somit für die *in vitro* Transkription vorbereitet. Das zur Überprüfung der linearisierung durchgeführte Agarose-Gel ist in Abbildung 8 gezeigt. Die verdauten Plasmide zeigen eine DNA-Bande bei ~ 3300 bp. Die ungeschnittenen, mitgeführten Kontrollplasmide aus der vorherigen Plasmid-DNA isolation weisen hingegen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf.

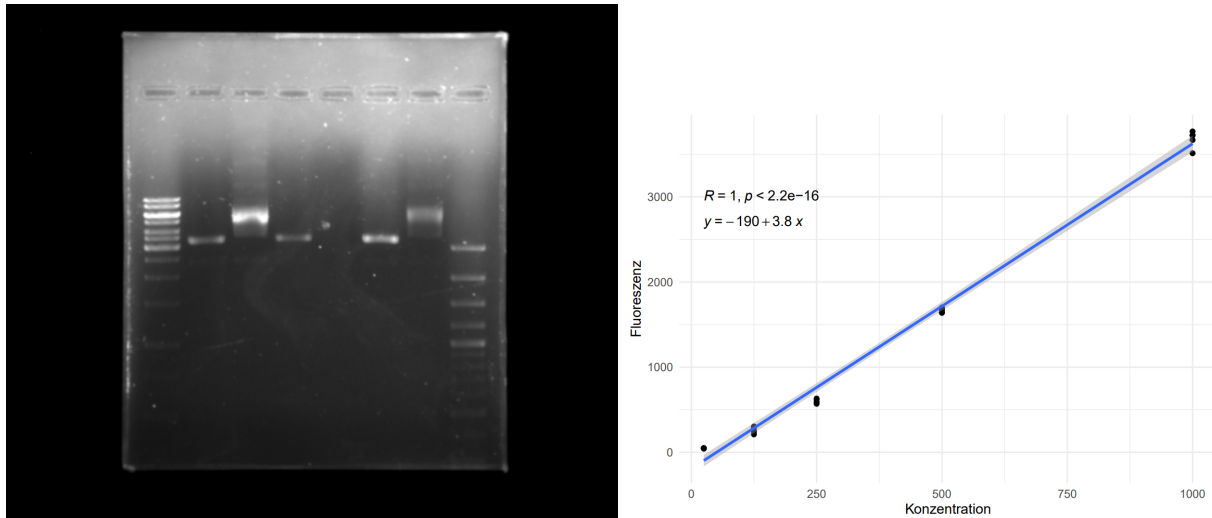


Abbildung 8: **Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide:** A: DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdauten Plasmid des 2005 H3N2 Standards (2) mit unverdauter Kontrolle (3), verdautem Plasmid des aktuellen H1N1 Standards (4) mit unverdauter Kontrolle (5) sowie verdautem Plasmid des aktuellen H3N2 Standard (6) mit unverdautem Kontrollplasmid (7), sowie mitgeführte 100 bp plus DNA-Leiter (8) und 1000 bp DNA-Leiter (1). DNA-Banden des verdauten Plasmid des 2004 H1N1 Standards (2) mit unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter 100 bp plus DNA-Leiter (1). Bilder digital bearbeitet. B, 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.

Zur Weiteren Vorbereitung der linearisierten Plasmid-DNA für die *in vitro* Transkription und als Nachbehandlung von den Restriktionsverdau wurden aus der DNA Enzym- und Pufferrückständen entfernt (siehe ??). Die gereinigte DNA wurde im nächsten Schritt zu RNA *in vitro* Transkribiert und die Ausgangs-DNA durch eine DNase-Behandlung beseitigt (siehe ??). In der nachfolgenden Aufreinigung wurde die Nukleinsäure abermals von störenden Puffer und Enzymrückständen befreit. Die reine, artifiziell erstellte virale RNA

wurde im letzten Schritt mithilfe des Ribogreen-Assays quantifiziert (siehe ??). Dabei wurden jeweils die RNA-Standards H3N2 (2005) und H1N1 (2020) innerhalb einer Messung und die Standards H1N1 (2004) und H3N2 (2020) in einem separaten Assay quantifiziert. Die Kalibriergeraden der Assays sind in Abbildung reffig:infAver dau gezeigt. Beide Kalibriergeraden besitzen einen Korrelationskoeffizienten (R) von 1 und einen p-Wert von » 0,05. Daraus lässt sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenz erkennen. Mithilfe der angegebenen Geradengleichungen von $y = -190 + 3,8x$ und $y = -190 + 3,8x$ für die jeweiligen Messungen konnten die Konzentrationen der gemessenen viralen RNA-Standards berechnet werden. Die Mittelwerte von jeweils 5 Messungen pro Standard sind zusammen mit den daraus resultierenden Kopie-Zahlen der einzelnen RNA-Moleküle/µl in Tabelle ?? angegeben.

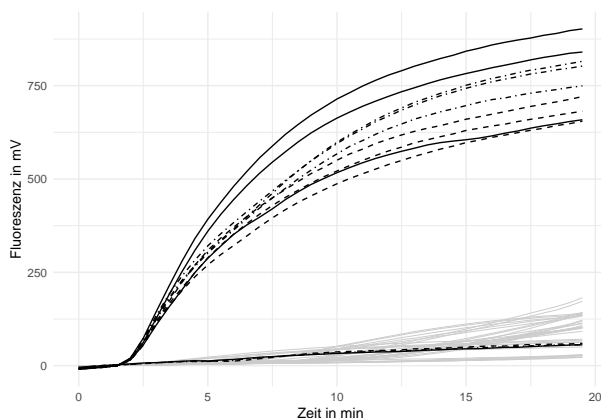
1.2.2 Entwicklung der InfA-RPA Primer

Modifiziert wie in Kapitel ?? beschrieben. Modifiziert wie in Kapitel ?? beschrieben.

Tabelle 2: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza A RT-RPA

Name	Sequenz (5' -> 3')	3'-Position	Modifikation
Mit PrimedRPA designte Primer (siehe ??)			
Sonde 1.2	GGCTCTCATGGAATGGTTAAAGACAAGACCAAT 12 T 3 GTCACCTYTGACTA	182 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 3.1	GGRAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATG 12 A 3 TGGCTAAAGACAA	158 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Forward 1	CCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTKG	98 bp	
Forward 2	CTTCTTACCGAGGTGCGAAACGTATGTTCT	48 bp	
Forward 3	GGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACT	96 bp	
Reverse 1.1	GCACGGTGAGCGTGAACACAAACCCTAAAA	189 bp	
Reverse 1.4	TGGGCACGGTGAGCGTGAACAAAMCCTA	192 bp	
Reverse 1.8	AGCGTCTACGCTGCAGCCCTCGCTCACTGG	219 bp	
Reverse 3.1	AAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACARAATTGG	161 bp	
Reverse 3.2	CCTAAAATTCCCTTAGTCAGAGGTGACAAARAT	164 bp	
Primer/Sonden modifiziert nach Ehnts (2013)			
Sonde E	TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAA 12 Y 3 TGTCACCTCTGACTAAGGG	186 bp	Fluorophor: FAM/ Atto-565 Quencher: BMQ-535**
Forward E	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGY	149 bp	
Forward E.2	RAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	148 bp	
Forward E.3	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGG	148 bp	
Reverse E	CGTCTACGCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA	216 bp	

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



1.2.3 Optimierung InfA

Verringerung des Reaktionsvolumen (8tel Ansatz)

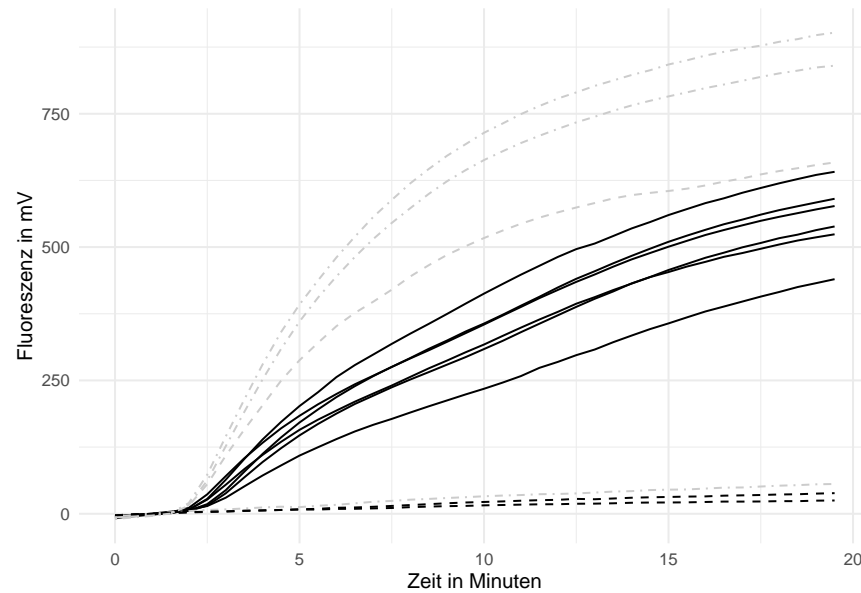


Abbildung 9: **Optimierung des Reaktionsvolumens der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 8tel-Ansatz (**schwarz**) bei 42 °C in n=6 (siehe ??8telRPA)) mit dem in 1.2.2 angegebenen Primer-Sonden-Set. Als Virus_RNA wurden 10^8 RNA-Kopien des Standards eingesetzt. Als Referenz wurde der 50 µl Ansatz (grau) mit den gleichen Reaktionsparametern in n=3 mitgeführt. Alle Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet.

Optimierung der Reaktionstemperatur

1.2.4 InfA Sensitivität

1.2.5 Entwicklung der InfB-RPA Primer

- Tabelle mit allen getesteten Primern und Sonden + auf die Primer und sonden in Methoden verweisen?
 - oder die Sonden aus dem Methoden teil mir rein zu nehmen und da raus nehmen
- Graphen der Tests (grau und die guten farbig)
- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
 - wenn sensitivität dann auch Spezifität

1.2.6 Optimierung der Infb-RPA

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt

1.2.7 Primerassymetrie

- soll ich hier dann noch das Experiment zum bestätigen der Assymetrie mit rein nehmen? oder extra Punkt

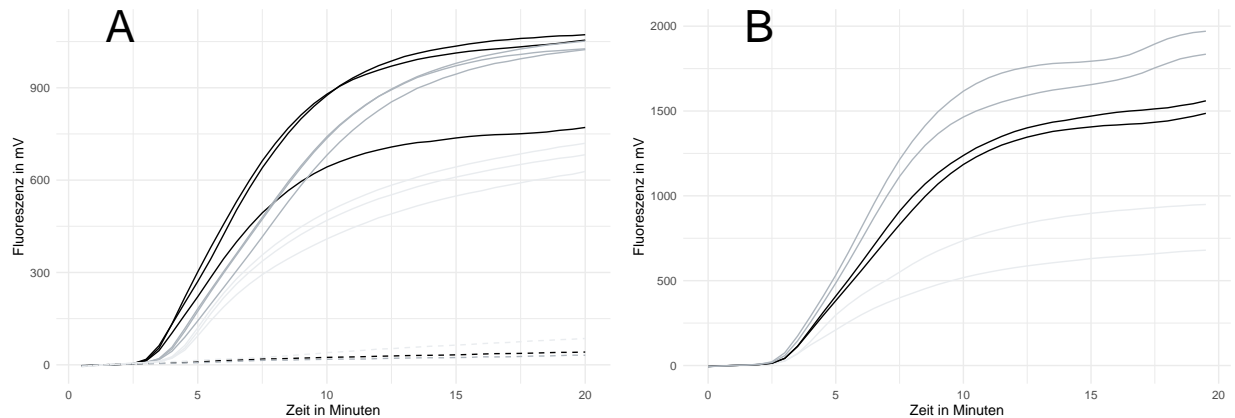


Abbildung 10: **Optimierung der Reaktionstemperatur und der Primerassymetrie der Influenza A RT-RPA:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza A RT-RPA im 50 µl Ansatz. **A:** Optimierung der Reaktionstemperatur bei 38 °C (hellgrau), 40 °C (grau) und 42 °C (schwarz). Messung in n=3 pro Temperatur. Negativkontrollen sind mit (- - -) gekennzeichnet. **B:** Optimierung der Primerassymetrie mit 1,5x erhöhter Reverse Primer-Konzentration (schwarz) und 2X erhöhter Reverse Primer-Konzentration (grau) sowie mitgeführter Referenz (hellgrau, 1X Primer-Konzentration). Messung in n=2 pro Konzentration.

1.2.8 Sensitisanalysen und Vergleich

- Sensitivität mit allen Optimierungsparametern Stel Ansatz gegenüberstellen
 - weil literatur sagt, dass dadurch eine Erhöhung der Sensitivität erhalten werden kann
- Sensitivität PCR und RPA gegenüberstellen

1.2.9 Spezifität

- Spezifität

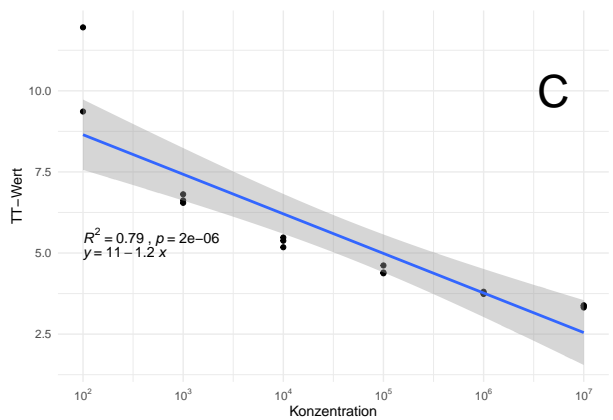
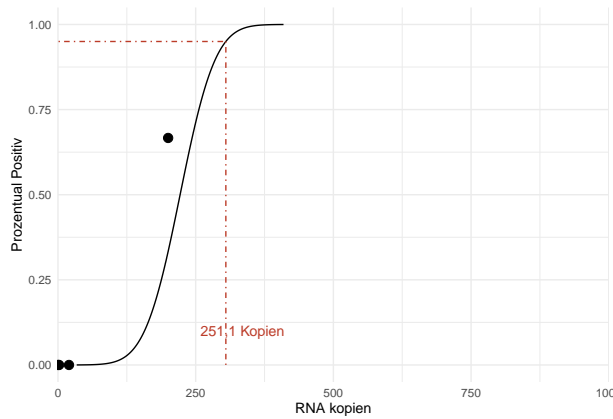
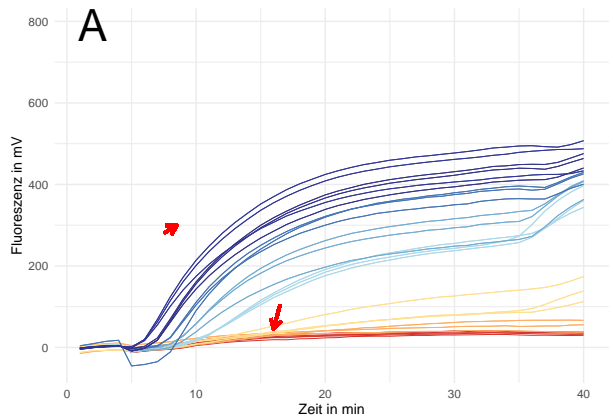
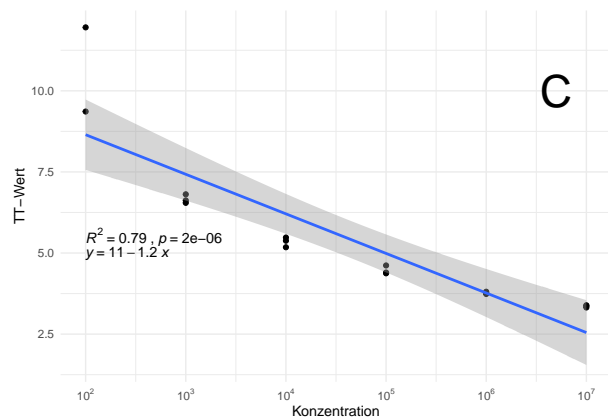
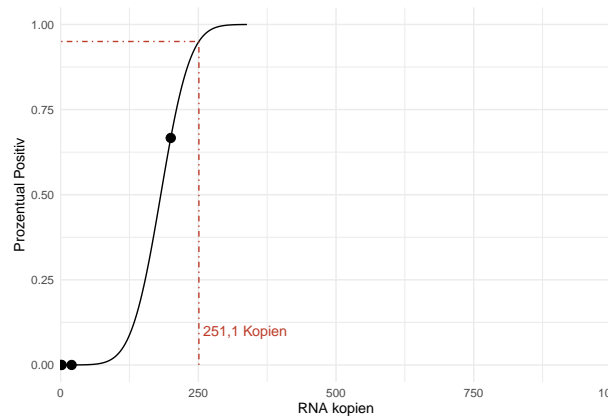
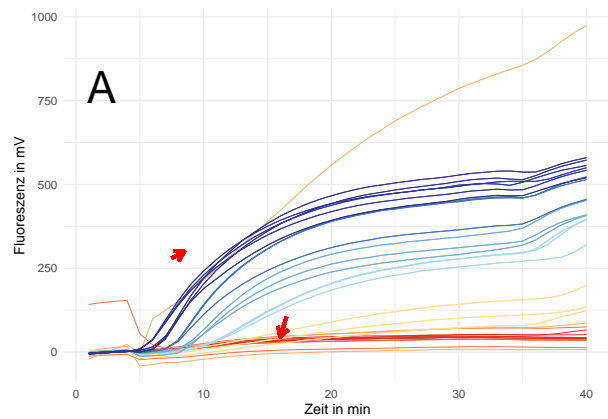
1.3 Influenza A

1.3.1 Entwicklung der InfA-RPA Primer

- Tabelle mit allen getesteten Primern und Sonden + auf die Primer und sonden in Methoden verweisen?
 - oder die Sonden aus dem Methoden teil mir rein zu nehmen und da raus nehmen
- Graphen der Tests (grau und die guten farbig)
- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
 - wenn sensitivität dann auch Spezifität

1.3.2 Optimierung der InfbARPA

- Stel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt
- Primerassymetrie



1.3.3 Sensitivitätsanalysen und Vergleich

- Sensitivitätstest und vergleich mit PCR

1.3.4 Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA

- Test mit neuer Sonde
- Sensitivitätsvergleich

Spezifitätstest

Ehnts, Kai Ilmo. 2013. "Entwicklung von Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Nachweisverfahren Für Virale Erreger von Atemwegsinfektionen." *Dissertation Der Medizinischen Fakultät Der Georg-August-Universität Zu Göttingen*. <https://doi.org/10.53846/goediss-3943>.