**Inhaltsverzeichnis**

[1 Diskussion 2](#_Toc13927)

[1.1 Design der Primer und deren Einfluss auf die RT-RPA 2](#_Toc13928)

[1.2 Vorteile der low-Volume RPA hinsichtlich Mischzeitpunkt und Sensitivität 4](#_Toc13929)

[1.3 Vergleich der ermittelten Sensivitäten mit PCR-Assays 5](#_Toc13930)

[1.4 Entwicklung der asymmetrischen *real time* RT-RPA 7](#_Toc13931)

[1.5 Diskussion Sondeneinfluss 7](#_Toc13932)

[1.6 Diskussion ditch 7](#_Toc13933)

[1.7 Diskussion R-PRogramm 8](#_Toc13934)

[2 Zusammenfassung und Ausblick 8](#_Toc13935)

# Diskussion

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

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

Es konnten RT-RPA’s für die Detektion der Influenza A und B Viren entwickelt werden, wobei die Influenza B RT-RPA als Pan-Influenza B Nachweis dient und die Influenza A RT-RPA die Subtypen H1N1 und H3N2

Detektieren kann. Des Weiteren konnte ein positiver Effekt einer Primerasymmetrie auf die RPA festgestellt werden, welcher jedoch im Zusammenhang mit der Hybridisierungsposition der Sonde steht. Ebenfalls konnte anhand der Influenza A RT-RPA ein Einfluss des Sondendesings hinsichtlich *dt-Quenched* und *internally Quenched* festgestellt werden, wobei die *dt-Quenched* Sonde zu einer erhöhten Sensitivität im Vergleich zu der *internally Quenched* Sonde führt.

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

Bei der Wahl des Amplifikationsbereiches für die Influenza B RT-RPA wurde sich für das Genomsegment 8 entschieden. Dabei wurde sich an der Literatur von RT-PCR Systemen orientiert (Goffard et al. 2008; NCIRD 2021). Da bei Influenza B im Gegensatz zu Influenza A eine geringere Mutationsrate vorliegt und zusätzlich keine großen Antigenen Veränderungen der Oberflächenproteine beobachtet wurden (Chen and Holmes

2008; Paterson et al. 2003) konnten wie in Kapitel **??** angegeben keine Differenzen zwischen verschiedenen Stämmen in dem entsprechenden Genomsegment festgestellt werden. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der gewählte Amplifikationsbereich geeignet ist alle Viruslinen zu Detektieren. Dieses wird durch @Nakauchi2014 bestätigt, welcher für die Differenzierung von der Victoria- und Yamagata-Linie das HA-Protein auf dem Genomsegment 4 verwendet [@Nakauchi2014].

Als Amplifikationsbereich für die Influenza A RT-RPA wurde das M1-Gen auf dem Genomsegment 7 gewählt, da es durch seine Funktion das am stärksten Konservierte Gen ist (McCauley and Mahy 1983). Zusätzlich wurde sich an der Literatur für RT-PCR Systeme orientiert welche ebenfalls das M1-Gen zur Detektion

Amplifizieren (Daum et al. 2007; Suwannakarn et al. 2008; NCIRD 2021). Trotz der Konserviertheit des Gens besitzt das Alignement zwischen den Subtypen H1N1 und H3N2 etliche Basenfehlpaarungen, wobei die größte Homologie im Bereich zwischen 10 bp und 250 bp zu beobachten ist (siehe Abbildung 1). Aus diesem Grund befinden sich alle vom PrimedRPA designten und von Ehnts (2013) entwickelten Primer (siehe Tabelle **??**) in diesem Bereich.

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

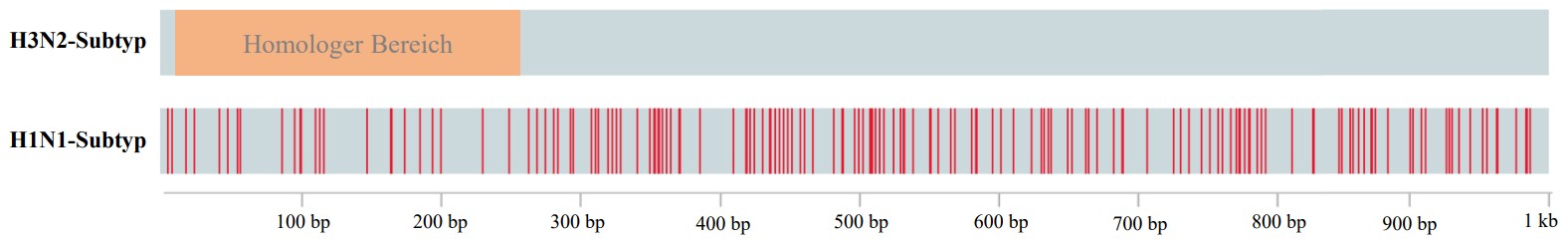


Abbildung 1: **Alignment zwischen den Influenza A H1N1- und H3N2-Subtyp:** Aligntment des Genomsegmentes 7 zwischen dem H1N1-Subtyp und dem H3N2-Subtyp. Der unterste Balken gibt die Sequenzlänge in bp an. Die roten Striche stehen für Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Genomsegmenten. Der orange markierte Bereich gibt den Sequenzabschnitt mit der größten Homologie an.

Wie in Abbidung **??** zu erkennen ist, sind die vom PrimedRPA Programm designten Primer für das Influenza A Virus aufgrund ihrer niedrigen Fluoreszenz und ihres späten Anstiegs unfunktionell. Betrachtet man hingegen das Primerscreening für die Influenza B RT-RPA (siehe Abbildung **??**) zeigen alle entwickelten Primer-Sonden-Kombination eine Amplifikation und sind theoretisch funktionell. Somit ist eine deutliche Differenz hinsichtlich der Funktionalität des PrimedRPA Programms für die Entwicklung von Primer-SondenKombinationen zu beobachten. Dies könnte an den verwendeten Sequenzvorlagen liegen, da bei Influenza A im Gegensatz zu Influenza B zwei nicht vollständig Homologe Sequenzen als Vorlage verwendet wurden. Dies führte dazu, dass die entwickelten Primer und Sonden bis zu 3 Basenfehlpaarungen je nach Subtyp aufweisen. Jedoch konnte in der Literatur gezeigt werden, dass bis zu 6 Fehlpaarungen in den Primer die RPA nicht unfunktionell werden lassen (Boyle et al. 2013). Des Weiteren wurde durch Higgins et al. (2022) und Daher et al. (2015) gezeigt, dass vor allem Missmatches am 3’ und 5’-Ende des Primers die RPA inhibieren, welche nur bei dem Forward 1 Primer auftrat und durch eine degenerierte Base teilweise vermieden wurde (Higgins et al. 2022; Daher et al. 2015). Interessanterweise besitzt das von Ehnts (2013) entwickelte RPA-System am 3’-Ende eine Basenfehlpaarung, welche ebenfalls durch eine degenerierte Base ausgeglichen wurde. Jedoch besitzt diese Primer-Sonden-Kombination von allen getestet Kombinationen die beste Amplifikation. Durch die alternativen forward Primer (E.2 und E.3) wurde versucht, diese Fehlpaarung zu gänzlich zu vermeiden, jedoch liegt die Amplifikation nahezu gleich bzw. leicht hinter den von Ehnts (2013) entwickelten Primern und Sonde. Dies Spricht gegen die Beobachtungen Higgins et al. (2022) und Daher et al. (2015) jedoch wurden in den beiden Studien nur Fehlpaarungen in den Primer untersucht (Higgins et al. 2022; Daher et al. 2015). Liu et al. (2019) konnte zeigen, dass Missmatches in der Sonde zu einer vollständigen Inhibierung und sogar zu falsch positiven Amplifikationen der RPA führen können (Liu et al. 2019). Das könnte eine Erklärung zur großen Diskrepanz, zwischen dem von Ehnts (2013) entwickelten RPA-System und dem mit PrimedRPA designten Primer-Sonden-Kombinationen sein. Eventuell führt die Verteilung der Basenfehlpaarungen in den PrimedRPA-Sonden zu einer unfunktionellen RT-RPA während die von Ehnts (2013) entworfene Sonde nur bedingt inhibierende Fehlpaarungen aufweist. Des Weiteren ist bei dem Primerscreening der Influenza B RT-RPA (siehe Abbildung **??**) am Beispiel der beiden getesteten Sonden zu erkennen, dass nicht nur Basenfehlpaarungen sondern auch andere Einflüsse zu unterschiedlicher RPA-Performance führen. So kann

Einerseits die Hybridisierungsposition der Sonde im gleichen Amplifikationsbereich zu einer signifikanten Veränderung der Amplifikation führen (Liu et al. 2019). Andererseits kann die zu detektierende RNA, durch Bildung von Sekundärstrukturen die Amplifikation behindern (Saisuk et al. 2019). So konnte Beispielweise Wei and To (2003) innerhalb einer PCR zeigen, dass eine RNA-Sekundärstruktur trotz der hohen Temperaturen in der PCR die Amplifikation inhibierte (Wei and To 2003).

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

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

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

## Vorteile der low-Volume RPA hinsichtlich Mischzeitpunkt und Sensitivität

Wie in **??** erwähnt kommt es, während der RPA durch geringe Thermische Konfektion und durch den crowding Agent erschwerte Diffusion zu lokaler Reagenzien-Knappheit. Um dem entgegen zu wirken, wird ein zusätzlicher Mischschritt während der Reaktion durchgeführt, welcher zu einer erneuten Homogenisierung der Reaktion führt (Lillis et al. 2016). Lillis et al. (2016) konnte jedoch zeigen, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens auf 5 µl die Notwendigkeit des zusätzlichen Mischschrittes minimiert (Lillis et al. 2016). Wie in **??** gezeigt, konnte ein ähnliches Verhalten mit der low-Volume RPA anhand der Influenza B RT-RPA beobachtet werden. Hier wurde das Reaktionvolumen auf 6,5 µl angepasst was einem leicht höheren Volumen als dem von Lillis et al. (2016) entspricht. Jedoch stellt sich im Vergleich zwischen den Mischzeiten des 50 µl Ansatzes und der low-volume RPA heraus, dass der Mischschritt bei der low-volume RPA erst einen deutlichen Einfluss bei 101 RNA-Kopien ausübt (siehe Abbildung **??**) und die maximale Fluoreszenz und die Anzahl der positiven Amplifikationen deutlich verbessert. Im 50 µl Ansatz hingegen kann schon eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenz und eine große Verbesserung des TT-Wertes bei 104 RNA-Kopien beobachtet werden. Diese Beobachtung stimmen mit den von Lillis et al. (2016) überein. Eine mögliche Begründung liegt darin, dass einerseits durch das verringerte Volumen ein größeres Verhältnis zwischen hinzugefügter Probe und Reaktionsmix besteht und dadurch eine bessere Diffusion zwischen den beiden Komponenten stattfindet. Andererseits führt das geringere Volumen zu einem größeren Oberflächen-Volumen Verhältnis, welches zu einer besseren Wärmeübertragung und dementsprechend einer stärkeren Konvektion führt (Böckh and Wetzel 2017).

Des Weiteren konnte anhand der Influenza B RT-RPA beobachtet werden, dass eine Reduktion des Reaktionsvolumens zu einer deutlichen Sensitivitätserhöhung von über 50 % führt. Der gleiche Effekt konnte, wenn auch nicht so stark konnte ebenfalls durch Lillis et al. (2016) nachgewiesen werden. Ob es sich hierbei um eine signifikante Änderung handelt, muss in einer weiteren Versuchsreihe bestätigt werden, da das Detektionslimit in dieser Arbeit für den 50 µl Ansatz nur in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Dieses Phänomen der Sensitivitätsverbesserung lässt sich ebenfalls durch das erhöhte Verhältnis zwischen eingesetzter Probe und RPA-Reaktion und der erhöhten Konvektion erklären.

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

Durch das verringerte Reaktionsvolumen von 6,5 µl eignet sich die low-Volume RPA für den Einsatz in der

Mikrofluidik, wo sie mit 3D-gedruckten Detektionschips kombiniert werden kann (Behrmann, Hügle, et al.

2020). Dadurch erweitern sich ihre Applikationsmöglichkeiten in der POCT und Testsysteme können vereinfacht und verbessert werden (Behrmann, Bachmann, et al. 2020).

Es konnte beobachtet werden, dass große Mengen an DNA die RPA inhibieren (Li, Macdonald, and Stetten

2019; Rohrman and Richards-Kortum 2015) und diese Inhibierung konzentrationsabhängig von der DNA-

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

2016; Behrmann, Bachmann, et al. 2020), wodurch eine Adaption auf DNA basierte RPA’s noch unklar ist.

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

## Vergleich der ermittelten Sensitivitäten mit PCR-Assays

Wie in Kapitel **??** beschrieben liegt das Detektionslimit der optimierten low-Volume RT-RPA für den Influenza B Virus bei 14,6 RNA-Kopien. Im Vergleich zu der getesteten RT-PCR vom NCIRD (2021) konnte eine Differenz von nur 3 Kopien festgestellt werden, wobei die Unterschiede im Konzentrations-Bereich von 2∗100 RNA-Kopien liegen. In diesen Sensitivitätsbereich spielt einerseits die zufällige Diffusion eine Rolle, welche bestimmt ob die einzelnen Reaktionskomponenten miteinander Interagieren sowie minimale Ungenauigkeiten bei der Verdünnung der RNA-standards, welche dazu führen, dass keine Nachweisbaren RNA-Kopien in dem eingesetzten Probenvolumen enthalten sind. Andererseits zeigen Nukleinsäuren eine Adsorption an die verwendeten Polypropylen-Tubes (Zandieh, Patel, and Liu 2022), welches sie für die RPA-Reaktion unzugänglich machen und gerade bei geringen Kopienzahlen einen Einfluss haben. Veranschaulicht werden diese Effekte in Abbildung **??**D. Hier zeigt eine Messung, bei welcher durch zufällige Diffusion die Reaktionskomponenten miteinander interagieren konnten, einen deutlichen Anstieg, während alle anderen Messungen keine Signalveränderung aufweisen. Dementsprechend lässt sich sagen, dass die entwickelte RT-RPA für das Influenza B Virus der PCR als Goldstandard ebenbürtig ist. Bei dem Sensitivitätsvergleich mit der Literatur liegt das Detektionslimit der RT-RPA ebenfalls leicht unter dem von vergleichbaren PCR-Systemen (Ni et al. 2021; Shu et al. 2020; Wu et al. 2008) und ähnlich wie ein RPA-Vergleichssystem (Liang et al. 2022).

Das Detektionslimit der optimierten Influenza A RT-RPA liegt im Gegensatz zur Influenza B RT-RPA weit hinter der Sensitivität der getesteten RT-PCR (siehe Tabelle **??**) und rund 10-100 mal über den Detektionslimits von PCR- und RPA-Assays in der Literatur (Wu et al. 2008; Ni et al. 2021; Liang et al. 2022). Das vergleichsweise hohe Detektionslimit der Influenza A RT-RPA lässt sich wie in 1.1 diskutiert durch die erhöhte Anzahl an Basenfehlpaarungen in Primern und Sonde sowie eventuelle Bildung von Sekundärstrukturen erklären.

Wird das Detektionslimit in simulierten Kontrollproben für die Influenza A und B RT-RPA betrachtet fällt auf, dass es in Influenza B zu einer deutlichen Verschlechterung des Detektionslimits kommt (siehe Tabelle **??**), während Influenza A scheinbar keine Beeinflussung erfährt (siehe Tabelle **??**). Dieses Phänomen könnte an den unterschiedlichen Reaktionsvolumen der verschiedenen RPA-Assays zusammen mit dem eingeführten humanen Hintergrund liegen. Wie in 1.2 erwähnt, können große Mengen an genomischer DNA die RPA inhibieren. Dabei hänge die Inhibierung neben der Konzentration der genomischen DNA auch von der Konzentration des eingesetzten zu amplifizierenden Materials ab (Rohrman and Richards-Kortum 2015). Da das verwendete QiAamp Viral RNA Mini Kits zum Erhalt des humanen Probenhintergrunds keinen

DNAse-Verdau Schritt durchführt (siehe unten **??**) bleibt die genomische DNA in den Extrakten erhalten. Dementsprechend könnte durch das höhere Proben-Reaktion-Verhältnis im low-volume Ansatz schon geringere Mengen an genomischer DNA bei niedrigen Konzentrationen die beobachtete Inhibierung zur Folge haben, während der 50 µl Ansatz durch sein höheres Volumen keine Inhibierung aufweist. Der Arbeit von Rohrman and Richards-Kortum (2015) zufolge sorgt eine DNA-konzentration von 500 ng bei Template-Konzentrationen von 102 Kopien für eine komplette Inhibierung der RPA. Rechnet man die Konzentration der genomischen DNA auf den low-volume Ansatz runter, würden 62,5 ng ausreichen, um eine vollständige Inhibierung auszulösen. Die ermittelte Konzentration der Kontrollproben liegt bei rund 45 ng/µl (siehe Kapitel **??**) und somit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Zusätzlich sorgt das erhöhte Proben-Reaktion-Verhältnis zu einem höheren genomischen DNA Verhältnis im Vergleich zur RPA-Reaktion was die benötigte Konzentration zur Inhibierung abermals Senkt. Dementsprechend ist eine Inhibierung der RPA im low-volume Ansatz bei niedrigen Kopien-Anzahlen plausibel.

Eine mögliche Erklärung für die Inhibierung der RPA bei hohen DNA-Konzentrationen könnten dabei bei illegitimen Primer- oder Sonden-Hybridisierungen liegen. Durch die vergleichsweise niedrige Temperatur der RPA können Fehlbildungen der Primer und Sonden an die genomische DNA vorkommen, wodurch sie für die eigentliche Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Dieser Effekt würde dabei stark von der Konzentration der Ziel-DNA abhängig sein, da höhere Template-Konzentrationen bei gleichbleibenden genomischen Hintergrund zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine spezifische Primer-Bindung führen. Um dem entgegenzuwirken müsste die genomische Hintergrund-DNA Verhältnismäßig erhöhte werden um die Wahrscheinlichkeit für spezifische Bindungen zu reduzieren. Diese Verhältnismäßigkeit wurde von Rohrman and Richards-Kortum (2015) beobachtet, welches die Hypothese bekräftigt. Jedoch konnte zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit keine Bestätigung der Hypothese in der Literatur gefunden werden.

Die in der Literatur beschrieben Viruslasten für die Influenza A Subtypen liegen bei bei allen Altersgruppen im Mittelwert bei rund 103,5 Virus Kopien/µl (H1N1) und 103,3 Virus Kopien/µl (H3N2) (Alves et al. 2020; Ngaosuwankul et al. 2010) wobei eine Ausnahme die Patientengruppe unter zwei Jahren mit 102,67 Virus Kopien/µl (H1N1) bildet (Alves et al. 2020). Die beste Entnahmemethode sind dabei Nasopharyngeal-

Abstriche, welche im Durchschnitt 105,0 Virus Kopien/µl Enthalten, während Nasal-Abstriche mit 103,8 Virus Kopien/µl und Rachen-Abstriche mit 103,4 Virus Kopien/µl deutlich geringere Viruslasten aufweisen

(Ngaosuwankul et al. 2010). Die für die Influenza A ermittelte Sensitivität in den simulierten Kontrollproben kann mit einem Detektionslimit von 147,5 RNA-Kopien für beide Subtypen (siehe Tabelle **??**) im Durschnitt alle Patientenproben nachweisen. Eventuelle Komplikationen könnten bei Patienten unter zwei Jahren aufkommen, da die Viruslast nahe an der Detektionsgrenze liegt. Für eine sichere Detektion ist Generell ein Nasopharyngeal-Abstrich durchzuführen, da hier im Durchschnitt die größte Viruslast erlangt wird und somit ein eventuelle Annährung an das Detektionslimit vermieden werden kann. Für Influenza B konnte in einer Studie von Alves et al. (2019) eine durchschnittliche Viruslast in allen Altersgruppen von 103,5 Virus Kopien/µl festgestellt werden. Ausnahme bildeten dabei Patienten über 59 Jahren, da hier nur ein Datensatz verfügbar war und somit keine einheitliche Aussage getätigt werden kann (Alves et al. 2019). Eine andere Studie von Tsou et al. (2012) untersuchte die Viruslast speziell bei Kindern und konnte im Durschnitt sehr geringe Werte von Durchschnittlich 3,9 Virus Kopien/µl feststellen. Jedoch wurden innerhalb dieser Studie große Schwankungen innerhalb der Viruslast festgestellt (zwischen 45 und 2∗106 Virus Kopien/ml) sowie eine negative Korrelation zwischen Viruslast und Zeitpunkt der Probenentnahme (Tsou et al. 2012). Das mit der reinen, artifiziellen Standard RNA ermittelte Detektionslimit für die Influenza B RT-RPA wäre mit 14,6 RNA-Kopien (siehe Tabelle **??**) in der Lage die meisten Patientenproben zu detektieren. Betrachtet man jedoch die starken Verlust der Sensitivität bei den simulierten Kontrollproben können Komplikationen gerade bei Kinderpatienten auftreten. Hier liegt das ermittelte Detektionslimit von 1397 RNA-Kopien (siehe Tabelle **??**) weit über der von Tsou et al. (2012) ermittelten Viruslast. Nach Alves et al. (2019) könnten zwar alle Patienten inklusive Patienten unter zwei Jahren im Durchschnitt Detektiert werden, jedoch befindet sich hier die Viruslast nahe am Detektionslimit. Generell lässt sich sagen, dass die entwickelte Influenza B RT-RPA ein zu hohes Detektionslimit besitzt um zuverlässig Influenza B Detektieren zu können. Eine eventuelle Verbesserung des Detektionslimits in einem humanen DNA-Hintergrund könnte durch die Verwendung des 50 µl Ansatzes erreicht werden, jedoch müsste dies in weiteren Versuchen bestätigt werden. Zusätzlich sollte, um eine möglichst zuverlässige Detektion zu ermöglichen eine zeitnahe Proben Entnahme erfolgen, um möglichst hohe Viruslasten zu erreichen (Tsou et al. 2012).

## Entwicklung der asymmetrischen *real time* RT-RPA

Wie den Kapiteln **??** und **??** festgestellt, führt eine asymmetrische Erhöhung des reverse Primer zu einer erhöhten Fluoreszenz, wobei die Verteilung der Primer-Asymmetrie von der Hybridisierungposition der Sonde

(sense- oder antisense-Strang) abhängt. Wie in Kapitel **??** beschrieben sorgt die ungleiche Verteilung der Primer dazu, dass im Verlauf der Reaktion einzelsträngige DNA entsteht. Dabei wurde die asymmetrische Primerverteilung innerhalb der RPA von Wang et al. (2019) beschrieben um *Fusarium proliferatum* mittels eines enzymkatalysiertem Farbumschlags nachzuweisen (Wang et al. 2019). Sollweck, Schwaiger, and Seidel (2021) kombinierte die asymmetrische RPA um mit der entstandenen einzelsträningen DNA ein Nachweis mittels Microarry durchzuführen (Sollweck, Schwaiger, and Seidel 2021). Derzeit ist die Verwendung einer asymmetrischen Primerverteilung im Kombination mit fluoresznezmarkierten Sonden in der Literatur nur innerhalb der qPCR bekannt. So konnte Poddar (2000) mithilfe von Molecuar Beacons nachweisen, dass durch die Primerasymmetrie das zur Sonde komplementäre Stück zusätzlich als einzelsträninge DNA und somit vermehrt vorliegt. Dadurch konnte der Molecular Beacon vermehrt hybridisieren und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen (Poddar 2000). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von Poddar (2000) beschriebene Prinzip auf die RPA mittels Exo-Sonden anwendbar ist. Durch die gewählte Primer-Asymmetrie wird das zur Exo-Sonde komplimentäre Stück

Wang et al. (2019) assymetrische RPA erklärt Sollweck, Schwaiger, and Seidel (2021) Kober, Niessner, and

Seidel (2018a) asyymetrische RPA microarray

## Diskussion Sondeneinfluss

## Diskussion ditch

Temperatur und Ditching

## Diskussion R-PRogramm

am Beispiel vom Influenza A Primer Screening (grau) und Inf B mischen (bild C 101)

# Zusammenfassung und Ausblick

Glökler et al. (2021) –> RPA als vorherrschende und beste Methode, da sie viel kombiniert (großer Vergleich mit anderen isothermen Amplifikationen) Lutz et al. (2010) ditch erstmals erwähnt Faye et al. (2021) dt Probe design Kober, Niessner, and Seidel (2018b) asymmetric RPA

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

* Primer design
  + Influenza B (gibt nicht viel zu diskutieren, hat super geklappt)

-> warum gewähltes target

* + Influenza A (warum hat es nicht geklappt)

-> genomstruktur (macht sone schleife, mal in eigenhybridisierungs ding hauen )

* Optimierungen (warum wurden die Parameter so gewählt)
  + Influenza A
  + Influenza B –> lab on Chip mit 8tel Ansatz
  + wie wichtig ist Mischen am Beispiel in InfB
* Sensitivitätsanalysen
  + Vergleich mit PCR
  + Vergleich 50µl und 8tel-Ansatz -> welche Vorteile hat 8tel-Ansatz
  + Sensitivität im Klinischen Background reicht das für klinische Proben
* Spezifität
* R-Programm
  + unterschiede zwischen RPA und PCR

-> Mischen (evtl. Lücke in den Daten)

-> Negativkontrolle (leicher linearer Anstieg)

-> Überexponentielle Amplifikation oder linearer Anstieg (nicht immer Sigmoidale Kurve, hängt mich dem Mechanismus zusammen)

-> ditching

* + Wie wirken sich die Unterschiede auf die Tests aus

-> Normalverteilung (sehr wichtig, kann aber auch bei PCR sein, wurde nicht getestet)

-> linear Regression test (wird rausgelassen)

-> resids growth test

* + mögliche Lösungen

-> algorhytmus für ditching

-> normalverteilung anpassen

-> threshold diskutieren

* Assymetrie
  + Warum hat die Assymetrie so einen Erfolg
  + Warum macht die Assymetrie so großes Ditching
* Sondendesign
  + warum ist dt-besser

Alves, Vitória Rodrigues Guimarães, Ana Helena Perosa, Luciano Kleber de Souza Luna, Jessica Santiago

Cruz, Danielle Dias Conte, and Nancy Bellei. 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>.

Alves, Vitória Rodrigues Guimarães, Luciano Kleber de Souza Luna, Jessica Santiago Cruz, Ana Helena

Perosa, and Nancy Bellei. 2019. “Influenza b Viral Load Analysis in Patients with Acute Respiratory Infection from a Tertiary Hospital in Brazil.” *Journal of Medical Virology* 92 (8): 1350–54. [https://doi.or g/10.1002/jmv.25648](https://doi.org/10.1002/jmv.25648).

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).” *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–54. [https://doi.org/10.1093/clin chem/hvaa116](https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116).

Behrmann, Ole, Matthias Hügle, Franz Eckardt, Iris Bachmann, Cecilia Heller, Marina Schramm, Carrie

Turner, Frank Hufert, and Gregory Dame. 2020. “3d Printed Monolithic Microreactors for Real-Time

Detection of Klebsiella Pneumoniae and the Resistance Gene blaNDM-1 by Recombinase Polymerase Amplification.” *Micromachines* 11 (6): 595. <https://doi.org/10.3390/mi11060595>.

Böckh, Peter von, and Thomas Wetzel. 2017. “Freie Konvektion.” In *Wärmeübertragung*, 141–54. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-55480-7_4>.

Boyle, David S., Dara A. Lehman, Lorraine Lillis, Dylan Peterson, Mitra Singhal, Niall Armes, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, and Julie Overbaugh. 2013. “Rapid Detection of HIV-1 Proviral DNA for Early Infant Diagnosis Using Recombinase Polymerase Amplification.” Edited by Gary J. Nabel. *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00135-13>.

Chen, Rubing, and Edward C. Holmes. 2008. “The Evolutionary Dynamics of Human Influenza b Virus.” *Journal of Molecular Evolution* 66 (6): 655–63. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>.

Clancy, Eoin, Owen Higgins, Matthew S. Forrest, Teck Wee Boo, Martin Cormican, Thomas Barry, Olaf

Piepenburg, and Terry J. Smith. 2015. “Development of a Rapid Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Streptococcus Pneumoniae in Whole Blood.” *BMC Infectious Diseases* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1212-5>.

Daher, Rana K., Gale Stewart, Maurice Boissinot, Dominique K. Boudreau, and Michel G. Bergeron. 2015.

“Influence of Sequence Mismatches on the Specificity of Recombinase Polymerase Amplification Technology.” *Molecular and Cellular Probes* 29 (2): 116–21. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.11.005>.

Daum, Luke T., Linda C. Canas, Bernard P. Arulanandam, Debra Niemeyer, James J. Valdes, and James P. Chambers. 2007. “Real-Time RT-PCR Assays for Type and Subtype Detection of Influenza a and b Viruses.” *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1 (4): 167–75. [https://doi.org/10.1111/j.17502659.2007.00024.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2007.00024.x).

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

Faye, Martin, Ahmed Abd El Wahed, Oumar Faye, Jonas Kissenkötter, Bernd Hoffmann, Amadou Alpha Sall, and Ousmane Faye. 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>.

Glökler, Jörn, Theam Soon Lim, Jeunice Ida, and Marcus Frohme. 2021. “Isothermal Amplifications – a Comprehensive Review on Current Methods.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 56 (6): 543–86. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1937927>.

Goffard, A., A.-S. Beugin, D. Hober, J. Ogiez, and A. Dewilde. 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): 482–86. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.07.030>.

Higgins, Matthew, Oliver W. Stringer, Daniel Ward, Jennifer M. Andrews, Matthew S. Forrest, Susana Campino, and Taane G. Clark. 2022. “Characterizing the Impact of Primer-Template Mismatches on Recombinase Polymerase Amplification.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 24 (11): 1207–16. [https:](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005)

[//doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.08.005).

Jiang, Nan, Natha Dean Tansukawat, Laura Gonzalez-Macia, H. Ceren Ates, Can Dincer, Firat Güder, Savas Tasoglu, and Ali K. Yetisen. 2021. “Low-Cost Optical Assays for Point-of-Care Diagnosis in ResourceLimited Settings.” *ACS Sensors* 6 (6): 2108–24. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00669>.

Kober, Catharina, Reinhard Niessner, and Michael Seidel. 2018b. “Quantification of Viable and Non-Viable Legionella Spp. By Heterogeneous Asymmetric Recombinase Polymerase Amplification (haRPA) on a Flow-Based Chemiluminescence Microarray.” *Biosensors and Bioelectronics* 100 (February): 49–55. [https:](https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.053)

[//doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.053](https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.053).

———. 2018a. “Quantification of Viable and Non-Viable Legionella Spp. By Heterogeneous Asymmetric Recombinase Polymerase Amplification (haRPA) on a Flow-Based Chemiluminescence Microarray.” *Biosensors and Bioelectronics* 100 (February): 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.053>.

Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix von Stetten. 2019. “Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification.” *The Analyst* 144 (1): 31–67. [https://doi.or g/10.1039/c8an01621f](https://doi.org/10.1039/c8an01621f).

Liang, Li-Guo, Miao-jin Zhu, Rui He, Dan-Rong Shi, Rui Luo, Jia Ji, Lin-Fang Cheng, et al. 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, 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/10.101 6/j.mcp.2016.01.009](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009).

Linhart, Chaim, and Ron Shamir. 2005. “The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications.” *Journal of Computational Biology* 12 (4): 431–56. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>.

Liu, Xiaoqing, Qiongying Yan, Jianfei Huang, Jing Chen, Zhengyang Guo, Zhongdong Liu, Lin Cai, et al.

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>.

Lutz, Sascha, Patrick Weber, Max Focke, Bernd Faltin, Jochen Hoffmann, Claas Müller, Daniel Mark, et al.

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>.

McCauley, J W, and B W J Mahy. 1983. “Structure and Function of the Influenza Virus Genome.” *Biochemical Journal* 211 (2): 281–94. <https://doi.org/10.1042/bj2110281>.

Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5>.

NCIRD. 2021. “National Center for Immunization and Respiratory Diseases (u.s.).” *Research Use Only CDC Flu Sc2 Multiplex Assay Primers and Probes*, July. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/107944>.

Ngaosuwankul, Nathamon, Pirom Noisumdaeng, Pisut Komolsiri, Phisanu Pooruk, Kulkanya Chokephaibulkit, Tawee Chotpitayasunondh, Chariya Sangsajja, Charoen Chuchottaworn, Jeremy Farrar, and Pilaipan Puthavathana. 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:](https://doi.org/10.1186/1743-422x-7-75)

[//doi.org/10.1186/1743-422x-7-75](https://doi.org/10.1186/1743-422x-7-75).

Ni, Minjun, Hengyi Xu, Jie Luo, Wei Liu, and Donggen Zhou. 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 (February): 517–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.027>.

Paterson, Reay G, Makoto Takeda, Yuki Ohigashi, Lawrence H Pinto, and Robert A Lamb. 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>.

Poddar, SK. 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](https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0278).

Rohrman, Brittany, and Rebecca Richards-Kortum. 2015. “Inhibition of Recombinase Polymerase Amplification by Background DNA: A Lateral Flow-Based Method for Enriching Target DNA.” *Analytical Chemistry* 87 (3): 1963–67. <https://doi.org/10.1021/ac504365v>.

Saisuk, W., C. Srisawat, S. Yoksan, and T. Dharakul. 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): 3286–93. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03736>.

Shen, Feng, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Jason E. Kreutz, Olaf Piepenburg, and Rustem F. Ismagilov. 2011. “Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions on SlipChip.” *Analytical Chemistry* 83 (9): 3533–40. <https://doi.org/10.1021/ac200247e>.

Shu, Bo, Marie K Kirby, Christine Warnes, Wendy M Sessions, William G Davis, Ji Liu, Malania M Wilson,

Stephen Lindstrom, David E Wentworth, and John R Barnes. 2020. “Detection and Discrimination of Influenza b Victoria Lineage Deletion Variant Viruses by Real-Time RT-PCR.” *Eurosurveillance* 25 (41). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.41.1900652>.

Sollweck, Katharina, Gerhard Schwaiger, and Michael Seidel. 2021. “A Chemiluminescence-Based Heterogeneous Asymmetric Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Molecular Detection of Mycotoxin Producers.” *The Analyst* 146 (3): 1074–83. <https://doi.org/10.1039/d0an02000a>.

Suwannakarn, Kamol, Sunchai Payungporn, Thaweesak Chieochansin, Rujipat Samransamruajkit, Alongkorn Amonsin, Thaweesak Songserm, Arunee Chaisingh, et al. 2008. “Typing (a/b) and Subtyping

(H1/H3/H5) of Influenza a Viruses by Multiplex Real-Time RT-PCR Assays.” *Journal of Virological Methods* 152 (1-2): 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.002>.

Tsou, Tsung-Pei, Pei-Lan Shao, Chun-Yi Lu, Luan-Yin Chang, Chuan-Liang Kao, Ping-Ing Lee, Pan-Chyr Yang, Chin-Yun Lee, and Li-Min Huang. 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>.

Wang, Ying, Xiangdong Li, Dongmei Xi, and Xiaoqiang Wang. 2019. “Visual Detection of <i>fusarium Proliferatum</i> Based on Asymmetric Recombinase Polymerase Amplification and Hemin/gQuadruplex DNAzyme.” *RSC Advances* 9 (64): 37144–47. <https://doi.org/10.1039/c9ra05709a>.

Wei, Shaojing, and Shing Shun Tony To. 2003. “Influence of RNA Secondary Structure on HEV Gene

Amplification Using Reverse-Transcription and Nested Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Virology* 27 (2): 152–61. <https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00170-1>.

Wu, Chunli, Xiaowen Cheng, Jianfan He, Xing Lv, Jingwen Wang, Riqiang Deng, Qingxing Long, and

Xunzhang Wang. 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:](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023)

[//doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023.](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023)

Zandieh, Mohamad, Kshiti Patel, and Juewen Liu. 2022. “Adsorption of Linear and Spherical DNA Oligonucleotides onto Microplastics.” *Langmuir* 38 (5): 1915–22. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03190>.