

Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassays

Nachweisentwicklung, Limitationen und methodische Neuerungen

DISSERTATION

Zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Herrn André Breitbach

geboren am 02. April 1986 in Halle an der Saale

Gutachter: 1. Prof. Dr. Udo Johanningmeier
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Dr. Mathias Hutzler

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. Oktober 2021

„Sometimes a good idea comes to you when you are not looking for it. Through an improbable combination of coincidence, naivete and lucky mistakes...”

- Kary Mullis -

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	(molekulare) Diagnostik im Scheinwerferlicht – In Zeiten einer Pandemie.....	1
1.2.	<i>Lateral Flow Assays</i> – Aufbau und Funktion.....	3
1.2.1.	Aufbau eines klassischen Lateral Flow Tests	3
1.2.2.	Funktionsweise eines klassischen Lateral Flow Tests	3
1.2.3.	Interpretation eines „klassischen“ Lateral Flow Tests	5
1.2.4.	Die Vielseitigkeit von Lateral Flow Assays	5
1.2.5.	<i>Nucleic Acid Lateral Flow (Immuno-) Assays</i>	6
1.2.6.	Universelle LFDs für NALFIA-Entwicklungen	7
1.3.	DNA-Amplifikationsmethoden als „NALFIA-Baustein“	9
1.3.1.	NALF(I)A-assoziierte Amplifikationsmethoden –Orientierung an Fachliteratur.....	10
1.3.2.	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	11
1.3.2.1.	Der grundlegende Mechanismus einer PCR.....	12
1.3.2.2.	PCR und Lateral Flow	13
1.3.3.	Isothermale DNA-Amplifikationsmethoden.....	14
1.3.3.1.	<i>Loop mediated isothermal Amplification - LAMP</i>	15
1.3.3.2.	<i>Recombinase Polymerase Amplification</i>	16
1.3.4.	CRISPR-Cas-vermittelte NALFIAs.....	17
2.	Zielstellung.....	20
3.	Material und Methoden.....	21
3.1.	Das <i>template</i>: “Herstellung” natürlicher und künstlicher Proben	21
3.1.1.	„natürliche <i>templates</i> “ – Kultivierung, Kulturbestätigung und DNA-Extraktion.....	21
3.1.1.1.	Übersicht verwendeter Organismen	22
3.1.1.2.	Ermittlung der Zellzahl in einer Kultur	24
3.1.2.	DNA-Extraktionsmethoden	24
3.1.3.	Künstliche <i>templates</i> : PCR, Klonierung und Transformation	25
3.1.3.1.	pGEM®-T Klonierung, Transformation und Plasmid-Isolation.....	25
3.1.3.2.	Übersicht relevanter Plasmide.....	26
3.1.3.3.	<i>templates</i> für die Interne Amplifikationskontrolle	27
3.2.	Amplifikation von Nukleinsäuren	28
3.2.1.	DNA-Polymerasen und Nachweis-relevante Enzyme	29
3.2.2.	Primer, Sonden, Helfer: Der Umgang mit Oligonukleotiden	29
3.2.2.1.	Oligonukleotid-Design	29
3.2.2.2.	Praktischer Umgang mit Oligonukleotiden	31
3.2.3.	Weitere relevante Komponenten einer Amplifikationsreaktion	32
3.2.4.	Entwicklung NALFIA - Temperaturprotokoll.....	32
3.2.4.1.	Bedeutung der einzelnen Schritte innerhalb des Nachweisprotokolls.....	32
3.2.5.	Genutzte Thermocycler.....	34
3.2.6.	Genereller <i>workflow</i> zur Vermeidung von <i>carryover</i> Kontaminationen	35
3.2.7.	Reinigung und Dekontamination	35
3.3.	Auswertung von Amplifikaten.....	35
3.3.1.	Lateral Flow Analyse (LFA).....	35

3.3.1.1.	Standard-LFA	36
3.3.1.2.	LFA von Reporter-basierten Nachweisen.....	36
3.3.1.3.	Auswertung einer post PCR-Hybridisierungsreaktion via LFA.....	36
3.3.1.4.	Quantifizierung von Signalintensitäten auf dem LFD	37
3.3.2.	Agarosegelelektrophorese zur Beurteilung von Amplifikaten.....	37
3.4.	Statistische Analysen als Grundlage für die Beurteilung von NALFIAs.....	37
3.4.1.	Verfahrensvergleichsuntersuchung: Vierfeldertafel und Co.....	37
3.4.2.	Normalverteilung von Stichproben und der Student's t-Test	38
4.	Ergebnisse.....	39
4.1.	Entwicklung NALFIAs zur Identifikation historisch neuer Bierschädiger.....	39
4.1.1.	Identifikation von <i>Lactobacillus cerevisiae</i>	40
4.1.1.1.	Entwicklung und Testung abgeleiteter Primer	40
4.1.1.2.	Transfer des Assays in das PCR-Lateral Flow-Format.....	42
4.1.2.	Identifikation von <i>Lactobacillus rossiae</i>	44
4.1.2.1.	Entwicklung und Testung abgeleiteter Primer	44
4.1.2.2.	Transfer des Assays in das PCR-Lateral Flow-Format.....	46
4.1.3.	Matrixkompatibilität der Identifikationsnachweise	47
4.1.4.	Eigenschaften der Identifikationsnachweise von <i>L. rossiae</i> und <i>L. cerevisiae</i>	48
4.2.	Alternativer Homoplasmie-/Heteroplasmie-Schnelltest für <i>C. reinhardtii</i>	48
4.2.1.	Nachweis von Homo-/ Heteroplasmie via PCR-LFA.....	49
4.2.2.	Heterodimere, Matrix-Kompatibilität, Einfluss einfacher DNA Extraktionsmethoden.....	49
4.2.3.	Vergleich: Southern Blot Analyse und PCR-LFA.....	51
4.3.	Validität eines kommerziellen NALFIAs– <i>Alicyclobacillus</i> Detektion	52
4.3.1.	Funktionalität und Spezifität.....	54
4.3.2.	Sensitivität unter Nutzung verschiedener Matrices.....	54
4.3.3.	Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140	55
4.4.	Entwicklung einer universellen Hybridisierungsstrategie	57
4.4.1.	Identifikation relevanter Bierschädiger durch post PCR-Hybridisierung	58
4.4.2.	Optimierung der Hybridisierungsreaktion	58
4.4.3.	Eliminierung unerwünschter Hybridisierungsprodukte	62
4.5.	post PCR-Hybridisierung - Entwicklung praxisnaher Tests	65
4.5.1.	Anforderungsprofil und methodische Limitation –Nachweis Karpfenpathogene	65
4.5.2.	Der Nachweis von Cyprinid Herpesvirus-3 (CyHV-3) / Koi-Herpesvirus (KHV).....	66
4.5.2.1.	Primer-/ Sonden-Design und Nutzung einer alternativen IAC für den.....	67
4.5.2.2.	KHV-Nachweis: Nachweisprinzip und Testperformance	67
4.5.3.	Der Nachweis des Carp Edema Virus.....	70
4.5.3.1.	Erweiterung der NALFIA-toolbox, und trotzdem kein funktioneller Test	71
4.5.3.2.	CEV-Nachweis: Untersuchungen zur post PCR-Hybridisierung.....	71
4.5.3.3.	CEV-Nachweis: Strategien zur Eliminierung von Cross-Primer-Dimeren.....	73
4.5.3.4.	Vermeidung von <i>carryover</i> Kontaminationen – Implementierung der UDG.....	75
4.5.3.5.	Sensitivitätsverlust durch die Wahl der internen Amplifikationskontrolle	76
4.6.	Reporter-basierte RNase H2-abhängige Amplifikation Lateral Flow Analyse.....	77
4.6.1.	Entwicklung einer neuen Nachweismethodik.....	77
4.6.1.1.	<i>Proof of Concept</i> - Identifikation von <i>L. lindneri</i>	78
4.6.1.2.	Rep-rhPCR-LFA: Nachweisempfindlichkeit und Sensitivität	81

4.7.	NALFIA-basierte SNP-Detektion.....	83
4.7.1.	Der Nachweis der FVL-Mutation mittels RNase H2-abhängiger PCR	83
4.7.2.	Nachweis der FVL-Mutation via <i>Amplification-refractory mutation system</i> -PCR	86
4.7.3.	Nachweis FVL-Mutation mit PCR und <i>multiplex</i> post PCR-Hybridisierung.....	89
4.7.3.1.	Spezifisch durch Anwesenheit beider Sonden	90
4.7.4.	Der Nachweis der FVL-Mutation mittels Rep-rhAMP-LFA.....	91
4.7.4.1.	Rep-rhPCR-LFA	91
4.7.4.2.	Isothermale Amplifikation und Reporter-basierter Nachweis	96
5.	Diskussion	98
5.1.	Teil I - Die Entwicklung von NALFIAs: Funktionalität und Praxisrelevanz.....	98
5.1.1.	Der Nachweis bierschädigender Bakterien	98
5.1.1.1.	Nachweis historisch neuer Bierschädiger – <i>L. rossiae</i> und <i>L. cerevisiae</i>	99
5.1.1.2.	Eine alternative NALFIA-Methode zur Identifikation von <i>L. lindneri</i>	100
5.1.1.3.	Identifizierung verschiedener Bierschädiger – eine PCR, sieben Resultate	100
5.1.1.4.	Der Nutzen von NALFIAs– eine orientierende Einschätzung.....	102
5.1.2.	Ein alternativer Homo-/ Heteroplasmie-Schnelltest	103
5.1.3.	Der Nachweis viraler Karpfenpathogene	103
5.1.4.	Detektion von SNPs – Nachweis der Faktor V Leiden Mutation	105
5.1.4.1.	RNase H2-abhängige PCR.....	106
5.1.4.2.	ARMS-PCR	107
5.1.4.3.	Sonden-basierte NALFIAs.....	108
5.1.4.4.	SNP-Nachweis via NALFIA: ein Zwischenfazit.....	109
5.1.5.	Validierung eines kommerziellen NALFIAs – Nachweis von TAB.....	109
5.2.	Teil II - Limitationen von NALFIAs und praktisch nutzbare Lösungsstrategien	114
5.2.1.	<i>Multiplexing</i>	114
5.2.2.	Der <i>high dose hook effect</i>	115
5.2.3.	<i>Carryover</i> Kontaminationen	116
5.2.4.	Cross Primer Dimere (CPDs).....	117
5.2.4.1.	Spezifische Strategien zur Eliminierung von Cross Primer Dimeren	117
5.2.4.2.	Universelle Strategien zur Eliminierung von Cross Primer Dimeren	119
5.2.4.3.	Zwischenfazit - Die Eliminierung von Cross Primer Dimeren.....	120
5.2.5.	Das Zusammenspiel von Genauigkeit und Empfindlichkeit.....	120
5.2.5.1.	„Sensitiver nachweisen“ - Eine schnelle, einfache Hybridisierungsmethode.....	121
5.2.5.2.	Spezifisch, spezifischer, SNP-Detektion - Spezifitätshelfer	123
5.2.5.3.	Zwischenfazit: Sonden-Hybridisierung nach Amplifikation	124
5.2.6.	PCR und Lateral Flow: <i>Point-of-Care</i> Kompatibilität.....	124
5.2.6.1.	Nachweisgeschwindigkeit.....	125
5.2.6.2.	Der <i>Equipment</i> -Faktor	126
5.2.6.3.	Komplexität der Abarbeitung und Reagenzien-Stabilität.....	127
5.2.6.4.	PCR und <i>Point-of-Care</i> : ein Zwischenfazit.....	127
5.3.	Teil III - Reporter-basierte Nachweismethoden für NALFIAs	128
5.3.1.	Auswertung Reporter-basierte Nachweise mittels MGH.....	128
5.3.2.	Die RNase H2 als Werkzeug für Reporter-basierte NALFIAs	129
5.3.3.	Vor- und Nachteile Reporter-basierter NALFIAs – Ein Zwischenfazit	130
6.	Zusammenfassung.....	132

6.1.	Praxisrelevanz und Performance	132
6.2.	Methodische Limitationen & Innovationen.....	132
6.3.	Nicht-markierte Oligonukleotide in NALFIAs	133
7.	Literatur	135
8.	Anhang.....	158
8.1.	Zusätzliche Informationen zur Einleitung.....	158
8.1.1.	Amplifikationsmechanismus der LAMP	158
8.1.2.	Genereller Amplifikationsmechanismus der RPA.....	160
8.1.2.1.	RPA und Lateral Flow	160
8.2.	Zusatz Material und Methoden	164
8.2.1.	Übersicht: relevanter Plasmide	164
8.2.1.1.	Sequenzierung pKHV	164
8.2.1.2.	Sequenzierung pCEV.....	165
8.2.1.3.	Sequenzierung pFVL _{Mut}	166
8.2.1.4.	Alignment pFVL _{Mut} und pFVL _{WT}	167
8.2.2.	Übersicht: relevanter Oligonukleotide	168
8.2.3.	Übersicht: Nachweis-Zusammensetzung.....	173
8.2.4.	<i>Escherichia coli</i> Methoden (Klonierung, Transformation, selektive Kultivierung)	177
8.2.4.1.	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	177
8.2.4.2.	Generelle Anzuchtbedingungen	177
8.2.4.3.	Die Übernachtskultur.....	177
8.2.4.4.	Anzucht auf selektivem Festmedium	177
8.2.4.5.	Isolierung von Plasmiden	177
8.2.4.6.	Erzeugung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	178
8.2.4.7.	Transformation chemisch kompetenter Zellen via Hitzeschock.....	178
8.2.4.8.	Standard PCR und OE-PCR: Erstellung des Inserts für die Klonierung.....	179
8.2.5.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> – assoziierte Methoden	179
8.2.5.1.	Southern Blot Analyse.....	179
8.2.5.2.	Chlorophyll-Bestimmung.....	179
8.2.6.	<i>Alicyclobacillus</i> –Methoden (Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140).....	180
8.2.6.1.	Zusammensetzung des Probensets.....	180
8.2.6.2.	Nachweis von <i>Alicyclobacillus</i> spp. aus Fruchtsaftkonzentraten	180
8.2.6.3.	Identifikation von <i>Alicyclobacillus</i> spp. und Guaiacolnachweis.....	180
8.2.6.4.	PCR-Lateral Flow-basiertes Testsystem für <i>Alicyclobacillus</i>	180
8.2.6.5.	Zeitpunkte der PCR-Analyse.....	181
8.2.7.	Methoden zur (schnellen) Extraktion von DNA aus verschiedenen Matrices	181
8.2.7.1.	Extraktion von Gesamtzell-DNA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	181
8.2.7.2.	Extraktion humaner gDNA aus Blut	182
8.2.7.3.	Aufkochen / <i>boiling-method</i>	182
8.2.7.4.	ETNA DNA-Extraktion	182
8.2.7.5.	Probenvorbereitung mit Chelex-100	182
8.2.7.6.	EDTA-basierte Probenvorbereitung	182
8.2.8.	Erstellung von Grafiken.....	182
8.3.	zusätzliche Ergebnisse	183
8.3.1.	Validierung eines NALFIAs zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus</i>	183

8.3.2.	Identifikation bierschädigender Bakterien (PCR und post PCR-Hybridisierung)	189
8.3.3.	Nachweis viraler Karpfenpathogene (<i>duplex</i> PCR und post PCR-Hybridisierung)	191
8.3.3.1.	KHV-Nachweis	191
8.3.3.2.	CEV-Nachweis	193
8.3.3.3.	KHV-/ CEV- <i>multiplexing</i>	199
8.3.4.	Zusatz: Reporter-basierte RNase H2-abhängige Amplifikation	199
8.3.4.1.	Rep-rhPCR-LFA zur Identifikation von <i>L. lindneri</i> :.....	199
8.3.5.	Zusatz: Nachweis der Faktor V Leiden Mutation	201
8.3.5.1.	FVL – post PCR Hybridisierung.....	201
8.3.6.	Zusatz: NALFIA-assoziierte Limitationen	201
8.3.6.1.	<i>High Dose Hook Effect</i>	201
8.3.6.2.	Cross Primer Dimere – universelle Eliminierungsstrategien	202
8.3.6.3.	Nachweisgeschwindigkeit.....	203
8.3.6.4.	Einfluss der Temperatur auf die universellen LFDs.....	204
9.	Danksagung	208
10.	Erklärung	209
11.	Publikationsliste	210
12.	Lebenslauf.....	211

Abkürzungsverzeichnis

AAT	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
aat	Nachweis auf AAT
AC	relative Genauigkeit
ACB	<i>Alicyclobacillus</i> spp.
acb	Nachweis auf ACB
AFSV	<i>african swine fever virus</i>
AG	Arbeitsgruppe
AGE	Agarosegelelektrophorese
AMP	Amplifikation
ARMS	<i>amplification-refractory mutation system</i>
ASI	absolute Signalintensität
ASK	Apfelsaftkonzentrat
BAT-B	<i>Bacillus acidoterrestris</i> Bouillon
BIO	Biotin
BIP	<i>backward inner primer</i>
BSA	bovines Serum Albumin
Cas	<i>CRISPR associated protein</i>
CEV	Carp Edema Virus
cfu	<i>colony forming unit(s)</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CPD	<i>cross primer dimer</i>
cps	<i>copies</i> / Kopien
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRP	<i>conjugate release pad</i>
CyHV-3	Cyprinid Herpesvirus 3
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DENV	Dengue Virus
DETECTR	<i>DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter</i>
DIG	Digoxygenin
DIN-ISO-EN	Deutsches Institut für Normung – Internationale Organisation für Normung – Europäische Norm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA

DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dUTPs	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunoabsorbant assay</i>
ETNA	Extraktionsmethode basierend auf Ethanol und Natriumhydroxid
FAM	6-Carboxyfluorescein
FIP	<i>forward inner primer</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	<i>Fluoresence in situ hybridization</i>
FPR	Falschpositivrate
FVL	Faktor V Leiden
G32P	<i>gene 32 protein</i>
gp	guaiacol producing / Guaiacol-produzierend
H	Helfer (-Oligonukleotid)
H ₂ O	Wasser
HDA	<i>helicase dependent amplification</i>
HS-Medium	<i>high salt</i> Medium
IAC	interne Amplifikationskontrolle
IFU-No. 12	<i>International Fruit and Vegetable Association - micro method – Number 12</i>
IPK	interne PCR Kontrolle (synonym verwendet IAC)
KBE	Kolonie bildende Einheit (en)
KHV	Koi Herpesvirus
KHVD	Koi Herpesvirus <i>disease</i>
Ki	Kieme
KSD	<i>koi sleepy disease</i>
LADR	Laborverbund Dr. Kramer & Kollegen
LAMP	<i>loop mediated isothermal amplification</i>
LATE-PCR	<i>linear after the exponential-PCR</i>
<i>Lba</i>	<i>Lactobacillus backii</i>
<i>Lbr</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lca</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LFA	Lateral Flow Assay
LFD	Lateral Flow Device
LFIA	Lateral Flow Immunoassay
<i>Lli</i>	<i>Lactobacillus lindneri</i>
LOD	<i>limit of detection</i>
<i>Lpco</i>	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>

Lro	<i>Lactobacillus rossiae</i>
LRS	<i>low resource settings</i>
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry</i>
MCDA	<i>multi cross displacement amplification</i>
MGHD	Milenia GenLine HybriDetect
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
Mut	Mutation / mutiert
NA	<i>negative agreement</i>
n.a.	nicht analysiert
n.i.	nicht interpretierbar
NALFA	<i>nucleic acid lateral flow assay</i>
NALFIA	<i>nucleic acid lateral flow immunoassay</i>
NC	Negativkontrolle
NCP	Nucleocapsid Protein
ND	<i>negative deviation</i>
Nfo	Endonuclease V
Ni	Niere
NTC	<i>no template control</i>
OD	optische Dichte
OSK	Orangensaftkonzentrat
PA	<i>positive agreement</i>
part. Helfer	partieller Helfer
PCI	Phenol Chloroform Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>positive deviation</i>
<i>Pda</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
POC	<i>point of care</i>
qPCR	quantitative PCR
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
rhAMP	RNase H2-abhängige LAMP
rhPCR	RNase H2-abhängige PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>recombinase chain amplification</i>
rRNA	ribosomale RNA
RSI	relative Signalintensität

RT	Raumtemperatur
RT-LAMP	<i>reverse transcriptase LAMP</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcriptase quantitative PCR</i>
RT-RPA	<i>reverse transcriptase RPA</i>
SAP	<i>sample application pad</i>
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SDA	<i>strand displacement amplification</i>
SE	diagnostische Sensitivität
SE _{alt}	relative Sensitivität der Alternativmethode
SHERLOCK	<i>specific high enzymatic reporter unlocking</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	diagnostische Spezifität
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TAE-Puffer	TRIS Acetat EDTA-Puffer
TAP-Medium	TRIS Acetat Phosphat-Medium
TBE-Puffer	TRIS Borsäure EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS EDTA-Puffer
TUM-BLQ	Technische Universität München – Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. (molekulare) Diagnostik im Scheinwerferlicht – In Zeiten einer Pandemie

Zum Jahresende 2019 häuften sich Meldungen aus Wuhan, der Hauptstadt der chinesischen Provinz Hubei, zum vermehrten Auftreten eines neuartigen humanpathogenen Virus, welches offenbar eine ernstzunehmende Erkrankung der Atemwege verursachte (Zhu *et al.*, 2020). Am 9. Januar 2020 wurde ein neuartiges Betacoronavirus als Verursacher dieser unbekannten Krankheit beschrieben. In den folgenden Tagen und Wochen häuften sich nationale aber auch internationale Nachweise des sogenannten *severe acute respiratory coronavirus 2* (SARS-CoV-2), welches die Krankheit *coronavirus disease 2019* (COVID-19) verursachte (*Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2020). Am 11. März 2020 definierte die *World Health Organization* COVID-19 als Pandemie. Nur fünf Monate später wurde laut COVID-19 *dashboard* der Johns Hopkins Universität SARS-CoV-2 in 216 Ländern auf allen sechs Kontinenten der Erde nachgewiesen, wobei mehr als 20 Millionen Infektionen und mehr als 730.000 Todesfälle dokumentiert werden konnten (Dong *et al.*, 2020 / Hu und Guo *et al.*, 2020). Seither beherrscht die stetige Gefahr der unkontrollierten Ausbreitung dieses neuartigen Virus das Leben vieler Menschen auf der ganzen Welt (Yüce *et al.*, 2021).

Bereits zu Beginn der Pandemie kristallisierte sich heraus, dass eine schnelle Diagnose von COVID-19 essentiell für die Eindämmung der Ausbreitung des Virus zu sein schien (Lohse *et al.*, 2020). Dieser Umstand rückte die molekulare Virusdiagnostik in den wissenschaftlichen und öffentlichen Fokus. Die *polymerase chain reaction* (PCR), eine molekularbiologische *in vitro* DNA-Vervielfältigungstechnik, entwickelte sich rasch zum Goldstandard der SARS-CoV-2 Diagnostik (Mullis und Faloona, 1987 / Jayamohan *et al.*, 2020). Eine spezielle Form der PCR, die quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR) entwickelte sich binnen weniger Wochen zu einem der bedeutendsten Werkzeuge für die Überwachung und Bekämpfung der Pandemie (Hu und Guo *et al.*, 2020). Die beeindruckende Empfindlichkeit und Genauigkeit sind wichtige Charakteristika dieser Methodik. Die PCR im Hochdurchsatz erfordert allerdings die Abarbeitung durch geschultes Personal in einem spezialisierten diagnostischen Labor, was die Komplexität dieser Methode unterstreicht (Paul *et al.*, 2020.). Allein in Deutschland wurden im November 2020 in etwa 226.000 PCR-Analysen für den Nachweis von SARS-CoV-2 an einem einzigen Tag durchgeführt (<https://ourworldindata.org/coronavirus-testing>). Im letzten Quartal des Pandemie-Jahres 2020 rückte ein zusätzliches diagnostisches Werkzeug in den Fokus der öffentlichen Wahrnehmung. Lateral Flow Immunoassays (LFIAs) wurden für den einfachen, schnellen, laborunabhängigen Nachweis des Virus verfügbar und offenbarten sehr schnell Vor- und Nachteile der verschiedenen Nachweisplattformen (Corman *et al.*, 2020). Die sogenannten Antigen-Schnelltests für den Nachweis von SARS-CoV-2

basieren zumeist auf einer Antikörper-vermittelten „Erkennung“ charakteristischer viraler Proteine und generieren mit bloßem Auge auswertbare Resultate in etwa 10 bis 15 Minuten (Mak *et al.*, 2020 / Corman *et al.*, 2020.).

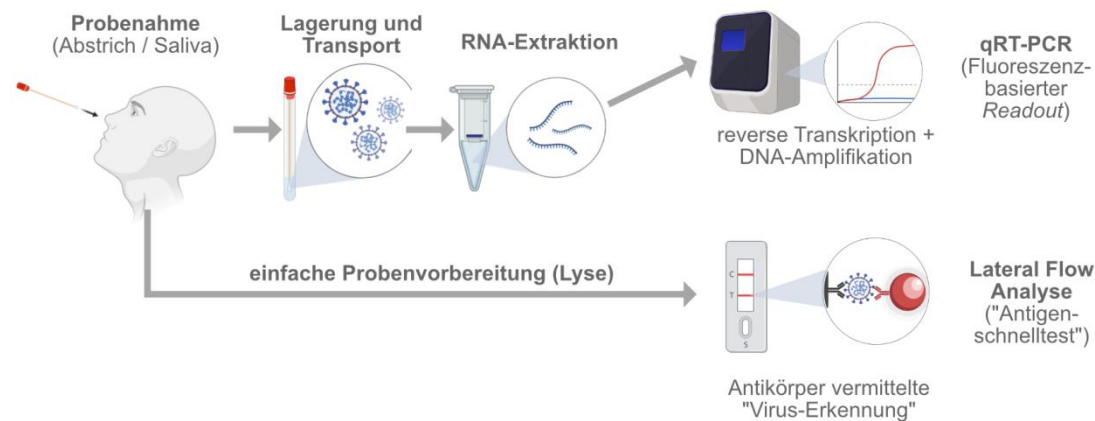


Abbildung 1 - SARS-CoV-2 Detektion mittels qRT-PCR und Lateral Flow Schnelltest. qRT-PCR-Analyse erfordert zahlreiche komplexe Arbeitsschritte (Probentransport, -lagerung und RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und DNA-Amplifikation mit Fluoreszenz-basierter Detektion). Die Abarbeitung erfordert Expertise geschulter Mitarbeiter eines diagnostischen Labors, wodurch eine sehr empfindliche und genaue Virusdiagnostik gewährleistet werden kann. Der *Point-of-Care* taugliche Antikörper-basierte Schnelltest ist einfacher in der und ermöglicht eine schnelle, Labor-unabhängige, jedoch insensitivere Diagnostik.

Diese robuste, kostengünstige, weitestgehend Geräte-unabhängige diagnostische Plattform kann entkoppelt von einem spezialisierten Labor als echter *Point-of-Care* oder *Point-of-Need* Test verwendet werden (Bruning *et al.*, 2017). Folglich definierten diese Merkmale rasch den politischen und öffentlichen Diskurs bezüglich möglicher SARS-CoV-2 Nachweisstrategien. LFIA fungierten als wichtige Werkzeuge für die schnelle Testung von Klinik- und Pflegepersonal, um das Infektionsrisiko für besonders vulnerable Gruppen zu senken. Im Vergleich zu DNA-Amplifikationsmethoden, wie der PCR, zeigen klassische LFIA i.d.R. eine reduzierte Sensitivität und ein gewisses Maß an Unspezifität (Mak *et al.*, 2020 / Bruning *et al.*, 2020). Diese Limitationen begrenzen nicht nur den möglichen Einsatz dieser Tests, sondern insbesondere deren Aussagekraft. So gelingt es mit Hilfe eines SARS-CoV-2 LFIA infektiose Personen zu erkennen, jedoch kann aufgrund der Nachweisempfindlichkeit gelegentlich nicht sicher zwischen infiziert und nicht-infiziert differenziert werden (Corman *et al.*, 2020). Nachweismethoden wie die PCR und Lateral Flow Immunoassays haben bewiesen, wie wichtig vielfältige und sichere Diagnostik für das Leben gerade in der Pandemie ist (Yüce *et al.*, 2021). Nichts desto trotz offenbaren diese diagnostischen Plattformen klare Grenzen hinsichtlich ihrer Anwendung, Aussagekraft und ihres Einsatzspektrums (Benzigar *et al.*, 2020).

Die hier vorgelegte Arbeit widmet sich der „Verbindung beider Welten“. Die Kombination aus DNA-Amplifikation und LFIA verspricht Vorteile der methodischen Herangehensweisen zu nutzen. Das Beispiel der aktuellen pandemischen Situation unterstreicht die übergeordnete Bedeutung der hier bearbeiteten und diskutierten Thematik.

1.2. *Lateral Flow Assays* – Aufbau und Funktion

„Schwanger oder nicht schwanger“ ist die wohl am häufigsten gestellte Frage, bevor die meisten Menschen bewusst das erste Mal mit einem *Lateral Flow Assay* (LFA) konfrontiert werden. Dieser Umstand verdeutlicht die vielseitige Nutzbarkeit dieser einfachen, robusten und schnellen Analyseplattform. LFAs sind zumeist Papier-basierte Analysewerkzeuge, die für die spezifische Erkennung von Analyten aus z.T. heterogenem und komplexem Probenmaterial genutzt werden (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Ein *Lateral Flow Device* (LFD) kann als immunochromatografischer Schnelltest in Form eines Teststreifens beschrieben werden (Koczula und Gallotta, 2016). Die Erkennung eines Analyten beruht dabei sehr häufig auf Antikörper-Antigen-Interaktionen, die binnen weniger Minuten zu einer sichtbaren Ausprägung einer Testlinie und einer Kontrolllinie auf dem LFD führen, sodass eine schnelle Auswertung mit bloßem Auge vorgenommen werden kann (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009 / Koczula und Gallotta, 2016).

1.2.1. Aufbau eines klassischen *Lateral Flow Tests*

Ein LFD besteht zumeist aus mehreren überlappenden Schichten (Koczula und Gallotta, 2016 / Posthuma-Trumpie, 2009 / Andryukov, 2020). Auf einer *backing card* wird mittig eine analytische Membran (häufig Nitrocellulose) aufgebracht, auf der Fängerelemente wie spezifische Antikörper an definierten Stellen immobilisiert wurden. Im oberen Bereich des LFD wird ein aus Cellulose bestehendes Saugpad (*wicking pad*) überlappend zur analytischen Membran aufgeklebt. Ein weiteres entscheidendes Element eines LFD ist das *conjugate release pad* (CRP), welches als Trägerschicht für das Konjugat dient. Eben jenes besteht zumeist aus (Gold-) Nanopartikeln, an welche Detektorelemente wie spezifische Antikörper konjugiert wurden. Das *sample application pad* wird im unteren Bereich des LFD überlappend zum CRP positioniert. Um das Konjugat bzw. die analytische Membran vor Beschädigung zu schützen, werden LFDs häufig in einem Plastikgehäuse positioniert oder aber mit einer Schutzfolie überklebt (Andryukov, 2020 / Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Diese Beschreibung kann nur als Orientierung für den möglichen Aufbau eines LFD dienen und somit zum grundlegenden Verständnis beitragen. Die Abbildung 2 verbildlicht den exemplarischen Aufbau eines LFDs. Die Vielfalt an Modifikationen auf allen beschriebenen Ebenen eines LFD ist wesentlicher Bestandteil der LFA-Entwicklung und ermöglicht zahlreiche Einsatzmöglichkeiten von *Lateral Flow Tests* (Koczula und Gallotta, 2016).

1.2.2. Funktionsweise eines klassischen *Lateral Flow Tests*

Das Zusammenwirken von Aufbau und Funktionsweise eines LFD erschließt sich am ehesten anhand einer praxisnahen Beschreibung des Ablaufs eines exemplarischen Schnelltests. Repräsentativ wird hierbei das Nachweisprinzip des bereits erwähnten SARS-CoV-2 Antigen-Schnelltests genutzt, um die Funktionsweise zu verdeutlichen.

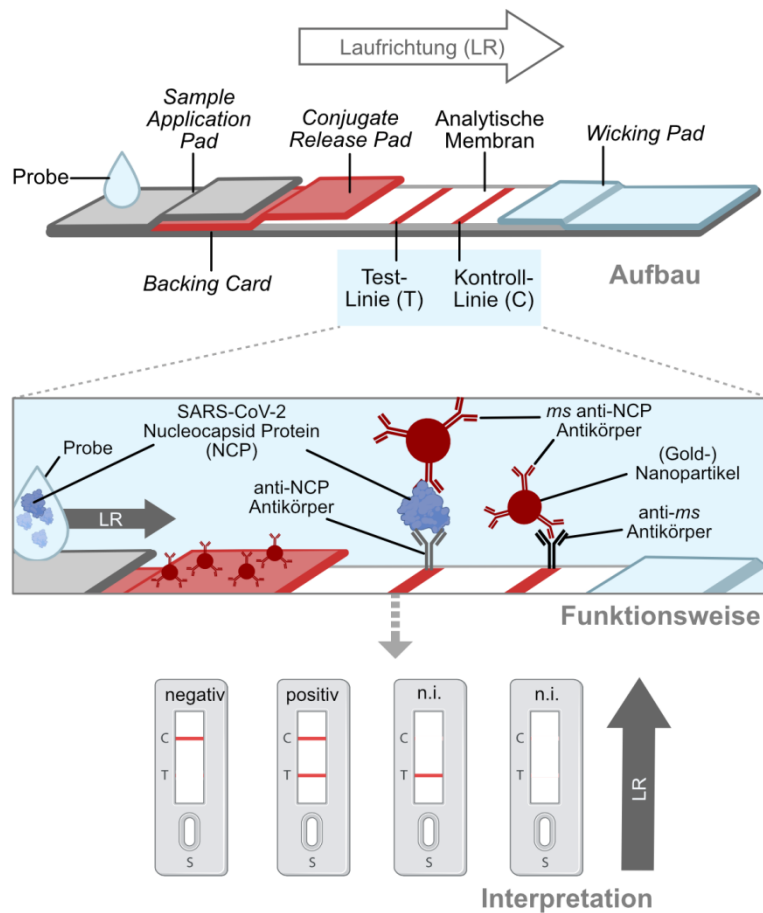


Abbildung 2 – Aufbau, Funktionsweise und Interpretation eines klassischen Lateral Flow Assays am Beispiel eines möglichen SARS-CoV-2 Antigen-Schnelltests, bei dem das spezifische Nucleocapsid Protein (NCP) durch spezifische Antikörperinteraktion detektiert wird. (ms – aus Maus stammend, n.i. bedeutet nicht interpretierbar, LR bedeutet Laufriichtung).

Im Falle des beschriebenen Praxisbeispiels geht dem Probenauftrag eine schnelle und einfache Probenvorbereitung von Nasen-/ Rachenabstrich oder Speichel voraus (Azzi *et al.*, 2021 / Gremmels *et al.*, 2021). Nachgewiesen wird häufig das Virus-spezifische Nucleocapsid Protein (NCP), welches durch die Probenvorbereitung freigesetzt und somit für die LFA zugänglich gemacht wird (Corman *et al.*, 2020). Im Anschluss kann eine definierte Probenmenge auf das *sample application pad* gegeben werden, wodurch der „laterale Fluss“ des Probenmaterials in Laufriichtung initiiert wird. Durch Kapillarkräfte überströmt die Probe das CRP und interagiert mit dem Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugat (Koczula und Gallotta, 2016 / Posthuma-Trumpie, 2009). Sofern das spezifische Antigen (NCP) in der Probe enthalten ist, wird dieses spezifisch durch die Konjugat-assoziierten anti-NCP Antikörper gebunden. Dieses Gemisch überströmt die analytische Membran. Dabei kommt es auf der Höhe der Testlinie (T) erneut zur spezifischen Interaktion des Antigens mit den immobilisierten anti-NCP Antikörpern. Dadurch wird nicht nur das in der Probe enthaltene NCP gestoppt, sondern auch das bereits gebundene mobile Goldkonjugat. Die zunehmende Akkumulation von Goldnanopartikeln auf Höhe der Testlinie führt ab einem gewissen Schwellenwert zur

Ausprägung eines sichtbaren Signals (Koczula und Gallotta, 2016 / Posthuma-Trumpie, 2009). Die meisten LFDs besitzen darüber hinaus eine Kontrolllinie (C). Dabei werden sehr häufig immobilisierte Fängerelemente genutzt, die eine direkte Affinität zum mobilen Konjugat besitzen (Wen *et al.*, 2020). Dadurch käme es zum „Abfangen“ des Konjugats auf Höhe der C-Linie, was mit einem entstehenden Signal einhergehen würde. Folglich versteht sich die C-Linie als eine Art Funktionskontrolle des LFDs und bestätigt die Validität des Testergebnisses (Wen *et al.*, 2020).

1.2.3. Interpretation eines „klassischen“ Lateral Flow Tests

Die Interpretation eines LFD kann auf verschiedenen Wegen erfolgen (Posthuma-Trumpie, 2009). Die qualitative Auswertung nach einer definierten Analysezeit mit bloßem Auge ist dabei der einfachste Weg zu einem Ergebnis (O’Farrell, 2009). In den meisten nicht-kompetitiven Assayformaten korreliert die Anwesenheit einer Testlinie mit einem positiven Testergebnis. Die Abwesenheit der Testlinie ist folglich Voraussetzung für ein Negatives. Entscheidend ist, neben der Testlinie, die Anwesenheit der Kontrolllinie. Diese gibt Aufschluss über die Funktionalität des LFD und somit über die Validität des abgeleiteten Resultats. Im Falle des beschriebenen exemplarischen SARS-CoV-2 Antigen-Schnelltests wird ein Test positiv gewertet, sobald eine sichtbare T-Linie und eine deutlich erkennbare C-Linie erscheinen. Bleibt die T-Linie aus, aber die C-Linie ist deutlich erkennbar, wird der Test valide negativ gewertet. Bei ausbleibender C-Linie wird der Test in jedem Fall als nicht interpretierbar (n.i.) gewertet, was bedeutet, dass kein eindeutiges Ergebnis abgeleitet werden kann (Posthuma-Trumpie, 2009). Neben der qualitativen Interpretation können LFAs auch semi-quantitativ mit Auswertekarten oder quantitativ durch die Nutzung von Lesegeräten ausgewertet werden (Serebrennikova *et al.*, 2019 / Urosov *et al.*, 2019).

1.2.4. Die Vielseitigkeit von Lateral Flow Assays

Die Nutzbarkeit dieser analytischen Plattform ist insbesondere durch die Einfachheit geprägt. Ungeschulte Nutzer werden in die Lage versetzt einfach und schnell bestimmte Fragestellungen ohne besonderen Geräteaufwand mittels LFA zu beantworten (O’Farrell, 2009 / Posthuma-Trumpie, 2009 / Koczula und Gallotta, 2016). Aber auch die Robustheit, sowie die einfache und kostengünstige Produktion machen LFDs zu weltweit bedeutsamen diagnostischen Werkzeugen (Koczula und Gallotta, 2016). So existieren zahlreiche LFAs für human- und veterinärmedizinische Fragestellungen, für Qualitätskontrollen der Lebensmittelindustrie oder Umwelt (Nielsen *et al.*, 2009 / Van Dam *et al.*, 2013 / Ching *et al.*, 2015 / Mei *et al.*, 2013). Via LFA werden Krankheiten diagnostiziert, Pathogene identifiziert, Chemikalien, Toxine oder andere Umweltschadstoffe nachgewiesen (Kim *et al.*, 2015 / Shukla *et al.*, 2014 / Morales-Narváez *et al.*, 2015 / Ngom *et al.*, 2010 / Shyu *et al.*, 2002). Die Robustheit dieses diagnostischen Analyseformats gegenüber der zu analysierenden Probenmatrix spiegelt sich besonders im medizinischen Sektor wider, da Direktanalysen aus Vollblut, Serum, Plasma, Urin, Schweiß, Speichel oder Abstrichen

genutzt werden (Moreno *et al.*, 2017 / Carrio *et al.*, 2015 / Pacifici *et al.*, 2001 / De Giovanni *et al.*, 2013 / Magambo *et al.*, 2014 / Schramm *et al.*, 2015 / Ang *et al.*, 2016). Insbesondere können universell nutzbare LFDs verwendet werden, um sehr gezielt Nukleinsäuren bzw. Produkte aus Nukleinsäure-basierten Amplifikationsmethoden nachzuweisen. Diese Abwandlung klassischer Lateral Flow Immunoassays werden als *nucleic acid lateral flow immunoassays* (NALFIAs) beschrieben (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009).

1.2.5. Nucleic Acid Lateral Flow (Immuno-) Assays

Die Untersuchung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) erfolgt zumeist über Techniken, die in speziellen Laboratorien mit entsprechender Ausstattung und Expertise genutzt werden (Mothershed and Whitney, 2006 / Espy *et al.*, 2006). So lassen sich Nukleinsäuren bspw. über interkalierende Farbstoffe, gelelektrophoretische Auftrennung, *Blotting*-Verfahren und bestimmte Hybridisierungs – oder Sequenzierungsmethoden beurteilen (Kricka, 2002). Das Spektrum molekularbiologischer Techniken zur Visualisierung und Beurteilung von Nukleinsäuren ist sehr groß und geht zumeist mit einer starken Technisierung und beachtlichem Arbeits- und Zeitaufwand einher (Kricka *et al.*, 2002). LFAs grenzen sich wegen ihrer charakteristischen Eigenschaften von aufwändigen und komplizierten Nachweistechiken durch Einfachheit, Geschwindigkeit und Laborunabhängigkeit deutlich ab (O’Farrell, 2009 / Posthuma-Trumpie, 2009 / Koczula und Gallotta, 2016). Die Kombination aus Nukleinsäure-assoziierter Analytik mit der Lateral Flow Technologie ist die Grundidee sogenannter *nucleic acid lateral flow assays* (NALFA).

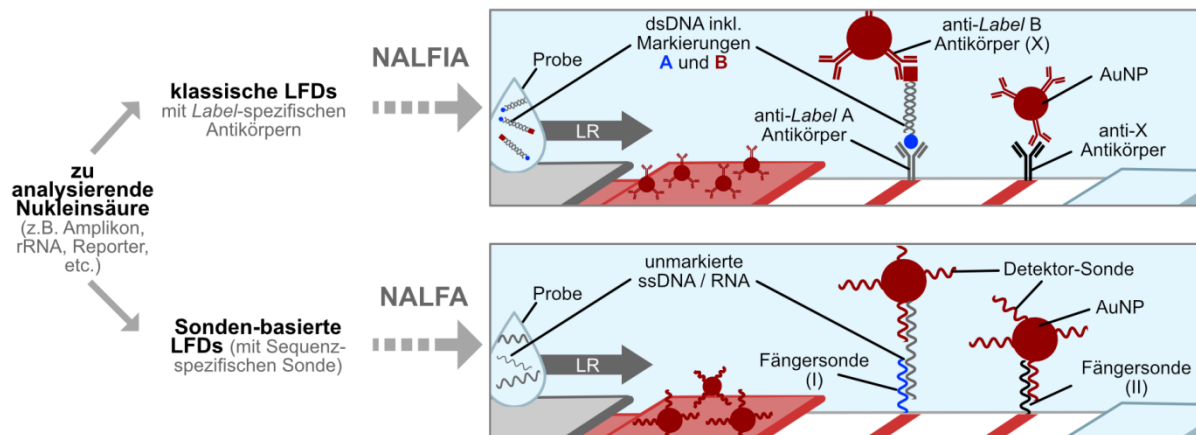


Abbildung 3 - Übersicht zweier NALFA-Nachweisstrategien. Unterschieden werden kann zwischen Antikörper-basierten Nachweissystemen, die zumeist universell nutzbare Markierungen adressieren (A und B; NALFIA) und i.d.R. Assay-spezifische LFDs, die definierte DNA-Sonden für das Abfangen und Erkennen im LFA nutzen (NALFA).

Gemäß Posthuma-Trumpie (2009) wird zwischen zwei grundsätzlichen LFD-Formaten unterschieden. Der Verzicht auf Antikörper und der „Einbau“ von DNA-Sonden in das Lateral Flow System erlaubt durch Sequenz-spezifische Hybridisierung die Detektion einzelsträngiger unmarkierter DNA bzw. RNA (Abbildung 3, unten). In diesen zumeist Assay-spezifischen Teststreifen werden DNA-Sonden zum einen an Nanopartikel konjugiert (mobile Phase des LFD), und darüber hinaus direkt oder

indirekt auf der analytischen Membran immobilisiert (stationäre Phase des LFD). Bei erfolgreicher „Sandwich“-Hybridisierung entsteht ein visuell erkennbares Signal auf Höhe der Testlinie (Aveyard *et al.*, 2007). Das zweite LFD-Format versteht als universelles Nachweissystem, welches definierte *Label* wie Biotin oder Digoxigenin über spezifische Antikörper analog zu einem „klassischen“ Lateral Flow Testsystem erkennt (Abschnitt 1.2.1. bis 1.2.3.). Gelingt es innerhalb der Nukleinsäure-basierten Nachweisführung etwaige Markierungen einzufügen, ist das universelle LFD befähigt, den dual markierten Analyten auf der Testlinie zu binden (Abbildung 3, oben). Die Nutzung *Label*-spezifischer Antikörper für Nachweis von Nukleinsäuren via Lateral Flow verleiht diesen Testsystemen nicht nur den Namen *nucleic acid lateral flow immunoassay* (NALFIA), sondern insbesondere den universellen Charakter (Posthuma-Trumpie, 2009 / Andruykov, 2020).

1.2.6. Universelle LFDs für NALFIA-Entwicklungen

Die NALFIA-Strategie bietet den entscheidenden Vorteil, dass die genutzten Teststreifen universell sind, und damit eine konstante Komponente im Entwicklungsprozess zur Beantwortung Nukleinsäure-assoziiierter Fragen darstellen (Zheng *et al.*, 2021). Hersteller universeller LFDs können diese zudem jederzeit an Lager halten, womit eine ständige Verfügbarkeit gegeben ist. Ferner können Entwickler ohne spezielles Lateral Flow *Knowhow* eigene NALFIA-Entwicklungen anstoßen. Daraus ergeben sich Vorteile hinsichtlich Entwicklungsgeschwindigkeit, Übertragbarkeit einer Methode auf multiple Fragestellungen, sowie *Upscaling*, sowie die Kommerzialisierung eines Assays. In der Konsequenz ergeben sich auch spezifische Limitationen (z.B. Anzahl auswertbarer Signale je LFD, zu verwendende Markierungen). In der Tabelle 1 sind fünf relevante und häufig verwendete, kommerzielle LFDs aufgelistet.

Tabelle 1 – Übersicht relevanter kommerziell verfügbarer universeller LFDs für die individuelle NALFIA-Entwicklung. [*] symbolisiert die Markierung, die durch das mobile Konjugat (Streptavidin, Antikörper) adressiert wird. Die übrigen Markierungen werden in der stationären Phase des LFD „erkannt“.

Name LFD	Format	Anzahl Testlinien	Immunoassay-Kontrolle	genutzte Markierungen	Hersteller	repräsentative Referenz
<i>HybriDetect</i> (MGHD)	<i>dipstick</i>	1	ja	Biotin, FITC*	Milenia Biotec GmbH, Gießen	Myhrvold <i>et al.</i> , 2018
<i>HybriDetect2T</i> (MGHD2)	<i>dipstick</i>	2	ja	Biotin, Digoxigenin, FITC*	Milenia Biotec GmbH, Gießen	Loose und Breitbach <i>et al.</i> , 2020
PCRD / PCRD Flex	Testkassette / <i>dipstick</i>	2	ja	Biotin*, Digoxigenin, FITC	Abingdon Health plc, York, UK	Rani <i>et al.</i> , 2021
Ustar "Strip"	<i>dipstick</i>	1	ja	Biotin, FITC*	Ustar Biotechnologies, Hangzhou, China	Wu <i>et al.</i> , 2020
Ustar "Device"	Kartusche	1	ja	Biotin, FITC*	Ustar Biotechnologies, Hangzhou, China	Hammond und Zhang, 2016

Auf dem Markt existieren verschiedene LFDs, die sich für die Entwicklung von NALFIAs eignen (Wu *et al.*, 2020 / Rani *et al.*, 2021 / Myhrvold *et al.*, 2018). Die am häufigsten in Publikationen erwähnten Universal-LFDs sind in der Tabelle 1 aufgelistet und erfordern Biotin- und FITC/FAM-

Markierungen für die Erkennung eines Analyten auf der Testlinie. Weiterhin sind allen LFDs die interne Immunoassay-Kontrolle, sowie das *dipstick*-Format gemein. Ein *dipstick* wird hier als freier Teststreifen definiert, der weder in einer Kartusche, noch in einer Testkassette vorplatziert wurde (Abbildung 4). In dieser Arbeit wurden universelle, Antikörper-basierter LFDs favorisiert, sodass der überwältigende Teil der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Universalteststreifen der *HybriDetect*-Plattform (Milenia Biotec GmbH, Gießen) generiert wurde. Die Abbildung 4 zeigt den Aufbau und das Erscheinungsbild der Teststreifen.

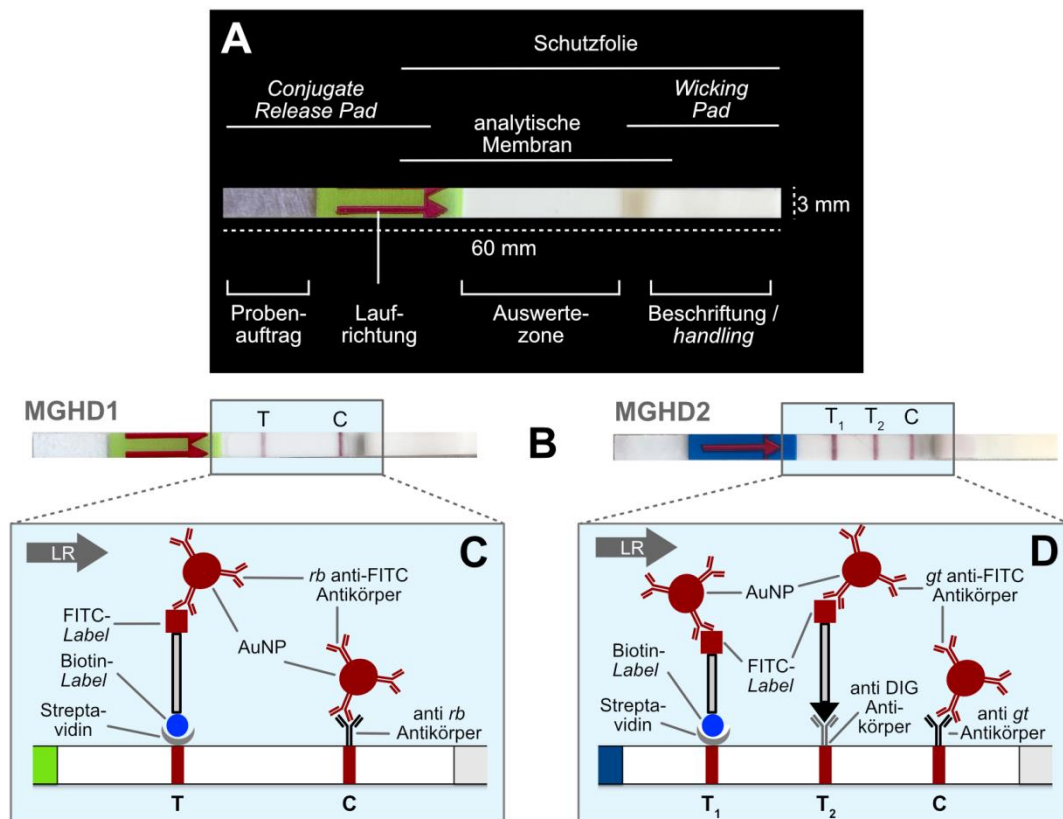


Abbildung 4 –Aufbau und Erscheinungsbild der Universalteststreifen MGH1 und MGH2. **(A)** Abmessungen und Zusammensetzung der LFDs **(B)** Teststreifen in Anwesenheit der Testlinien nach LFA **(C)** . Aufbau und Funktionsweise des MGH1 und **(D)** MGH2. [AuNP – Goldnanopartikel, rb – rabbit, gt – goat, LR - Lauf-richtung]

Zum Einsatz kamen zwei verschiedene LFDs, die sich in Aufbau und Funktionsweise unterscheiden (Abbildung 4). Der Teststreifen mit je einer Test- und Kontrolllinie wird als HybriDetect bzw. MGH1 bezeichnet, besitzt eine grüne Deckfolie und kann Biotin- und FITC- bzw. FAM- markierte Analyten auf der Testlinie detektieren. Das zweite LFD (HybriDetect 2T bzw. MGH2, 2 Testlinien und 1 Kontrolllinie, blaue Deckfolie) erkennt zusätzlich einen Digoxigenin und FITC- bzw. FAM- markierten Analyten. Beide Teststreifen verfügen über eine Immunoassaykontrolle, wobei immobilisierte Konjugat-spezifische Antikörper für das Abstoppen des mobilen Goldkonjugates genutzt werden. Eine Besonderheit dieser LFDs ist der Verzicht auf ein *sample application pad*, sodass bei diesen Teststreifen die Probe direkt auf das *conjugate release pad* appliziert werden kann, bzw. der gesamte Streifen in eine Probe gedippt werden kann (*dipstick*, Abbildung 4).

1.3. DNA-Amplifikationsmethoden als NALFIA-„Baustein“

Um Nukleinsäuren auf einem universellen, Antikörper-basierten LFD sichtbar zu machen, ist es notwendig die für das LFD erforderlichen Markierungen zu einzubauen (Posthuma-Trumpie, 2009). So werden auf Ebene der Nukleinsäure-basierten Analytik häufig DNA-Amplifikations- oder Hybridisierungsmethoden genutzt, um gezielt die für die Detektion relevanten *Label* einzufügen (Posthuma-Trumpie, 2009 / Zheng *et al.*, 2021). In der Abbildung 5 werden drei grundlegende und häufig verwendete Strategien beschrieben, bei der einzel- oder doppelsträngige DNA, bzw. RNA auf einem universellen LFD durch verschiedene Markierungsmuster via LFA sichtbar gemacht werden können.

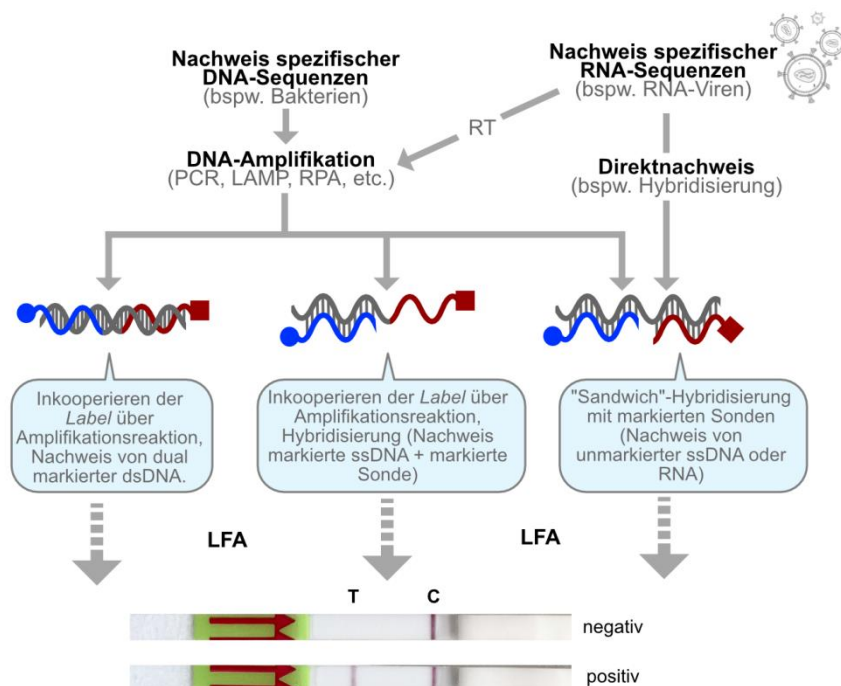


Abbildung 5 – Drei grundlegende Strategien für die Inkorporation LFD-relevanter Label in NALFIAs. Die blauen Linien symbolisieren Primer bzw. Sonden samt Biotin-Markierungen, die roten Linien hingegen FITC-/FAM-markierte Primer bzw. Sonden. RT steht für reverse Transkription.

Der spezifische Nachweis von DNA- oder RNA-Sequenzen beruht häufig auf einer DNA-Amplifikationsreaktion. In jener Amplifikationsreaktion können, z.B. durch markierte Primer, relevante *Label* in das Amplifikat eingebaut werden. Auf dem LFD würde letztlich ein dual markiertes Amplikon (dsDNA) nachweisbar (Pecchia *et al.*, 2019, Janz *et al.*, 2018). Alternativ können Hybridisierungsprodukte aus markiertem Amplikon (ssDNA) und markierter Sonde auf einem universellen LFD visualisiert werden (Loose und Breitbach *et al.*, 2020). Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher markierter Sonden gelingt über die sogenannte *Sandwich*-Hybridisierung die Visualisierung einzelsträngiger, unmarkierter DNA oder RNA (Aveyard *et al.*, 2007, Pöhlmann *et al.*, 2014). Die gewählten Beispiele verdeutlichen nicht nur die Relevanz der genutzten Markierungsstrategie für die *Performance* der Gesamtanalyse, sondern unterstreichen zudem die Vielfältigkeit der Lateral Flow-basierten Nukleinsäure-Analytik. Gerade in den vergangenen zwei bis

drei Jahren gab es eine Vielzahl an NALFIA-assozierten Innovationen in diesem Feld (Zheng *et al.*, 2021).

Der Begriff NALFIA wird in dieser Arbeit wie folgt definiert: Ein *nucleic acid lateral flow immunoassay* ist die methodische Kombination aus Nukleinsäure-basierter Präanalytik, die eine Auswertung via Lateral Flow, bei der ein Antikörper-basiertes LFD genutzt wird, ermöglicht. NALFIAs umfassen also nicht nur die Erkennung markierter Nukleinsäuren, sondern die Gesamtheit des damit verbundenen Nachweisverfahrens.

1.3.1. NALF(I)A-assozierte Amplifikationsmethoden – Eine Orientierung an der Fachliteratur

Im Rahmen dieser Arbeit steht die Kombination aus DNA-Amplifikation und LFA im Fokus. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf die bedeutendsten NALFIA-assozierten Amplifikationstechniken eingegangen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden über 300 Veröffentlichungen herangezogen, die diese Methodik verwendeten. Eine Kategorisierung dieser Publikationen entsprechend der verwendeten Amplifikationstechniken ergab ein interessantes Bild (Abbildung 6). Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass bis zum Jahr 2020 zahlreiche DNA-Vervielfältigungstechniken mit Lateral Flow-basiertem Detektion kombiniert wurden. Dazu zählt die älteste und bekannteste Amplifikationsmethode, die PCR. Interessanterweise wird die PCR nicht sehr häufig in Kombination mit LFAs verwendet. In lediglich 11,5% der betrachteten Veröffentlichungen kam die PCR zum Einsatz. Vielmehr wurden sogenannte isothermale Amplifikationsmethoden verwendet. Bei diesen Techniken gelingt die Vervielfältigung der DNA bei einer konstanten Temperatur. Auf kontinuierliches Heizen und Kühlen der Probe kann verzichtet werden. Zwei wichtige isothermale DNA-Amplifikationsmethoden im Lateral Flow Kontext und darüber hinaus sind die *loop mediated isothermal amplification* (LAMP) und die *recombinase polymerase amplification* (RPA). Fast zwei Drittel aller hier betrachteten Publikationen nutzen entweder die RPA oder die LAMP für die Entwicklung von NALF(I)As. Weitere isothermale Amplifikationstechniken wie die *strand displacement amplification* (SDA), *helicase dependent amplification* (HDA), *rolling circle amplification* (RCA) oder *multi cross displacement amplification* (MCDA) wurden bereits erfolgreich mit einem Lateral Flow *readout* kombiniert, finden sich aber verhältnismäßig selten in der Fachliteratur (Abbildung 6, Sonstige, 11,5%).

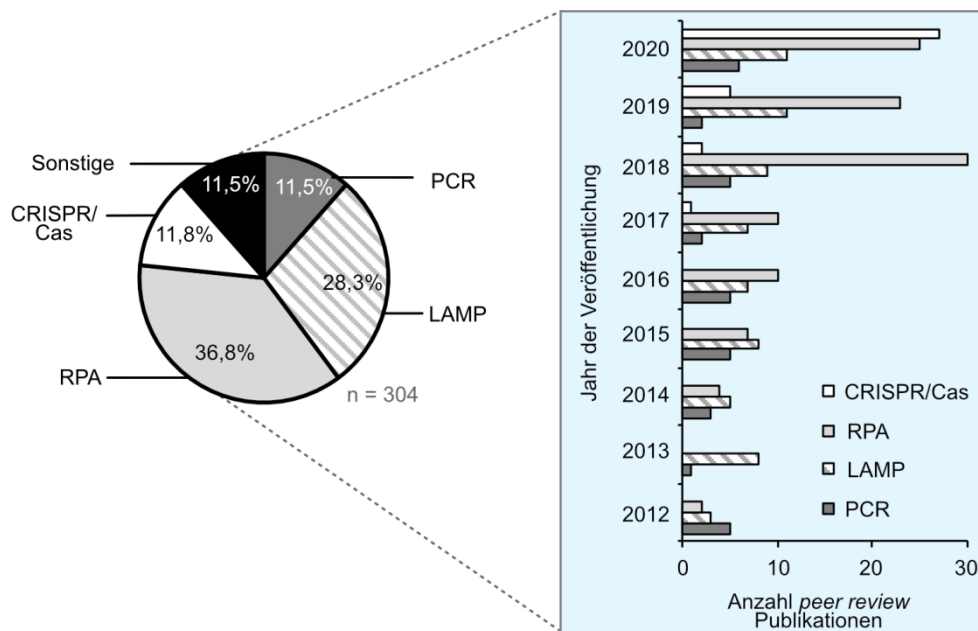


Abbildung 6 - Häufigkeit NALFIA-assoziierter Amplifikationsmethoden in *peer review* Veröffentlichungen. Das Kreisdiagramm beschreibt die prozentuale Verteilung der Amplifikationsmethoden, die einer Lateral Flow-basierten Auswertung „vorgeschaltet“ werden. Dabei wurden 304 begutachtete Publikationen berücksichtigt. Der Großteil dieser Veröffentlichungen entstammt den Jahren 2012-2020, woraus sich das Balkendiagramm (blauer Kasten) ableitet. Dargestellt ist die Anzahl jährlich erscheinender Publikationen je genutzter Amplifikationstechnik (Sonstige Techniken umfasst die HDA, SDA, RCA, MCDA).

Zurückzuführen ist dieser Umstand insbesondere auf zwei grundlegende methodische Ansätze. Zum einen nahm die Zahl der RPA-LFA Veröffentlichungen drastisch zu und zum anderen rückte eine 2017 erstmalig beschriebene, CRISPR-Cas-basierte Methodik in den wissenschaftlichen Fokus. Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus DNA-Amplifikation und einer Amplikon-Erkennung durch einen definierten CRISPR-Cas-Komplex, der bei erfolgreicher Detektion des Amplikons eine starke Nukleaseaktivität entfaltet (Myhrvold *et al.*, 2018). Die Mischung aus DNA-Amplifikation und Nukleaseassay kann via Lateral Flow ausgewertet werden und beschreibt einen wichtigen NALFIA-Trend der vergangenen Jahre (Abbildung 6; 11,8%). Im Folgenden werden die hier hervorgehobenen Amplifikationsmethoden genauer erklärt. Neben der PCR wird auf die LAMP, RPA und CRISPR-Cas-basierte Nachweistechiken eingegangen.

1.3.2. Polymerase Chain Reaction

Das Konzept der Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde in den frühen 1980er Jahren durch Kary Mullis entwickelt und später veröffentlicht (Mullis *et al.*, 1986 / Mullis und Faloona, 1987). Im Jahr 1993 erhielt Mullis mit Michael Smith den Nobelpreis für Chemie. Fortan hat die PCR die Molekularbiologie revolutioniert (Surzycki, 2000).

Die PCR definiert sich als *in vitro* DNA-Amplifikationsmethode, bei der durch zyklisches Erwärmen und Abkühlen der Probe ein definiertes DNA-Fragment Enzym-vermittelt vermehrt werden kann (Mullis und Faloona, 1987). In diesem Zusammenhang erwies sich der Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen, gram-negativen Bakterium *Thermus aquaticus* als

wesentlicher technischer Fortschritt für die PCR (Saiki *et al.*, 1988). Inzwischen existieren unzählige Abwandlungen der PCR, die für unterschiedliche Zwecke optimiert wurden. Von diagnostischen Nachweisverfahren, forensischen Analysen bis hin zu Klonierungen, Sequenzierungen, Genexpressionsanalysen oder Mutagenese-Experimenten ist die PCR oft essentieller Bestandteil (Jeffreys *et al.*, 1988 / Marchuk *et al.*, 1991 / Shimada, 1996 / Ståhlberg *et al.*, 2017). Bis heute, fast 40 Jahre nach den ersten Beschreibungen dieser Methode gilt die PCR als eines der vielfältigsten und wichtigsten methodischen Werkzeuge in Laboratorien auf der ganzen Welt (Zhu *et al.*, 2020).

1.3.2.1. Der grundlegende Mechanismus einer PCR

Template DNA, kurze einzelsträngige Oligonukleotide (Primer), DNA-Bausteine (dNTPs), sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase sind die essentiellen Bestandteile einer PCR (Mullis und Faloona, 1987). Durch Erhitzen dieser Komponenten in einem Reaktionsgefäß über 90°C kann die doppelsträngige *template* DNA in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen werden. Dieser erste Schritt wird als Denaturierung bezeichnet und ermöglicht das spezifische Binden zweier Primer durch Abkühlen der Reaktion auf eine definierte Annealing-Temperatur, die i.d.R. zwischen 50 und 70°C liegt.

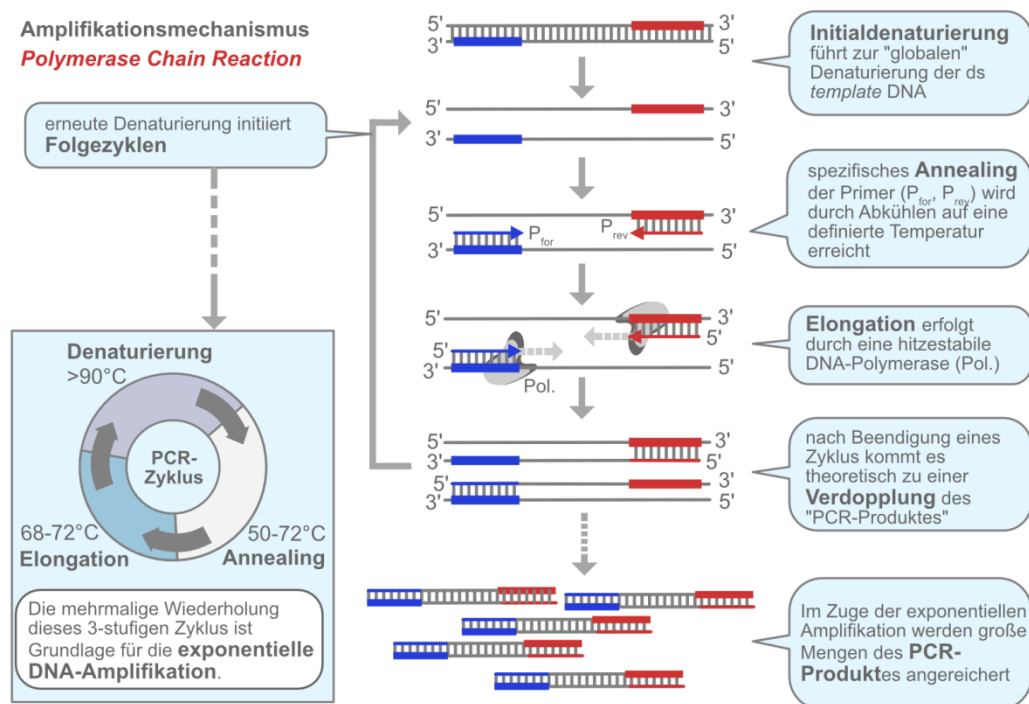


Abbildung 7 - Amplifikationsmechanismus der „klassischen“ *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA fungiert als *template* für die Amplifikationsreaktion, bei der durch Hitze (>90°C) ds DNA denaturiert wird. Durch Abkühlen des Reaktionsgemisches können Primer (blaue und rote Pfeile) spezifisch an die Primerbindestellen (rote und blaue Balken) bindet, was als Annealing beschrieben wird. Die Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Pol.) wird durch das Erwärmen der Reaktion auf eine Temperatur zwischen 68-72°C initiiert. Durch mehrmalige Wiederholung dieses 3-stufigen Zyklus kommt es exponentiellen Vermehrung eines durch die Primersequenzen definierten PCR-Produktes.

Dem Primer-Annealing folgt die DNA-Polymerisation, welche an den freien 3'-OH-Enden der gebundenen Primer durch eine i.d.R. thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert wird (Saiki *et al.*, 1988). Diese sequenzspezifische Verlängerung der Primer ist innerhalb der PCR als Elongation definiert. Das daraus hervorgehende Produkt steht in der weiteren Reaktion als *template*

DNA zur Verfügung. Folglich kommt es innerhalb eines Zyklus, welcher sich aus Denaturierung, Annealing und Elongation zusammensetzt, zu einer Verdopplung der Ziel-DNA (Mullis und Faloona *et al.*, 1986). Durch mehrmaliges Durchlaufen dieses Zyklus (i.d.R. 25- bis 40-mal) wird das PCR-Produkt exponentiell vervielfältigt, wodurch innerhalb einer Amplifikationsreaktion mit 30 Zyklen rechnerisch aus 1 Kopie dsDNA weit mehr als 100 Milliarden Kopien entstehen können (Templeton, 1992). Die Abbildung 7 bildet den grundlegenden Ablauf der PCR ab.

1.3.2.2. PCR und Lateral Flow

Wie bereits beschrieben kann die PCR, als älteste und wahrscheinlich facettenreichste DNA-Amplifikationstechnik beschrieben werden (Zhu *et al.*, 2020). Über die Jahre konnten zahlreiche Abwandlungen der ursprünglichen Methode erarbeitet werden, sodass immer mehr Bereiche in der Wissenschaft und weit darüber hinaus maßgeblich profitierten (Powledge, 2004). Die Entwicklung von *Real Time* PCR oder digitaler PCR, bei der durch Bestimmung der Fluoreszenzänderung innerhalb einer Amplifikationsreaktion quantitative Analysen ermöglicht werden, ist nur ein Meilenstein der PCR-Geschichte (Higuchi *et al.*, 1993 / Morley, 2014). Die Modifizierung und Optimierung aller relevanter PCR-Komponenten, die Kombination mit anderen Enzymen, sowie die Entwicklung multipler Auswerteformate zur Beurteilung einer PCR sind als wichtige Bausteine dieser vielseitigen Methode einzuordnen (Imanaka, 2011 / Zhu *et al.*, 2020). Allerdings wird die PCR bisher vergleichsweise selten mit Lateral Flow-basierter *readout* verknüpft (Abschnitt 1.3.1., Abbildung 7). Diese Kombination scheint jedoch nicht zuletzt aus aktuellem Anlass besonders an Bedeutung zu gewinnen.

Bereits 2007 präsentierte Aveyard *et al.* eine NALFA-Technologie, bei der unmarkierte Amplifikationsprodukte ausschließlich über Hybridisierung mit spezifischen Sonden visualisiert werden konnten (LFD gemäß Abbildung 3). So gelang die Etablierung einer MRSA spezifischen PCR und nachgeschalteter Nachweis-spezifischer LFA zur Detektion des Amplikons. Eine Weiterentwicklung dieser Technik wurde u.a. durch Ang *et al.* (2016) präsentiert. Hier wurde eine asymmetrische PCR-Variante, die sogenannte LATE-PCR (*linear after the exponential polymerase chain reaction*), genutzt, um den Anteil einzelsträngiger Amplikons zu erhöhen (Sanchez *et al.*, 2004). In der abschließenden LFA hybridisierten die einzelsträngigen PCR-Produkte der *duplex* LATE-PCR an immobilisierte, spezifische DNA-Sonden. Durch Nutzung FITC-markierter Primer in der Amplifikation gelang die universelle Detektion der Hybridisierungsprodukte durch anti-FITC Antikörper, welche an Goldnanopartikel konjugiert wurden. Es handelt sich um eine Mischform aus Sonden-basierter Detektion und Immunoassay (Abbildung 3). Diese Arbeit unterstreicht zwei wichtige Aspekte, die mit PCR-LFAs einhergehen. Zum einen können bereits existierende Abwandlungen der Amplifikationsmethode mit Eigenschaften der Auswerteplattform verbunden werden. Zum anderen handelt es sich bei der PCR um eine Technik, die *multiplexing*, also die parallele Amplifikation

verschiedener PCR-Produkte, erlaubt. Dies ist ein wichtiger Punkt, der im Lateral Flow-Kontext genutzt werden kann (Mens *et al.*, 2012 / Roth *et al.*, 2018).

Spezifität, Sensitivität, *multiplexing* und der direkte Probeneinsatz sind nur einige Vorteile, die die PCR mit sich bringt (Franzo *et al.*, 2018). Das Maß an erforderlicher Expertise und der Technisierungsgrad einer PCR verleihen dieser Technik aber den Ruf, eine reine Labormethode zu sein, die sich weniger für Feldanwendungen eignet, was den Fokus auf alternative Amplifikationsmethoden lenkt (Kim und Easley *et al.*, 2011).

1.3.3. Isothermale DNA-Amplifikationsmethoden

Der Verzicht auf komplexere Gerätschaften ist eine Grundidee, die der Entwicklung isothermaler DNA-Amplifikationstechniken zugrunde liegt (Gill und Ghaemi, 2008). Die PCR verlangt nicht nur genaues und reproduzierbares, sondern vor allem schnelles Heizen und Kühlen der Probe. Diese Anforderungen verdeutlichen den nicht zu vernachlässigenden Geräteaufwand, der mit einer PCR einhergeht (Kim und Easley *et al.*, 2011 / Gill und Ghaemi, 2008).

Seit den frühen 1990er Jahren wurden zunehmend isothermale Nukleinsäure- Amplifikationstechniken präsentiert (Li *et al.*, 2018). Durch das Nachahmen von *in vivo* DNA-Vervielfältigungsmechanismen kann bspw. über die Nutzung spezieller Enzyme wie Helicasen, Recombinasen oder Einzelstrangbindeproteinen ein initiales Annealing von Primern ohne vorherige Temperatur-abhängige Denaturierung erfolgen (Piepenburg *et al.*, 2006 / An *et al.*, 2005). Auch die Verwendung erhöhter Temperaturen in Kombination mit Reaktionsadditiven wie bspw. Betain kann die partielle Denaturierung von *template* DNA ermöglichen, sodass eine Amplifikation initiiert werden kann (Notomi *et al.*, 2000 / Liu *et al.*, 2005). Die Verwendung spezieller DNA-Polymerasen kann dabei als eine Schlüsselkomponente betrachtet werden, die eine DNA-Vervielfältigung bei einer konstanten Temperatur erlaubt. Dabei ist die starke Strangverdrängungsaktivität und die fehlende 5' → 3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase zumeist ein entscheidendes Charakteristikum der isothermalen Amplifikation (Notomi *et al.*, 2000 / Piepenburg *et al.*, 2006 / Wang *et al.*, 2015). In der Tabelle 2 sind verschiedene isothermale Amplifikationstechniken aufgelistet, die erfolgreich mit einer Lateral Flow-basierten Amplikon-Erkennung kombiniert wurden. Im Folgenden wird detaillierter auf die bedeutendsten beiden isothermalen Amplifikationsmethoden RPA und LAMP eingegangen (Abbildung 6).

Tabelle 2 – Übersicht isothermaler DNA-Amplifikationsmethoden (LFA-kompatibel)

Vollständiger Name der Methode	Abkürzung	T in °C	Anzahl Primer	Relevante Enzyme	Referenz Methode	Referenz NALFA
<i>loop mediated isothermal amplification</i>	LAMP	60-65°C	4 bis 6	<i>Bst</i> Polymerase	Notomi <i>et al.</i> , 2000	Allgöwer <i>et al.</i> , 2020
<i>strand displacement amplification</i>	SDA	37°C	2	Endonuklease <i>HincII</i> , <i>E. coli</i> DNA Polymerase I (exo ⁻ Klenow)	Walker <i>et al.</i> , 1992	Fang <i>et al.</i> , 2014
<i>thermophilic helicase dependent amplification</i>	tHDA	60-65°C	2	<i>Tte-UvrD</i> Helicase, <i>Bst</i> Polymerase oder Fusionsprotein aus beiden	An <i>et al.</i> , 2005 / Motré <i>et al.</i> , 2008	Zasada <i>et al.</i> , 2018
<i>multi cross displacement amplification</i>	MCDA	61-65°C	10	<i>Bst</i> Polymerase	Wang <i>et al.</i> , 2015	Wang <i>et al.</i> , 2018
<i>recombinase polymerase amplification</i>	RPA	37-42°C	2	T4 UvsX Recombinase, T4 UvsY, T4 Gene 32 Protein, <i>Bsu</i> DNA Polymerase I	Piepenburg <i>et al.</i> , 2006	Piepenburg <i>et al.</i> , 2006
<i>polymerase spiral reaction</i>	PSR	60-65°C	2	<i>Bst</i> Polymerase	Liu <i>et al.</i> , 2015	Lin <i>et al.</i> , 2021
<i>nucleic acid sequence-based amplification</i>	NASBA	ca. 41°C	2	RNaseH, reverse Transcriptase, RNA-Polymerase	Compton, 1991	Yrad <i>et al.</i> , 2019
<i>cross priming amplification</i>	CPA	60-68°C	5 oder mehr	Endonuklease und <i>Bst</i> Polymerase	Xu <i>et al.</i> , 2012	Huang <i>et al.</i> , 2014

1.3.3.1. Loop mediated isothermal Amplification - LAMP

Die *loop mediated isothermal amplification* (LAMP) wurde erstmalig durch Notomi *et al.* (2000) beschrieben. Im Gegensatz zur PCR wird bei der LAMP nicht nur bei einer konstanten Temperatur von etwa 60°C bis 65°C DNA amplifiziert, sondern darüber hinaus sind vier bis sechs Primer, die sechs bis acht spezifische Sequenzbereiche adressieren, für eine effiziente Vervielfältigungsreaktion erforderlich (Notomi *et al.*, 2000). Dieser Umstand verdeutlicht die, im Vergleich zur PCR, gesteigerte Komplexität hinsichtlich des erforderlichen Primerdesigns (Abbildung 8 A). Die Kombinierbarkeit mit der reversen Transkription als *one pot* System ist ein wichtiges Charakteristikum der LAMP und gerade für die Virusdiagnostik von großer Bedeutung (Lee *et al.*, 2017 / Dong *et al.*, 2021). Zudem haben optimierte LAMP Polymerasen ggf. eine eigene RT-Aktivität, die durch Zugabe von reverser Transkriptase zusätzlich verstärkt werden kann (Wang *et al.*, 2017). Die Auswertung einer LAMP-Reaktion kann sehr vielfältig erfolgen. Genutzt werden dabei AGE, Fluoreszenz-basierte Detektion (RT-Cycler, Blau- oder UV-Licht), Eintrübungen, sowie Lateral Flow Tests oder Indikator-vermittelte Farbumschläge (Peng *et al.*, 2017 / Fischbach *et al.*, 2015 / Aoi *et al.*, 2006). Unter Verwendung einer geeigneten Primerkombination können sehr empfindliche und schnelle Nachweisverfahren entwickelt werden, was die LAMP zu einem sehr wichtigen Werkzeug für *Point-of-Care* Anwendungen macht (Yongkiettrakul *et al.*, 2014).

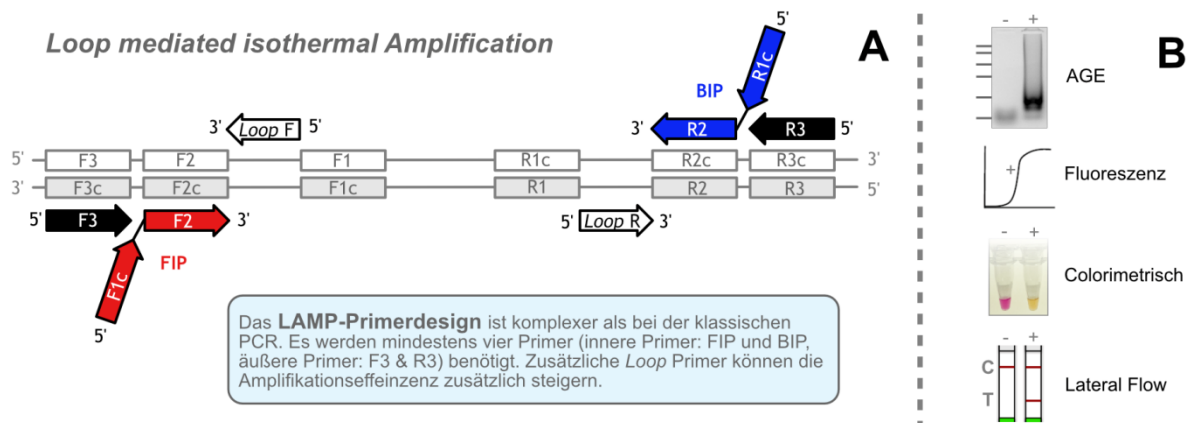


Abbildung 8 – Übersicht LAMP **(A)** Primerdesign und **(B)** mögliche Plattformen zur Auswertung von LAMP-Produkten. Die Pfeile in Teilabbildung A kennzeichnen Primer, wobei die grauen Linien und Kästchen die doppelsträngige template DNA inklusive Primerbindestellen symbolisieren. AGE steht für Agarosegelelektrophorese.

Dabei können einfache Heizblöcke, Wasserbäder oder sogar *Sous Vide* Garer für die Amplifikationsreaktion bei etwa 60°C zum Einsatz kommen (Joung *et al.*, 2020). Eine der ersten Arbeiten, in der LAMP und LFA kombiniert wurden, stammt aus Thailand und beschreibt den Nachweis einer Virus-vermittelten Erkrankung von Krebstieren (Kiatpathomchai *et al.* 2008). Unter optimierten Bedingungen kann eine LAMP in 10 bis 20 Minuten Resultate generieren, bei denen weniger als 10 DNA-Kopien je μL detektiert werden können (Zhang *et al.*, 2020). Aufgrund der komplexen Anforderungen an das Assay-Design, wird das *multiplexing* erschwert, ist aber grundsätzlich möglich (Iseki *et al.*, 2007).

1.3.3.2. Recombinase Polymerase Amplification

2006 wurde die isothermale *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA) durch die Gruppe um Niall Armes erstmalig beschrieben und direkt mit einem universellen Lateral Flow Immunoassay kombiniert (Piepenburg *et al.*, 2006). Die RPA ist eine isothermale, hoch sensitive und selektive DNA-Amplifikationstechnik, die bei 37-42°C durchgeführt wird. Die gezielte Kombination der Rekombinase T4 UvsX, dem Einzelstrangbindeprotein G32P, dem *crowding agent* Carbowax20, dem Beladungsfaktor T4 UvsY, sowie einer DNA-Polymerase mit starker Strangverdrängungsaktivität ermöglicht die Amplifikation unter Zuhilfenahme zweier Primer bei konstant niederen Temperaturen (Abbildung 7). Der detaillierte Amplifikationsmechanismus der RPA kann im Anhang nachvollzogen werden (Abschnitt 9.1.2.1). Mit Hilfe einer RPA gelingen Nachweise von 1-10 Kopien des *templates* in nur 10 bis 30 Minuten (Lobato und O'Sullivan, 2018). Als besonderes Charakteristikum wird häufig die geringe Anfälligkeit für Matrix-abhängige Inhibition angeführt, was diese Methode für direkte Analysen an verschiedensten Probenmatrices wie Urin, Pleuraflüssigkeit, Milch oder Stuhlproben qualifiziert (Krölov *et al.*, 2014 / Liljander *et al.*, 2015 / Choi *et al.*, 2016 / Wu *et al.*, 2016).

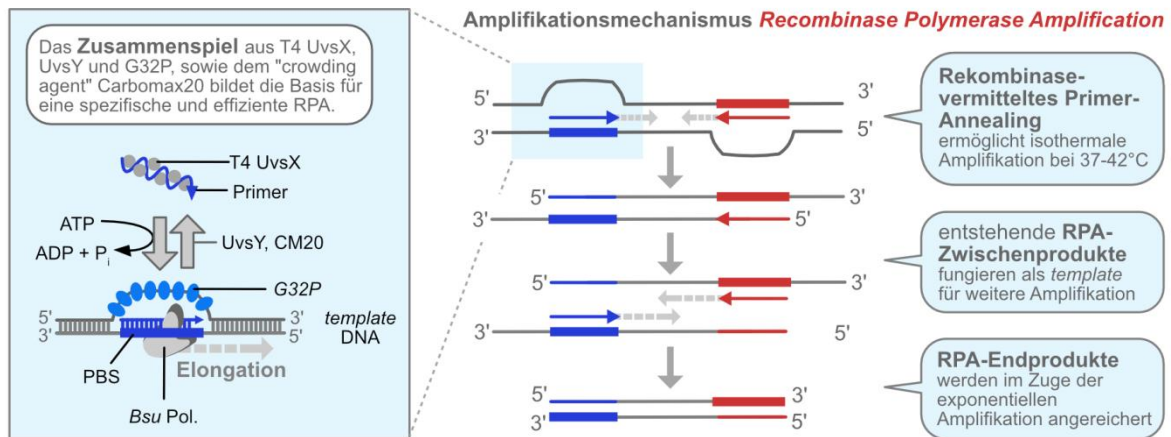


Abbildung 9 – Mechanismus der *Recombinase Polymerase Amplification*. In der Amplifikationsreaktion symbolisieren rote und blaue Pfeile RPA-Primer. Die Rekombinase T4 UvsX interagiert mit den Primern und vermittelt im Zusammenspiel mit dem Einzelstrangbindeprotein G32P ein spezifisches Annealing der Primer an den Primerbindestellen (PBS – rote und blaue Bereiche in der ds *template* DNA), welches unabhängig von einer „globalen“ Denaturierung ist. Gestrichelte graue Pfeile symbolisieren den Elongationsprozess durch die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *B. subtilis* (*Bsu* Pol.).

Die Amplifikationstemperatur von etwa 37°C lässt sich durch die Nutzung von einfachen Inkubatoren, Wasserbädern, Heizblöcken oder der bloßen Körperwärme erreichen (Crannell *et al.*, 2014 / Rohrmann *et al.*, 2012 / Escadafal *et al.*, 2014). Mehrfach konnte gezeigt werden, dass sich die RPA u. U. auch für *multiplex*-Anwendungen eignen kann (Crannell *et al.*, 2016 / Soliman *et al.*, 2018). Die Charakteristika dieser Methodik unterstreichen die Relevanz für *Point-of-Care* Anwendungen, wodurch der Kombination von Lateral Flow und RPA eine besondere Bedeutung verliehen wird (Abbildung 6). Methodisch kommt hier der Endonuklease IV (nfo) aus *Escherichia coli* eine wichtige Rolle zu, da diese gerade für RPA-LFAs besonders häufig genutzt wird (Lobato und O’Sullivan, 2018). Der nfo-basierte Nachweismechanismus, sowie die Verbildlichung dreier relevanter RPA-LFA Veröffentlichungen können dem Anhang entnommen werden (Abschnitt 9.1.2.1).

1.3.4. CRISPR-Cas-vermittelte NALFIAs

Das CRISPR-Cas-System kann man als Äquivalent eines Immunsystems ansehen, welches im Genom von Bakterien und Archaeen verankert ist (Horvath und Barrangou, 2010). Der zugrunde liegende Mechanismus schützt diese Organismen vor Infektion mit Phagen durch die Erkennung und Degradierung „fremder“ Nukleinsäuren (Terns und Terns, 2011). Das CRISPR-Cas-System hat die Fähigkeit zu „lernen“, sich zu „erinnern“, zu „adaptieren“ und basiert auf sich wiederholenden DNA-Sequenzen, welche als *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) bezeichnet werden. Darüber hinaus fungieren CRISPR-assoziierte Genprodukte (Cas-Proteine) im Zusammenspiel mit transkribierten CRISPR-RNAs (crRNAs) als Komplexe, welche spezifische Bereiche eines viralen Genoms adressieren können. Eine entscheidende Funktion der Cas-Proteine ist die Endonukleaseaktivität, welche der spezifischen Degradierung viraler Nukleinsäuren dient. Die Kombination aus crRNA-vermittelter, Sequenz-spezifischer Erkennung und dem nukleolytischen

Abbau stellt die Grundlage für die Entwicklung der CRISPR-Cas-vermittelten Genomeditierung dar (Garneau *et al.*, 2010 / Jinek *et al.*, 2012). Seither hat sich insbesondere die als „Genschere“ bekannte CRISPR-Cas9-Methodik zu einem der wichtigsten Werkzeuge der Molekularbiologie entwickelt (Adli, 2018). 2020, acht Jahre nach der wichtigen Publikation von Jinek *et al.* (2012), wurde der Nobelpreis für Chemie an die federführenden Forscherinnen Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna für deren Arbeit an eben jener Technologie verliehen (Ledford und Callaway, 2020).

In den letzten Jahren wurde der zugrunde liegende Mechanismus immer besser charakterisiert, verschiedene Cas-Protein Typen und Subtypen entdeckt und klassifiziert (Makarova und Koonin, 2015 / Russel *et al.*, 2020). So beschrieben Mitarbeiter der Gruppe um Feng Zhang, einem weiteren Pionier der CRISPR-Cas Technologie, dass Subtypen der Cas13-Familie die „programmierbare“ Degradierung von RNA ermöglichen (Abudyyeh, Gootenberg und Konermann *et al.*, 2016). Ein Charakteristikum einzelner Subtypen dieser Cas-Familie ist u.a. die ungerichtete, kollaterale RNase-Aktivität, die durch crRNA-vermittelte Erkennung initiiert werden kann. Dieser Mechanismus lässt sich nicht nur für *Transcript-Knockdown* oder *Live Transcript Imaging* nutzen, sondern auch für die Sequenz-spezifische Detektion von Nukleinsäuren (Abudayyeh und Gootenberg *et al.*, 2017^a / Yang *et al.*, 2019). So beschrieben ein Jahr später Abudayyeh und Gootenberg *et al.* (2017^b) eine CRISPR-Cas-vermittelte *in vitro* Nukleinsäure-Erkennungstechnik, die sie *specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking* (SHERLOCK) nannten. Hierbei kombinierten sie isothermale DNA-Amplifikation (RPA / RT-RPA) mit der Cas13a-vermittelten Sequenz-spezifischen Amplikonerkennung, was letztlich in der Degradierung eines speziell konzipierten, einzelsträngigen und speziell modifizierten, RNA-Oligonukleotids (Reporter) resultiert. Das daraus hervorgehende Signal kann Fluoreszenz-basiert oder über ein adäquates LFD detektiert werden (Abudayyeh und Gootenberg *et al.*, 2017^b / Myhrvold *et al.*, 2018). Als Ergänzung oder Weiterentwicklung dieser grundlegenden Technik versteht sich die DETECTR-Methode aus dem Labor von Jennifer Doudna (Chen *et al.*, 2018). DETECTR steht für DNA *endonuclease targeted CRISPR trans reporter* und nutzt das Cas Protein 12a. Im Gegensatz zum Cas13a erkennt dieser CRISPR Komplex dsDNA, wodurch ein im SHERLOCK-System erforderlicher T7-Transkriptionsschritt entfällt. Darüber hinaus entfaltet Cas12a eine kollaterale Nukleaseaktivität, die sich gegen ssDNA richtet und ssRNA (Chen *et al.*, 2018 / Abudayyeh und Gootenberg *et al.*, 2018). Beide CRISPR-Cas-basierten Nukleinsäure-Erkennungstechniken sind aufgrund zweier nacheinander geschalteter Verstärker-Reaktionen z.T. extrem sensitiv und bei Verwendung einer gut selektierten crRNA zudem sehr spezifisch (Myhrvold *et al.*, 2018 / Lee *et al.*, 2020). Die Kompatibilität mit einem einfachen Lateral Flow –basierten Auswertung erweitert die *Point-of-Need* Tauglichkeit dieser Technik (Myhrvold *et al.*, 2018 / Broughton *et al.*, 2020).

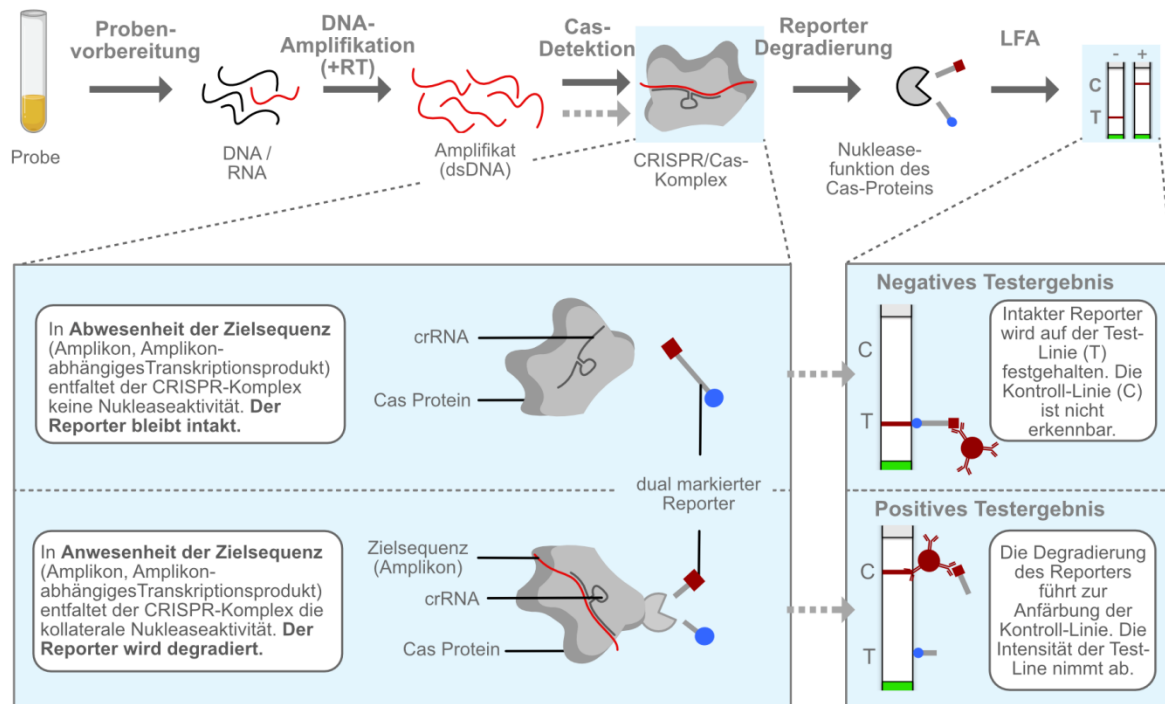


Abbildung 10 – CRISPR-Cas-basierter NALFIA. Nach Probenvorbereitung erfolgt i.d.R. eine DNA-Amplifikation (zumeist isothermal, ggf. mit reverser Transkription [RT]). Über den definierten CRISPR-Cas-Komplex erfolgt die Sequenz-spezifische, „programmierbare“ Erkennung einer Zielsequenz, wodurch das Cas-Protein eine kollaterale Nukleaseaktivität entfaltet, die zur Degradierung eines universellen dual markierten Reporters führt. Durch LFA kann der Status des Reporters visualisiert werden (LFD gemäß Abb. 5).

Im Fokus bisheriger Arbeiten mit diesem Nachweissystem liegt vor allem die teils sehr anspruchsvolle Virusdiagnostik, weshalb u.a. Nachweise für SARS-CoV-2, Zika Virus, Dengue Virus, Afrikanischem Schweinepest Virus etabliert wurden (Broughton *et al.*, 2020 / Myhrvold *et al.*, 2018 / Abudayyeh und Gootenberg *et al.*, 2018 / Wang *et al.*, 2020). Allen Arbeiten ist die Betonung auf die Wichtigkeit der Feldanwendung durch Nutzung eines universellen LFDs gemein. Hervorzuheben ist die Lateral Flow basierte Nachweisstrategie, die der klassischen Auswertung entgegensteht. Mit ein und demselben universellen Teststreifen gelingt der Nachweis durch das Integrieren relevanter Markierungen in den Analyten, was in dieser Arbeit als *Label-Inkorporations-Strategie* bezeichnet wird. Durch Nutzung eines Reporters lässt sich das Konjugat (fast) vollständig auf der unteren Linie des Teststreifens zurückhalten. Durch Reporterdegradierung werden die *Label* separiert, was dazu führt, dass Konjugat die untere Linie überfließt und auf der oberen Linie abgefangen wird. Folglich ändert sich durch diesen strategischen Ansatz die Bedeutung von Test- und Kontrolllinie, obwohl das LFD identisch ist. Diese alternative Nutzungsstrategie des Universalteststreifens MGHd ist wesentlicher methodischer Teil dieser Arbeit und wird als Reporter-Degradierungs-Strategie umschrieben.

2. Zielstellung

Der Stellenwert einfacher und *Point-of-Care* kompatibler Nachweismethoden ist insbesondere aufgrund der aktuellen pandemischen Situation weltweit immens. Lateral Flow Schnelltests bedienen nicht nur im Kontext der COVID-19 Pandemie extrem wertvolle diagnostische Nischen, da Analysen außerhalb spezialisierter Labore ermöglicht werden. Klassische Lateral Flow Immunoassays stehen dabei zumeist im Fokus dieser methodisch vielseitigen Plattform.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Spezialform des Lateral Flow Assays (LFAs) genauer zu beleuchten, zu hinterfragen und kritisch zu diskutieren. *Nucleic Acid Lateral Flow (Immuno-) Assays* (NALF[I]As), also die methodische Kombination aus DNA-Amplifikation und LFA standen dabei im Fokus dieser Arbeit. Auf Basis umfangreicher Literaturrecherchen galt es, eigene NALFIA-Entwicklungen anzustoßen. Dabei wurde definiert, dass etwaige Testentwicklungen unter Berücksichtigung eines klaren Praxisbezugs zu erfolgen haben. Nach Möglichkeit sollten dabei verschiedene Bereiche, in denen molekulare Schnelltests Einfluss nehmen können, abgedeckt werden.

In dieser Arbeit rückte insbesondere die *Polymerase Chain Reaction* (PCR), als repräsentative DNA-Amplifikationsmethode in den Mittelpunkt NALFIA-assoziiierter Fragestellungen. Die PCR wurde gerade im Kontext *Point-of-Care* tauglicher DNA-Vervielfältigungstechniken als eine weniger genutzte Technik eingestuft (Abschnitt 1.3.1.). Hieraus leiten sich die wichtige Fragen nach generellen, aber auch Methoden-spezifischen Limitation dieser Technik ab. Deshalb wurde als weiteres, zentrales Ziel dieser Arbeit herausgestellt, NALFIA-charakteristische Limitationen herauszuarbeiten, klar zu benennen und kritisch zu diskutieren. Auf Basis dieser Vorarbeiten sollten methodische Strategien entwickelt werden, die einen Beitrag zur Umgehung oder Vermeidung jener Limitationen leisten sollen.

Die Erarbeitung methodischer Innovationen bildet eine weitere zentrale Säule dieser Arbeit. Die Neuentwicklung eigener Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren mittels DNA-Amplifikation und LFA werden als zusätzliches Ziel definiert. Letztlich gilt es dazu beizutragen, einen tieferen Einblick in die NALFIA-*toolbox* zu erlangen und darüber hinaus einen eigenen Anteil an der Erweiterung dieser methodischen Entwicklungs-Plattform zu leisten.

Anhand dieser Beschreibung lassen sich fünf klare Ziele benennen:

1. Entwicklung von NALFIAs mit erkennbarem praktischen Bezug
2. Den Stellenwert der PCR im NALFIA Kontext herausstellen
3. Generelle und PCR-LFA-spezifische Limitation herausarbeiten
4. Umsetzbare Lösungsstrategien für eben jene Limitation entwickeln
5. Entwicklung neuer NALFIA-Techniken anstoßen.

3. Material und Methoden

Der Material- und Methoden- Teil versucht die Reihenfolge der Assay-Entwicklung, bzw. die Abarbeitung eines NALFIAs wider zu spiegeln. Beginnend mit der Vorbereitung von charakterisiertem Probenmaterial (*template*) werden anschließend Details zu den entwickelten Amplifikationsmethoden beschrieben. Bei der Auswertung der Amplifikate nimmt die Lateral Flow Analyse die zentrale Rolle ein. Aber auch statistische Methoden zur Beurteilung von Testverfahren werden beschrieben. Zusätzliche Methoden, die erforderlich sind, um die Performance etablierter Nachweise zu prüfen sind ebenfalls aufgeführt. Da viele verschiedene Themengebiete für die Versuche herangezogen wurden, werden außerordentlich „spezifische“ Methoden ergänzend im Anhang aufgeführt. Der Material- und Methoden-Teils legt den Fokus auf die NALFIA-Methodenentwicklung.

3.1. Das *template*: Herstellung natürlicher und künstlicher Proben für die Entwicklung von NALFIAs

In der Entwicklung von Amplifikationsmethoden ist die Nutzung genau charakterisierten Probenmaterials (*template*) sehr wichtig. Aus diesem Grund nimmt die Erstellung und Charakterisierung des Probenmaterials für die Assay-Entwicklung im Rahmen dieser Arbeit einen hohen Stellenwert ein. Als Grundlage für die Analysen dienten je nach Nachweis entweder lebende Zellen aus Kulturen / Anreicherungen oder aber künstlich erstelltes Probenmaterial, wie bspw. Plasmide oder PCR-Fragmente. Im ersten Teil werden verwendete Organismen und wichtige Kultivierungstechniken beschrieben.

3.1.1. natürliche *templates* – Kultivierung, Kulturbestätigung und DNA-Extraktion

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von NALFIAs ist die Güte der verwendeten Proben. Dabei spielen natürliche Proben eine wichtige Rolle, um eine möglichst praxisnahe Nachweisetablierung gewährleisten zu können. Deshalb war es erforderlich relevante Organismen kultivieren zu können. Die Tabelle 3 liefert einen Überblick über die wichtigsten Organismen, die in dieser Arbeit genutzt wurden.

3.1.1.1. Übersicht verwendeter Organismen

Tabelle 3 – Übersicht der in der Arbeit verwendeten Organismen

Hintergrund	Organismus	Beschreibung	Quelle(n)
Nachweis bier- schädigender Bakterien	<i>Lactobacillus brevis</i> (11 Isolate)	obligat bierschädigend	verschiedene
	<i>Lactobacillus lindneri</i> (6 Isolate)	obligat bierschädigend	verschiedene
	<i>Lactobacillus (para-) collinoides</i> (2 Isolate)	obligat bierschädigend	verschiedene
	<i>Lactobacillus backi</i> (3 Isolate)	obligat bierschädigend	verschiedene
	<i>Pediococcus damnosus</i> (2 Isolate)	obligat bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Lactobacillus casei</i> (3 Isolate)	fakultativ bierschädigend	verschiedene
	<i>Lactobacillus rossiae</i> (4 Isolate)	obligat / fakultativ bierschädigend	verschiedene
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	fakultativ bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	fakultativ bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Lactobacillus perolens</i>	fakultativ bierschädigend	VELTINS Brauerei
	<i>Lactobacillus harbinensis</i> 2385B	fakultativ bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Lactobacillus curtus</i>	obligat / fakultativ bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Lactobacillus cerevisiae</i> (2 Isolate)	obligat bierschädigend	verschiedene
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	nicht bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Acetobacter aceti</i>	nicht bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
Homo-/ Hetero- plasmietest	<i>Lactococcus lactis</i>	fakultativ bierschädigend	Doemens Academy
	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> 2308	fakultativ bierschädigend	TUM - BLQ Weihenstephan
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Wildtyp	AG Johanningmeier
Validierung <i>Alicyclo- bacillus</i> Nachweise	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - Fud7	<i>psbA</i> -Deletionsmutante	AG Johanningmeier
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - MCS	Mutante, Rezipient Fud7	AG Johanningmeier
	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 49025	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	DSMZ
	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (#00854)	Praxisisolat, Fruchtsaft-schädigend	LADR
	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (#67216)	Praxisisolat, Fruchtsaft-schädigend	LADR
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> NCIMB 11725	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	LADR
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	DSMZ
	<i>Alicyclobacillus herbarius</i> DSM 13609	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	DSMZ
	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> DSM 14558	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	DSMZ
	<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i> DSM 17978	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	DSMZ
	<i>Alicyclobacillus pomorum</i> DSM 14995	Typstamm, Fruchtsaft-schädigend	DSMZ
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM 10	Typstamm, Begleitflora Fruchtsäfte	DSMZ
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36	Typstamm, Begleitflora Fruchtsäfte	DSMZ
	<i>Bacillus coagulans</i> DSM 1	Typstamm, Begleitflora Fruchtsäfte	DSMZ
	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	Typstamm, Begleitflora Fruchtsäfte	DSMZ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5alpha	Laborstamm, <i>E. coli</i> K12 Derivat	AG Johanningmeier
	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Laborstamm, <i>E. coli</i> K12 Derivat	AG Johanningmeier
	<i>Escherichia coli</i> TG1	Laborstamm, <i>E. coli</i> K12 Derivat	AG Johanningmeier

3.1.1.1.1. Kultivierung von *C. reinhardtii*

Die Kultivierung von *C. reinhardtii* erfolgte in zwei verschiedenen Kulturmedien. Zum einen wurden die *psbA*-Deletionsmutante (Fud7), sowie die nachweislich homoplasmische Transformante MCS in dem Acetat-haltigen Vollmedium TAP (Gorman *et al.*, 1965) unter heterotrophen Bedingungen kultiviert. Nicht-homoplasmische Transformanten wurden photoautotroph in HS-Medium (Minimalmedium, Sueoka *et al.*, 1960) kultiviert. Diese Kultivierung erfolgte sowohl auf Festmedien, als auch in flüssiger Form. Flüssigkulturen wurden schüttelnd in Erlenmeyerkolben bei 23°C und $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ inkubiert.

3.1.1.1.2. Kultivierung bierschädigender *Lactobacillus* spp. und *Pediococcus* spp.

In der Arbeit genutzte bierschädigende Milchsäurebakterien wurden präferiert in Fertigmedien angereichert (NBB[®]-B und NBB[®]-B-AM, Döhler GmbH). Unter anaeroben Bedingungen wurden die Organismen in 2 bzw. 15 mL Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur inkubiert. Bei sichtbarer Eintrübung bzw. Indikatorumschlag des Mediums wurden die Kulturen für Folgeanalysen weiterverarbeitet. Aus den Anreicherungsmedien wurden zudem durch Zugabe von 2% Agar-Agar (w/v) Festmedien hergestellt. Für die dauerhafte Lagerung wurden Glycerinstocks (analog zur beschriebenen Kryokonservierung für *E. coli*) angefertigt und diese bei -80°C bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

3.1.1.1.3. Kultivierung von *Alicyclobacillus* spp.

Alicyclobacillus spp. sind thermophile, acidophile Endosporenbildner. Die Kultivierung dieser Organismen erfolgte präferiert in den Fertigmedien BAT-B und BAT-Agar (Döhler GmbH). Die Mikroorganismen wurden unter aeroben Anzuchtbedingungen bei 45°C angereichert (Ausnahme: *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* bei 60°C). Flüssiganreicherungen wurden schüttelnd inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung wurden Glycerinstocks (analog zur beschriebenen Kryokonservierung für *E. coli*) angefertigt und diese bei -80°C aufbewahrt. Die selektive Kultivierung gemäß IFU No.12, Identifikationstechniken, sowie enzymatischer Guaiacolnachweis sind im Anhang aufgeführt.

3.1.1.1.4. Identifikation und Bestätigen der Kulturen

Kulturen wurden von Zeit zu Zeit kontrolliert, um Mischungen oder sogar das Arbeiten mit falschen Organismen zu vermeiden. Hierfür wurde je ein Aliquot aus einer Voranreicherung verdünnt und auf einem adäquaten Festmedium ausplattiert. Nach einer Wachstumsphase von 2-7 d wurde eine einzelne Kolonie genutzt, um erneut eine möglichst selektive Flüssigkultur zu beimpfen. Aus dieser Anreicherung wurden dann Folgeanalysen zur Bestätigung der Kultur durchgeführt. Die Homogenität der Kolonie-Morphologie wurde ebenfalls als orientierender Parameter herangezogen.

3.1.1.1.5. Sequenzierung zur Identifikation von Bakterien

Die Sequenzierung war das meist genutzte Mittel zur Kulturbestätigung. Hierfür wurde ein Aliquot bzw. Zellmaterial einer Kolonie genutzt, um via direkt PCR ein Fragment am 16S rRNA-codierenden Gens des zu untersuchenden Bakteriums zu amplifizieren (Primer siehe Tabelle 22.5). Nach Aufreinigung des PCR-Produktes wurde der Sequenzieransatz gemäß Angaben des Sequenzierdienstleisters (Microsynth Seqlab, Göttingen) vorbereitet und versendet. Das Sequenzierergebnis stand i.d.R. am Folgetag als Elektropherogramm zum *Download* bereit. Die Qualität und Genauigkeit der Sequenzierung wurde in Geneious R7 (<https://www.geneious.com>) beurteilt. Die Sequenz wurde dann über den *NCBI nucleotide blast*¹ untersucht. Entsprechend des *blast*-Ergebnisses konnte die Identität des Bakteriums bestimmt werden, sofern das Resultat eindeutig beurteilt werden konnte. Alternativ wurde das 16S-Identifizierungstool der Plattform EZBioCloud (www.ezbiocloud.net, ChunLab, Inc.) für die Sequenzanalyse genutzt.

3.1.1.2. Ermittlung der Zellzahl in einer Kultur

Ein wesentlicher Bestandteil der *template*-Charakterisierung ist die Ermittlung der Zellzahl einer verwendeten Kultur. Hierüber lassen sich Aussagen hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit treffen. Neben dem mikroskopischen Auszählen (Thoma- bzw. Neubauer-Zellkammer) von Zellen, wurde die Zellzahl in einer Zellsuspension durch Verdünnung, Ausplattieren, Bebrüten und Auszählen von Einzelkolonien bestimmt. Dabei wurden präferiert 50 µL Aliquots aus definiert verdünnten Kultur ausplattiert. Nach entsprechender Bebrütung wurden die Agar-Platten mit zählbaren Einzelkolonien ausgezählt. Aus dem genutzten Volumen und dem Verdünnungsfaktor konnte die Zellzahl der Ursprungskultur errechnet werden.

3.1.2. DNA-Extraktionsmethoden

In dieser Arbeit geht es vorrangig um Entwicklungen von einfachen und schnellen DNA-Nachweistechiken. Um die Abarbeitung einer möglichst anwenderfreundlichen Nachweismethode nicht unnötig zu verkomplizieren, spielten neben komplexen Aufarbeitungsmethoden gerade schnelle und möglichst einfache DNA-Extraktionsmethoden eine wichtige Rolle. Die Kompatibilität des Extrakts mit der verwendeten Amplifikationstechnik stand hierbei im Vordergrund. Im Folgenden werden verwendete Extraktionsmethoden zusammenfassend inklusive relevanter Referenzen gelistet.

¹ **NCBI Nucleotide Blast:** Database: rRNA / ITS database – 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria / Archaea); program selection: *blastn* (somewhat similar)

Tabelle 4 - Übersicht der verwendeten DNA-Extraktionsmethoden

Bezeichnung	Probenmaterial	Beschreibung	Referenz
Extraktion von Gesamt-Zell DNA	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	komplexes und aufwändiges DNA-Extraktionsprotokoll (PCI-basierte Extraktionsmethode, Ethanolfällung, Hochsalzfällung) liefert qualitativ hochwertige DNA	Newman <i>et al.</i> , 1990, Kapitel 8.2.7.1
Extraktion genomischer DNA über kommerzielles Kit	Hefen, Bakterien, Blut	Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.), gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zeitaufwändig.	Ahmed <i>et al.</i> , 2018 / Ocenar <i>et al.</i> , 2019
Aufkochen / <i>boiling-method</i>	Bakterien	Einfache " <i>quick & dirty</i> " Methode: Inkubation: 2-10 min bei >90°C; Zentrifugation und Aliquot aus dem Überstand in die Amplifikationsreaktion.	abgewandelt nach Queipo-Ortuño <i>et al.</i> , 2008
ETNA DNA Extraktion	Hefen, Bakterien, <i>C. reinhardtii</i>	schnelle, einfache und preisgünstige Methode um DNA aus Hefen und grampositiven Bakterien zu isolieren. Sie beruht auf einer alkalischen Lyse und schnellen DNA-Fällung.	Vingataramin und Frost (2015)
Chelex-basierte DNA-Extraktion	<i>C. reinhardtii</i> , <i>Alicyclobacillus</i> in Fruchtsaftkonzentraten	Einfache " <i>quick & dirty</i> " Methode: Durch Nutzung des Resins Chelex-100 werden PCR-Inhibitoren zurückgehalten.	Cao <i>et al.</i> , 2009
EDTA-basierte DNA-Extraktion	<i>C. reinhardtii</i>	Einfache " <i>quick & dirty</i> " Methode: Durch Nutzung eines EDTA-haltigen Extraktionspuffer kann schnell PCR-kompatibel	Wan <i>et al.</i> , 2011

3.1.3. Künstliche *templates*: PCR, Klonierung und Transformation

Für die Entwicklung von DNA-basierten Nachweisen kann die Arbeit mit nicht-natürlichem Ausgangsmaterial aus verschiedenen Gründen sinnvoll sein. In einigen Fällen ist die Arbeit mit natürlichem Material umständlich oder schlicht nicht möglich. Ein Beispiel hierfür ist der Nachweis des Carp Edema Virus (CEV). Dieses DNA-Virus ist ein Karpfenpathogen, das nicht in Zellkultur vermehrbar ist, sodass natürliches Virusmaterial nur aus infizierten Tieren kommen kann. Darüber hinaus stellt dieses Virus eine reale Gefahr für die Umwelt dar, sodass in den genutzten S1-Laboratorien der Umgang mit natürlichem Virusmaterial nicht erlaubt wäre. Aus diesem Grund wurden für die Testetablierung des CEV- und auch des KHV-Nachweises Plasmide mit viralen Zielsequenzen erstellt und genutzt. Diese stellen keine Gefahr für die Umwelt dar, sind einfach vermehrbar und entsprechend unbedenklich im Umgang.

3.1.3.1. pGEM®-T Klonierung, Transformation und Plasmid-Isolation

Die pGEM®-T Klonierung, eine Form des TA-Clonings, ist ein verhältnismäßig einfaches Werkzeug zur schnellen Erstellung von Plasmiden, die definierte Zielsequenzen enthalten. Dabei muss keine Rücksicht auf die etwaige Schnittstellen, Restriktionsenzyme oder Überhänge genommen werden. Die meisten Taq DNA-Polymerasen erzeugen während der Amplifikation einen *template*-unabhängigen A-Überhang am 3' Ende des amplifizierten Stranges. Im Zuge der Arbeit wurden zu klonierende

Inserts via Standard-PCR und OE-PCR² amplifiziert, gereinigt und für die Klonierung verwendet. Der pGEM[®]-T Empfängervektor ist ein linearisiertes Plasmid, welches über an den 5' Enden des Doppelstranges über einen T-Überhang verfügt. Aufgrund der Komplementarität der Überhänge des linearisierten pGEM[®]-T und des PCR-Produktes kommt es zur Hybridisierung und Ligation durch die T4-DNA-Ligase. Zu beachten ist lediglich, gereinigte PCR-Produkte einzusetzen, die via AGE überprüft wurden und mit einer Taq DNA-Polymerase amplifiziert wurden. *Proofreading*-Polymerasen wie bspw. die Phusion[™] HotStart II High-Fidelity DNA-Polymerase, erzeugen keine A-Überhänge. Deshalb wird das PCR-Produkt unter Zugabe von dATPs und einer Taq DNA-Polymerase in einem Zyklus mit A-Überhängen versehen (Abarbeitung gemäß Herstellerangaben: pGEM[®]-T Vector Systems, Promega Corp.). Die Ligationsreaktion wurde präferiert bei 4°C über Nacht durchgeführt, alternativ wurde bei 16°C für mindestens 3 Stunden ligiert.

Tabelle 5 - Zusammensetzung der T/A-Klonierungsreaktion

Komponente	V je Reaktion	Konzentration Arbeitslösung	Endkonzentration
Rapid Ligation Buffer	2,5 µL	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
pGEM [®] -T vector	0,5 µL	50 ng / µL	7,7*10 ⁹ Kopien / Reaktion
PCR-Fragment	0,5 µL	X ng / µL	ca. 2,5*10 ¹⁰ Kopien / Reaktion
H ₂ O	1,0 µL	-	-
T4-DNA-Ligase	0,5 µL	3 U / µL	1,5 U / Reaktion

Das Klonierungsprodukt wurde anschließend über die Hitzeschock-Methode in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf Ampicillin-haltigem LB-Agar³ über Nacht. Kolonien wurden via Kolonie-PCR überprüft. PCR-positive Klone wurden in einer Übernachtskultur angereichert. Das Zellmaterial wurde für die Kryokonservierung genutzt, Plasmide isoliert und anschließend sequenziert. Die detaillierte Beschreibung der hier genannten Einzelschritte ist bei Bedarf dem Anhang zu entnehmen (Anhang, Abschnitt 9.1.4).

3.1.3.2. Übersicht relevanter Plasmide

Im Rahmen der Arbeit wurden zahlreiche Plasmide erzeugt. Die Tabelle 6 benennt und beschreibt die wichtigsten genutzten Vektoren für die Entwicklung und Testung von NALFIAs, die im Kontext der hier präsentierten Ergebnisse genutzt wurden. Alle Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft. Entsprechende *Alignments* sind im Anhang aufgeführt.

² PCR für pGEM[®]-T Klonierung: Genauere Informationen im Anhang

³ LB_{Amp}: Ampicillin haltiges LB-Medium mit einer Endkonzentration von 100 µg /mL

Tabelle 6 - Übersicht relevanter Plasmide für die NALFIA Entwicklung

Name Plasmid	Empfänger-plasmid	Beschreibung des Inserts				
		PCR-Methode	template (Quelle)	Zielsequenz	verwendete Primer	Insert-größe
pKHV	pGEM®-T	Standard PCR	DNA, KHV Isolat „Israel“ (HP 951)	genomisches Fragment (Teil ORF89, und ORF90)	KHV-AB-for 1 KHV-AB-rev 1	807 bp
pCEV	pGEM®-T	Standard PCR	isolierte Virus-DNA, Karpfen - Kieme (FLI)	Fragment des <i>Protein 4a - Gens</i>	CEFAS-CEV-for 1 CEFAS-CEV-rev 1	530 bp
pFVL _{WT}	pGEM®-T	Standard PCR	weibliche humane gDNA (Promega Corp.)	Teil des <i>Faktor V Gens</i>	FVL-Seq-for 2 FVL-rev 5	603 bp
pFVL _{Mut}	pGEM®-T	OE-PCR	pFVL _{WT}	Teil des <i>Faktor V Gens</i>	FVL-Seq-for 2 FVL-OE-for 1 FVL-OE-rev 1 FVL-rev 5	603 bp

3.1.3.3. templates für die Interne Amplifikationskontrolle

Im Rahmen dieser Arbeit wird häufig die Nutzung einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) beschrieben. Dieses Werkzeug erlaubt die Beurteilung der Funktionalität der Amplifikationsreaktion im Kontext eines NALFIAs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene IACs genutzt. Das wichtigste IAC-System beruht auf der Verwendung des pMM2, einem Plasmid, das ursprünglich für die Transformation des Chloroplastengenoms von *C. reinhardtii* erstellt wurde (Bertalan *et al.*, 2015). Ein großer Vorteil dieses Systems ist, dass die Amplifikationsreaktionen am pMM2 auf den Bereich des intronlosen *psbA*-Gens zielen, eine Sequenz, die in der Natur nicht vorkommt. In den entwickelten NALFIAs wurde entweder direkt der pMM2 als *template* genutzt, oder ein gereinigtes pMM2-abhängiges Amplifikat (*psbA* -133 for, *psbA* +570 rev) verwendet. Die Abbildung 11 zeigt die Nutzung des hier etablierten IAC-Systems. Die Digoxigenin-/ bzw. FITC-markierten Primer *psbA* +86 for FITC, *psbA* +147 for FITC, IL rev DIG und *psbA* 412 rev DIG standen dabei als IAC-Primer zu Auswahl.

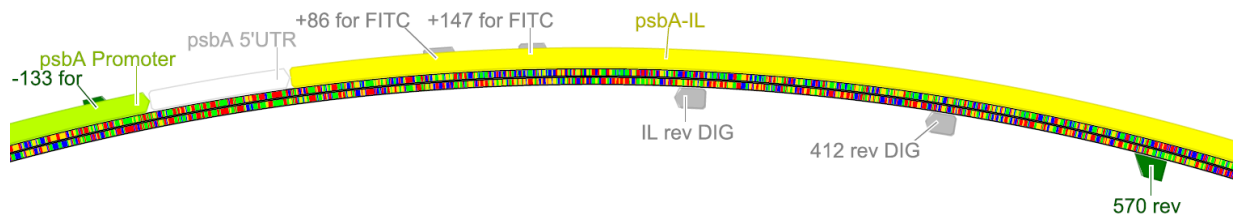


Abbildung 11 - Ausschnitt des pMM2 mit relevanten Annotierungen. Das intronlose *psbA*-Gen (gelb – codierender Bereich, weiß – codierender Bereich für die 5'UTR, hellgrün – Bereich des *psbA*-Promotors) wird dabei als *template* für die IAC genutzt. Markierte IAC-Primer (grau) amplifizieren das auf dem LFD nachweisbare IAC-Fragment. Die Primer *psbA* -133 for und +570 rev dienten zur Herstellung eines Fragmentes als IAC-*template*.

3.2. Amplifikation von Nukleinsäuren

Im Zuge der angefertigten Arbeit wurden vielfältige Abwandlungen von Amplifikationstechniken, wie der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) oder isothermaler Amplifikationstechniken, wie der LAMP genutzt. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über die hier verwendeten Techniken und Terminologien.

Tabelle 7 - Übersicht der in Kombination mit Lateral Flow Analysen genutzten Amplifikationstechniken und -Varianten

Bezeichnung der Amplifikations-technik	Definition / Beschreibung	Repräsentative Referenzen
Kolonie-PCR / direct PCR	Der Name Kolonie- oder direct PCR bezieht auf den Probeneinsatz in der Amplifikationsreaktion. Ohne DNA-Extraktion o.Ä. wird Zellmaterial direkt in die Reaktion gegeben.	Mens <i>et al.</i> , 2012 / Janz <i>et al.</i> , 2018
Touchdown PCR	Der Name Touchdown PCR beschreibt die sukzessive Verringerung der Annealing-Temperatur bei zunehmender Zyklenzahl. Diese Maßnahme kann maßgeblich zur Spezifitätssteigerung einer Nachweisreaktion beitragen.	Moezi <i>et al.</i> 2019 / diese Arbeit
singleplex PCR / Standard-PCR	Eine PCR, in der ausschließlich ein Fragment amplifiziert werden soll. Trotz dessen nur ein Fragment amplifiziert wird, können mehr als 2 Primer in dieses Nachweissystem integriert sein.	Janz <i>et al.</i> , 2018 / Pecchia <i>et al.</i> , 2018
duplex-PCR	Eine PCR, in der zwei Produkte parallel synthetisiert werden können.	Mens <i>et al.</i> , 2012 / Loose und Breitbach <i>et al.</i> , 2020
multiplex-PCR	Eine PCR, in der mehr als ein Fragment je Reaktion amplifiziert werden soll. Diese Definition schließt die <i>duplex</i> -PCR mit ein.	Tian <i>et al.</i> , 2014
Nested PCR	Die nested PCR beschreibt eine Nachweisteknik, bei der zwei PCRs nacheinander durchgeführt werden, um sehr sensitiv ein Fragment zu amplifizieren. In der zweiten PCR werden Primer verwendet, die innerhalb des PCR-Produkts aus Reaktion 1 binden. Somit fungiert das Amplifikat der ersten Reaktion als template für Reaktion 2.	diese Arbeit (CEV)
One pot nested PCR	Diese Amplifikationstechnik funktioniert analog zur nested PCR, mit dem Unterschied, dass die nacheinander geschalteten Amplifikationsreaktionen in einem Reaktionsgefäß ablaufen. Dabei definieren Primerdesign und Temperaturprotokoll die 2-stufige Amplifikationsreaktion.	Sun <i>et al.</i> , 2017 / Wei <i>et al.</i> , 2018
ARMS-PCR	Amplification refractory mutation system-PCR ist eine spezielle Nachweismethode, die sich für die Erkennung und Diskriminierung von SNPs eignet. Charakteristisch sind die speziellen ARMS-Primer, die i.d.R. eine zusätzliche Fehlpaarung zur eigentlichen Zielsequenz aufweisen.	Zhang <i>et al.</i> , 2020
rhPCR	RNase H2-abhängige PCR ist eine Amplifikationsmethode bei der spezielle Elongations-blockierte Primer mit einer zusätzlichen RNA-Base genutzt werden, die durch die thermostabile RNase H2 während der PCR "aktiviert" werden, wodurch die Elongation ermöglicht wird.	diese Arbeit
Reprh-PCR	Im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Amplifikationstechnik, bei der eine speziell gestaltete Sonde (Reporter) zum Einsatz kommt. Während der exponentiellen Amplifikation wird der Reporter bei korrekter Bindung an das Amplifikat durch die RNase H2 analog zur rhPCR geschnitten. Der Reporter-Status kann dann via LFA interpretiert werden. Daraus ergibt sich der Name: Reporter-basierte, RNase H2-abhängige PCR	diese Arbeit
Standard-LAMP	Die Loop mediated isothermal Amplification ist eine isothermale Amplifikationstechnik, bei der 4-6 Primer erforderlich sind. Entscheidend für die Funktionalität der Amplifikationstechnik ist das Primerdesign und die verwendete DNA-Polymerase mit fehlender Exonuklease-Aktivität und starker Strand-Verdrängungsaktivität.	Li <i>et al.</i> , 2019
Colorimetrische LAMP	Der Name Colorimetrische LAMP bezieht auf das Prinzip der Auswertung der Amplifikats. Eine erfolgreiche Amplifikation lässt sich durch einen spezifischen Farbumschlag im Reaktionsgefäß erkennen.	Tanner <i>et al.</i> , 2015 / diese Arbeit
Reprh-LAMP	Eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachweismethode, bei analog zur Reprh-PCR während der Amplifikation eine Reportersonde durch die RNase H2 geschnitten wird. Die Reaktion ist via LFA auswertbar.	diese Arbeit

3.2.1. DNA-Polymerasen und Nachweis-relevante Enzyme

Für die DNA-Amplifikation wurden im Rahmen der angefertigten Arbeit verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Darunter befinden sich z.T. sogenannte *Hot Start* Polymerasen, die durch Aptamere oder Antikörper blockiert sind und somit ohne Initialdenaturierung nicht in der Lage sind DNA zu synthetisieren. Auch Fertigmixe erwiesen sich als überaus praktisch. Diese enthalten bereits den erforderlichen PCR-Puffer, dNTPs, sowie die dazugehörige Polymerase, sodass lediglich Primer und *template* zugegeben werden müssen. Zusätzliche Enzyme bei denen es nicht um DNA-Polymerase handelt, die in der Amplifikationsreaktion zum Einsatz kamen, waren die Uracil-DNA Glycosylase und RNase H2. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzyme.

Tabelle 8 - Enzyme in den Amplifikationsreaktionen.

Methode	Enzym (-Mix)	Zulieferer / Hersteller
PCR	Maxima HotStart Taq DNA-polymerase	Thermo Fisher Scientific
	goTaq® DNA-Polymerase	Promega
	Phusion™ HotStart II High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
	rhAMP® Genotyping Master Mix	Integrated DNA Technologies
	HotStart Taq DNA-Polymerase Master Mix	Milenia Biotec GmbH
	Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
LAMP	Bst 2.O DNA Polymerase	New England Biolabs
	Bst 3.O DNA Polymerase	New England Biolabs
Zusatz	UDG-Mix	Milenia Biotec GmbH
	Uracil-DNA Glycosylase (UDG)	New England Biolabs
	RNase H2 Enzyme	Integrated DNA Technologies

3.2.2. Primer, Sonden, Helfer: Der Umgang mit Oligonukleotiden

Einer der Schlüsselfaktoren für eine spezifische, sensitive und effiziente Amplifikation sind die im Nachweis enthaltenen Oligonukleotide. Die Bezeichnung Oligonukleotid schließt Primer, Sonden und *Antisense*-Primer, Faltungshelfer und Spezifitätshelfer ein. Die konkrete Bedeutung dieser Bezeichnungen wird in den fortschreitenden Ergebnissen erklärt.

3.2.2.1. Oligonukleotid-Design

Die Ableitung von Oligonukleotiden ist ein essentieller Schritt bei der Entwicklung von Nachweissystemen, die auf einer DNA-Amplifikationsreaktion beruhen. Für PCR-/ RPA-basierte Nachweise wurden Primer, Sonden und Helfer grundsätzlich eigens abgeleitet unter Zuhilfenahme einiger freizugänglicher Online-Ressourcen, sowie dem Programm Geneious (<https://www.geneious.com>). LAMP-Primer wurden ausschließlich *in silico* abgeleitet und anschließend manuell nachbearbeitet.

3.2.2.1.1. *Design* von PCR-Primern und Sonden

Richtlinien zum *Design* Nachweis-spezifischer PCR-Primer wurden anhand von Erfahrungswerten definiert. Allgemeingültige und grundlegende Primerdesign-Vorschriften (GC-Gehalt: 40-60%, Länge: 18-25 b, 3'-Ende: 3 von 5 Basen G/C, Vermeidung repetitiver Elemente: bspw. ATATATAT, Vermeidung von sich wiederholenden Basen: bspw. GGGGG) wurden versucht so gut es geht zu beachten. Gerade hinsichtlich einer Nachweisentwicklung von NALFIAs spielt die *in silico* cross Primer Dimer Analyse eine sehr wichtige Rolle.

3.2.2.1.2. *Design* von Primern für isothermale Amplifikation (LAMP / RPA)

LAMP-Primer wurde im Kontext dieser Arbeit *in silico* abgeleitet und anschließend manuell überprüft und nachbearbeitet. Dabei wurden die *online-tools* PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd.) und NEB® LAMP Primer Design Tool (New England Biolabs) verwendet. Manuell wurden ggf. *wobble*-Positionen eingefügt oder Primersequenzen leicht verschoben, eingekürzt oder verlängert. LAMP-Sonden wurden manuell abgeleitet (siehe 3.2.2.1.1.). RPA-Primer wurden entsprechend der Richtlinien der Firma TwistDx abgeleitet (<https://www.twistdx.co.uk/>; TwistAmp® Assay Design Manual).

3.2.2.1.3. *In silico* Cross Primer Dimer Analyse

Die Cross Primer Dimer Analyse ist gerade im NALFIA-assoziierten Kontext ein sehr wichtiges Kontrollkriterium für das *Design* von Primern und Sonden. Gerade bei niederen Temperaturen (RT) können Oligonukleotide zur Bildung von Sekundärstrukturen und zu unerwünschten Interaktionen tendieren. Daraus können falsch positive Resultate und nicht-interpretierbare Tests (LFA) resultieren. Für diese Analyse wurden zwei frei nutzbare *online-tools* verwendet. Zum einen wurde der *Multiple Primer Analyzer* (<https://www.thermofisher.com>) genutzt. Der Sensitivitätswert für die Erkennung von Primer Dimeren wurde auf „1“ gestellt. Darüber hinaus wurde zusätzlich die *Hetero-Dimer Analysis* Funktion im *OligoAnalyzer tool* der Firma Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com>) verwendet.

3.2.2.1.4. *In silico* T_m Kalkulation

Die Errechnung der Schmelztemperatur T_m von Oligonukleotiden erfolgte unter Zuhilfenahme verschiedener T_m-Kalkulatoren. Erfahrungsgemäß ist die verwendete Polymerase ein sehr wichtiges Kriterium für eine möglichst exakte T_m Prognose. Aus diesem Grund erfolgte die Berechnung der Schmelztemperatur, sofern vorhanden, strikt nach Herstellerangaben. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Programme und *web-tools* für das etablierte Primer- und Sondendesign.

Tabelle 9 - Übersicht verwendeter *in silico* Primer-Analyse tools

Verwendung	Primer-Analyse tools	Anbieter
Multiple Sequenz Alignments	Geneious	Biomatters, Ltd.
Map to Reference Sequence	Geneious	Biomatters, Ltd.
Primer, -Sonden Design für PCR und RPA	manuell, Geneious	Biomatters, Ltd.
LAMP-Primer Design	<i>PrimerExplorer V5</i>	Eiken Chemicals Co., Ltd.
LAMP-Primer Design	<i>NEB® LAMP Primer Design Tool</i>	New England Biolabs Inc.
Cross Primer Dimer Analyse	<i>Multiple Primer Analyzer</i>	Thermo Fisher Scientific
Cross Primer Dimer Analyse	<i>OligoAnalyzer, Hetero-Dimer Analysis</i>	Integrated DNA Technologies, Inc.
T _m Kalkulation	<i>T_m Calculator</i>	Thermo Fisher Scientific
T _m Kalkulation	<i>Multiple Primer Analyzer</i>	Thermo Fisher Scientific
T _m Kalkulation	<i>T_m Calculator</i>	New England Biolabs Inc.
T _m Kalkulation	<i>OligoAnalyzer</i>	Integrated DNA Technologies, Inc.
T _m Kalkulation	<i>T_m for Oligos Calculator</i>	Promega Corp.

3.2.2.1.5. *In silico* Analyse zur Prognose von Sekundärstrukturen von ssDNA und RNA

Um Sekundärstrukturen von einzelsträngiger DNA oder RNA zu untersuchen wurde zum einen die Software Geneious R7 genutzt und zum anderen der RNAfold *web server* der Universität Wien. Für die Analyse von ssDNA wurde das Modell nach Matthews *et al.*, 2004 genutzt und für die Analyse von RNA wurde das Modell nach Andronescu (2007) verwendet. Als Faltungsalgorithmus wurde *minimum free energy and partition function* (Zuker und Stiegler, 1981 / McCaskill, 1990) gewählt.

3.2.2.2. Praktischer Umgang mit Oligonukleotiden

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Entwicklung, Optimierung und Adaptierung von Nukleinsäure-basierten Amplifikationsmethoden liegt, wurden zahlreiche Oligonukleotide genutzt. Alle Oligonukleotide wurden ausnahmslos bei der biomers.net GmbH bestellt und synthetisiert. Entsprechend der Oligonukleotid-Datenblätter wurden i.d.R. 100 pmol/μL Stammlösungen mit sterilem ddH₂O oder 1xTE-Puffer hergestellt. Diese Konzentration wurde für Stammlösungen nie unterschritten. Diese Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C und im Dunkeln gelagert. Sofern Arbeitslösungen (25 oder 10 pmol/μL) benötigt wurden, wurden die Aliquots entsprechend mit ddH₂O bzw. 1xTE-Puffer vor Nutzung verdünnt. Lange Lagerungszeiten, sowie häufiges Einfrieren/ Auftauen der Arbeitslösungen wurden nach Möglichkeit vermieden und die Herstellung einer neuen Arbeitslösung aus der Stammlösung präferiert. Die Reinigung der markierten und nicht-markierten Oligonukleotide erfolgte gemäß den Empfehlungen der biomers.net GmbH. Alle relevanten Oligonukleotidsequenzen lassen sich dem Anhang entnehmen (Tabelle 22.1 bis 22.5).

3.2.2.2.1. Nutzung konzentrierter Primermixe

Sofern funktionierende Primer-Kombinationen und -Konzentrationen für Amplifikationsreaktionen gefunden wurden, wurde die Arbeit mit konzentrierten Primermischungen präferiert. Hierfür wurde ein Mix hergestellt, in dem die Primer 2- bis 10-fach konzentriert vorliegen. Die Verdünnung der

Oligonukleotide erfolgte bis auf Ausnahmen in 1 x TE-Puffer für eine verbesserte Lagerungsstabilität. Gerade bei der Bearbeitung von *multiplex*-PCRs oder LAMP-Reaktionen lässt sich über diese Vorgehensweise viel Zeit und Material sparen. Die Erfahrungen zeigten, dass diese konzentrierten Primermischungen zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der Amplifikationsreaktion beitragen können und darüber hinaus durchaus stabil sind (Monate bis >2 Jahre).

3.2.3. Weitere relevante Komponenten einer Amplifikationsreaktion

Neben Primern und DNA-Polymerase gibt es weitere Komponenten, die für eine erfolgreiche Amplifikationsreaktion erforderlich sind. Hierzu zählen: dNTPs inkl. dUTPs, die als Set oder im Mix genutzt wurden (10mM bzw. 25mM je dNTP Arbeitslösung, Thermo Fisher Scientific oder New England Biolabs), Amplifikations-Additive (Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, BSA, Betaine, DMSO, PVP-40, Trehalose, Goldnanopartikel), Farbstoffe (Berberinchlorid, Phenolrot, Xylen Cyanol) und Wasser bzw. TE-Puffer (Millipore-ddH₂O, autoklaviert, z.T. UV-behandelt).

3.2.4. Entwicklung NALFIA - Temperaturprotokoll

Die Erarbeitung eines geeigneten Temperaturprotokolls für die schnelle, sensitive und spezifische Amplifikation von DNA ist ein essentieller Teil der NALFIA-Entwicklung. Die folgende Übersicht beschreibt die verschiedenen Schritte, die bei der Entwicklung eines PCR-spezifischen Temperaturprotokolls bearbeitet wurden. Einige Nachweischarakteristika (DNA-Polymerase, Ionenstärke, Primerkonzentrationen, etc.) definieren bereits relevante Parameter eines Temperaturprotokolls. Im Falle isothermaler Amplifikationsmethoden fällt die Optimierung in dem hier beschriebenen Umfang weg. LAMP-Protokolle laufen i.d.R. zwischen 60-70°C ab und RPA-Protokolle bei 37-42°C. Die LAMP ist zudem kompatibel mit einem UDG-/ UNG-Verdau vor Amplifikation (Kellner *et al.*, 2020). In der Arbeit wurden verschiedene Nachweise entwickelt, optimiert oder als *proof-of-concept* System genutzt. Die exakte Zusammensetzung, sowie die dazugehörigen Temperaturprotokolle sind im Kontext dieser Arbeit nicht nur als Methode, sondern vielmehr als Ergebnis zu verstehen. Aufgrund dieses Umstands und auch des Umfangs sind Zusammensetzung und Temperaturprotokoll der jeweiligen Nachweise dem Anhang zu entnehmen.

3.2.4.1. Bedeutung der einzelnen Schritte innerhalb des Nachweisprotokolls

3.2.4.1.1. UNG/ UGD-Verdau

Durch die Uracil-DNA-Glycosylase werden N-glycosidische Bindungen zwischen Uracilbase und Zuckerphosphatrückgrat hydrolysiert (Longo *et al.*, 1990). Sofern dUTP's in vorherigen Amplifikationen genutzt wurden, ist der UDG-Verdau vor einer PCR oder einer LAMP ein effizientes Werkzeug zur Vermeidung von *carryover* Kontaminationen (Longo *et al.*, 1990 / Xuhong *et al.*, 2019).

3.2.4.1.2. Initialdenaturierung und zyklische Denaturierung

Dieser Schritt ist vor allem bei Aptamer- oder Antikörper-blockierten *Hot Start*-Enzymen essentiell und darüber hinaus ein adäquates Mittel, um Zellen vor Beginn der Amplifikationsreaktion aufzuschließen (Woodman, 2008). Die Dauer (und Temperatur) der zyklischen Denaturierung kann u.U. reduziert werden, ohne die Amplifikation negativ zu beeinflussen. Dadurch kann ein Amplifikationsreaktion beschleunigt werden.

3.2.4.1.3. Annealing

Das Annealing ist zumeist der spezifitätsgenerierende Schritt einer PCR. Das Einfügen eines Temperaturdekrementes ($-\Delta T$) erlaubt das Starten der Amplifikation bei vergleichsweise hoher Annealingtemperatur und deren schrittweise Senkung von Zyklus zu Zyklus. Diese Einstellung kann dazu beitragen, zu Beginn der Amplifikation sehr spezifisch Amplifikationsprodukte anzureichern, bevor in Folgezyklen die Spezifität zugunsten der Amplifikationseffizienz durch sinkende Annealingtemperatur abnimmt (Korbie *et al.*, 2008). Ein PCR-LFA mit endständig markierten Primern kann durch diese Form der *Touchdown*-PCR profitieren.

3.2.4.1.4. Elongation

Der Elongationsschritt kann u.U. bei sehr kurzen Amplifikaten (ca. < 150 bp) ausgespart werden (2-step PCR). Das kommt einer schnellen Nachweisführung entgegen. Dem Aktivitätsverlust einer DNA-Polymerase während der Amplifikation (z.B. viele Zyklen, lange Elongationszeiten) kann durch das Einfügen eines Zeitinkrements ($+\Delta t$) im Elongationsschritt entgegengewirkt werden.

3.2.4.1.5. Zyklenzahl

Die Zyklenzahl ist gerade für NALFIAs ein sehr wichtiger Parameter. Unter bestimmten Bedingungen können zu viele Zyklen zu falsch-positiven Resultaten führen. Zu wenige Zyklen können wiederum zur Insensitivität eines Nachweises beitragen. Folglich ist die Zyklenzahl unter bestimmten Bedingungen ein wichtiger Parameter zur Steuerung der Nachweisempfindlichkeit.

3.2.4.1.6. Hybridisierung (nach Amplifikationsreaktion)

Die Hybridisierung einer Sonde an das Amplifikat nach Vervielfältigung wird hier als post-Amplifikations-Hybridisierung verstanden. Bei „Einbau“ dieser nachgeschalteten Hybridisierung können sehr viele Zyklen zu einer sensitiven und trotzdem spezifischen Nachweisführung beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit spielte die post PCR-Hybridisierung eine wichtige Rolle.

3.2.4.1.7. Lateral Flow Analyse (bei höheren Temperaturen)

Die abschließende Lateral Flow Analyse stellte sich als recht flexibel dar, sodass bei RT, aber auch bei Temperaturen $>50^{\circ}\text{C}$ der Schnellnachweis der Amplifikate stattfand. Die Temperatur der LFA kann

zur Eliminierung von Heterodimeren oder zur Steigerung der Spezifität Sonden-basierter Nachweistechiken beitragen.

Tabelle 10 - Zusammensetzung eines PCR-LFA Temperaturprotokolls – wichtige Schritte, Parameter und Variationen

	Bezeichnung Schritt	Funktion	T in °C	t in sek	Ablauf
pre Amplifikation	UDG / UNG - Verdau	Vermeidung carryover Kontamination	37	60 - 600	
	Initiale Denaturierung	Aktivierung HotStart DNA-Polymerase / Zelllyse (directPCR)	≥ 95	60 - 300	
DNA-Amplifikation	Denaturierung (zyklisch)	Aufschmelzen des dsDNA in Einzelstränge	≥ 95	5 - 60	
	Annealing (zyklisch)	(spezifische) Bindung von Primern / Sonden an ssDNA (ΔT : -0,1 bis -0,5)	50 - 70	15 - 60	
	Elongation (zyklisch)	Elongation der gebundener Primer durch die DNA-Polymerase	68 / 72	1 - 180 (Δt : -0,1 bis -0,5)	
post Amplifikation	finale Elongation	"Vervollständigung" der Vollängenamplifikate	68 / 72	10 - 600	
	Pause	Beendigung des Protokolls, Zwischenlagerung des Amplifikats	8	Pause	
	Denaturierung	Aufschmelzen des dsDNA (Amplifikat) in Einzelstränge,	95	10 - 60	
	Hybridisierung	Bindung der markierte(n) Sonde(n) an das einzelsträngige Amplifikat	50 - 65	50 - 300	
	Lateral Flow Analyse	Auswertung der Amplifikate, inklusive Interpretation / Dokumentation	20 - 65	120 - 600	

3.2.5. Genutzte Thermocycler

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Thermocycler verwendet. Der am häufigsten genutzte Cycler ist der Labcycler 48s mit Silberblock (Sensoquest GmbH). Auf Basis dieses kompakten und sehr schnellen Thermocyclers wurden alle Assays etabliert. Für Gradienten-PCRs, Standard-PCRs, isothermale Amplifikationen und quantitative PCR und LAMP kamen weitere Geräte zum Einsatz (Biometra TProfessional Standard, Biometra TProfessional Trio, Biometra T-3000 (Biometra GmbH, Analytik Jena), Bio-Rad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories), Eppendorf™ Mastercycler Pro (Eppendorf AG)).

3.2.6. Genereller *workflow* zur Vermeidung von *carryover* Kontaminationen

Das Vorbereiten einer Amplifikationsreaktion ist von der Vermeidung etwaiger *carryover* Kontaminationen geprägt. Das heißt der gesamte Prozess unterliegt einer strikten räumlichen Trennung relevanter Arbeitsschritte. Die Mastermix-Herstellung erfolgt unter Nutzung einer Sicherheitswerkbank zum Schutz relevanter PCR-Komponenten. Die Probenvorbereitung (Anreicherungen, DNA-Extraktion, etc.) und Probenzugabe erfolgt dann in einem separaten Raum mit einem separaten Pipettenset. Verwendet wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Aerosolfilter. Die Auswertung der Amplifikate via AGE oder LFA erfolgte wieder in einem separaten Raum. Nach Möglichkeit wurden mehrere Durchläufe dieser “Einbahnstraße” an einem Tag vermieden, um *carryover* Kontaminationen bestmöglich zu unterbinden.

3.2.7. Reinigung und Dekontamination

Ein wichtiger Aspekt guter Laborpraxis ist die regelmäßige Reinigung und Dekontamination der Arbeitsplätze und Geräte. Laminar Flow Boxen wurden regelmäßig mit 70% Ethanol gereinigt und durch die UV-Bestrahlung dekontaminiert. Manuelle Pipetten wurden darüber hinaus, sofern möglich, regelmäßig autoklaviert und zusätzlich mit DNA-Exitus Plus™ (AppliChem) dekontaminiert. Auch andere Werkbänke wurden regelmäßig gereinigt und von Zeit zu Zeit mit DNA-Exitus Plus™ dekontaminiert.

3.3. Auswertung von Amplifikaten

Produkte aus Amplifikationsreaktionen wurden mit verschiedenen Methoden beurteilt. Zum einen kam die Agarosegelelektrophorese (AGE) zum Einsatz und zum anderen steht die Auswertung via Lateral Flow Analyse im besonderen Fokus dieser Arbeit.

3.3.1. Lateral Flow Analyse (LFA)

Für die Analyse von Amplifikaten bzw. Hybridisierungsprodukten via Lateral Flow wurde die universelle Nachweisplattform HybriDetect (Milenia Biotec GmbH, Gießen) genutzt. Diese umfasst zwei unterschiedliche Teststreifen. Der HybriDetect (MGHD) beinhaltet 1 Testlinie und eine Kontrolllinie, wohingegen der HybriDetect 2T (MGHD2 / MGHD2) zwei Testlinien und 1 Kontrolllinie beinhaltet. Hinzu kommt die Verwendung eines mitgelieferten universellen Laufpuffers (MGCB), der zusätzlich zur eigentlichen Probe den Lauf der LFA initiiert.

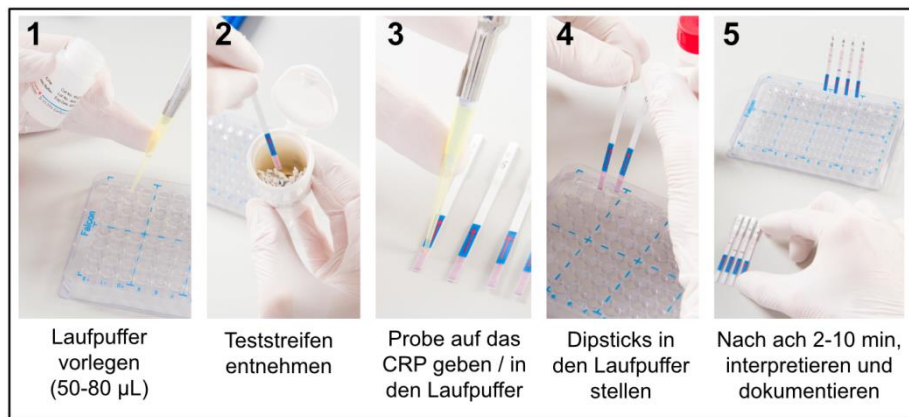


Abbildung 12 - Grundlegende Abarbeitung des Lateral Flow Immunoassays (MGH2T) in fünf Schritten

3.3.1.1. Standard-LFA

Standardmäßig wurden Amplifikationsreaktionen wie folgt ausgewertet. Nach Vorlegen von 50-80 µL Laufpuffer (i.d.R. MGCB) wurde 2 µL des Reaktionsproduktes direkt auf das CRP des jeweiligen Teststreifens pipettiert. Anschließend wurden die Teststreifen senkrecht im Laufpuffer positioniert. Nach 5 Minuten Lateral Flow wurden die Teststreifen dem Laufpuffer entnommen, interpretiert und fotodokumentiert. Hierfür wurden im Zuge der Arbeit verschiedene *Smartphone*-Modelle verwendet (iPhone 5s, iPhone 7 und iPhone 11).

3.3.1.2. LFA von Reporter-basierten Nachweisen

Im Kontext Reporter-basierter Amplifikationstechniken (Rep-rhAMP) erfolgte die Lateral Flow Analyse in abgeänderter Form. Verwendet wurden ausschließlich HybriDetect-Teststreifen, die vorher auf Papier (*12-strip-dip-template*, <https://www.milenia-biotec.com>) mit doppelseitigem Klebestreifen fixiert wurden. Das Reaktionsprodukt wurde wieder direkt auf das CRP gegeben (0,5 - 5 pmol Reporter in einem Volumen von 2-10 µL je LFA). Das Streifenset wurde dann in je 50 - 100 µL MGCB Laufpuffer gestellt. In einigen Fällen wurde mit modifiziertem Laufpuffer gearbeitet, der zu einer besseren Interpretierbarkeit der Resultate beitrug. Nach 2-5 Minuten wurden die Streifen interpretiert bzw. fotografiert.

3.3.1.3. Auswertung einer post PCR-Hybridisierungsreaktion via LFA

Im Anschluss an die PCR erfolgte in einigen Fällen die Hybridisierung einer spezifischen Sonde an das Amplifikat. Hierfür wurde stets ein spezieller Hybridisierungscocktail genutzt. 50 µL der Mischung aus Hybridisierungscocktail und PCR-Produkt wurden für wenige Sekunden denaturiert und dann für 1-5 Minuten zwischen 50°C und 65°C hybridisiert. Der Teststreifen (MGHD oder MGHD2) wurde direkt im Hybridisierungsmix positioniert, wobei die Hybridisierungstemperatur gehalten wurde. Nach 5-10 Minuten erfolgten die Interpretation der Ergebnisse und die Fotodokumentation via *Smartphone*.

3.3.1.4. Quantifizierung von Signalintensitäten auf dem LFD

Die Quantifizierung von Signalintensitäten auf LFDs wird standardmäßig mit der *ImageJ* Software vorgenommen (Ruppert *et al.*, 2019 / Toubanaki *et al.*, 2020 / Kim *et al.*, 2019). Die Quantifizierung erfolgte über die Bestimmung der *Pixel Density Ratios* (PDRs) gemäß Cadle und Kollegen (2010). Sofern notwendig wurde die Lateral Flow Analyse und darauffolgende Dokumentation streng standardisiert, um vergleichbare Daten zu generieren.

3.3.2. Agarosegelelektrophorese zur Beurteilung von Amplifikaten

Es wurde mit verschiedenen Gel- bzw. Puffersystemen gearbeitet. Zum einen wurde TBE-Puffer zur Herstellung der Agarosegele und als Puffer für die Übersichtung des Gels verwendet. Des Weiteren wurde TAE-Puffer genutzt. TAE-Puffer hat den Vorteil, dass sich dieser als 50-fach konzentrierte Lösung (2M TRIS, 1M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8.5) lagern lässt, was Zeit und Laborplatz sparen kann. TBE-Puffer wurde als 5-fach konzentrierte Lösung gelagert (450 mM Borsäure, 450 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 8.0). Beide Puffer wurden vor Verwendung mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass mit der 1-fach konzentrierten Arbeitslösung die Gelelektrophorese durchgeführt werden konnte. Die AGE wurde gemäß Lee *et al.* (2012) durchgeführt.

Elektrophoresekammer und Zubehör: (Owl Horizontal Electrophoresis Systems, Thermo Fisher Scientific) Niederspannungsnetzgerät: (Biometra P25 Standard Power Pack, Biometra GmbH, Analytik Jena) Geldokumentation: BioDocAnalyze Digital, Biometra GmbH (Analytik Jena) 100 bp DNA-Marker und 1 kb DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific).

3.4. Statistische Analysen als Grundlage für die Beurteilung von NALFIAs

3.4.1. Verfahrensvergleichsuntersuchung: Vierfeldertafel und relevante statistische Parameter

					Referenzmethode		Legende Vierfeldertafel	
					positiv	negativ		
Alternativ- methode	positiv	PA	PD	$\Sigma (PA, PD)$			PA positive Übereinstimmung	
	negativ	ND	NA	$\Sigma (ND, NA)$			PD positive Abweichung	
		$\Sigma (PA, ND)$	$\Sigma (PD, NA)$	$\Sigma (PA, NA, PD, ND)$			NA negative Übereinstimmung	
							ND negative Abweichung	

Abbildung 13 - Erklärung der Vierfeldertafel

Die Vierfeldertafel ist ein sehr einfaches Hilfsmittel um schnell komplexe Vergleichsuntersuchungen von Methoden zu überblicken. Die folgende Abbildung erklärt die in der Arbeit verwendete Darstellungsform. Anhand dieser Vierfeldertafel lassen zahlreiche relevante Parameter zur Beurteilung einer alternativen Nachweismethode errechnen.

Tabelle 11 - Übersicht der verwendeten Formeln zur Berechnung relevanter Parameter zur Methoden-Vergleichsanalyse.

Diagnostischer Parameter	Formel	Nr.
(diagnostische) Sensitivität [SE]	$SE = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$	(1)
(diagnostische) Spezifität [SP]	$SP = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\%$	(2)
Relative Sensitivität der Alternativmethode [SE _{alt}]	$SE_{alt} = \frac{PA + PD}{PA + ND + PD} \times 100\%$	(3)
Relative Sensitivität der Referenzmethode [SE _{ref}]	$SE_{ref} = \frac{PA + ND}{PA + ND + PD} \times 100\%$	(4)
Relative Genauigkeit [AC]	$AC = \frac{PA + NA}{PA + NA + PD + ND} \times 100\%$	(5)
Falschpositivrate [FPR]	$FPR = \frac{PD}{NA} \times 100\%$	(6)
Cohen's Kappa [κ] / "Konkordanzindex"	$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$ $p_0 = \frac{PA + NA}{PA + NA + PD + ND}$ $p_e = \frac{[(PA + ND) \times (NA + PD)] + [(PA + PD) \times (NA + ND)]}{(PA + NA + PD + ND)^2}$	(7)

Der Konkordanzindex (Cohen's kappa - κ) ist geeignetes statistisches Mittel um das Maß der Übereinstimmung zweier Nachweismethoden zu ermitteln. Die Bewertung der errechneten *kappa*-Werte wurde wie folgt vorgenommen: $\kappa < 0,1$ entspricht keiner Übereinstimmung; $\kappa = 0,1$ bis $0,4$ entspricht einer schwachen Übereinstimmung; $\kappa > 0,4 - 0,6$ entspricht einer deutlichen Übereinstimmung; $\kappa > 0,6$ bis $0,8$ entspricht einer starken Übereinstimmung und $\kappa > 0,8$ bis $1,0$ entspricht einer fast vollständigen Übereinstimmung.

3.4.2. Normalverteilung von Stichproben und der Student's t-Test

Zur Überprüfung der Normalverteilung relativ kleinen Stichproben ($n < 50$) wurde der Shapiro-Wilks-Tests bevorzugt verwendet (Shapiro und Wilks, 1965). Unter Annahme der Nullhypothese, dass die untersuchten Stichproben normalverteilt vorliegen, wurde der t-Test angewandt, um zu überprüfen wie sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Grundgesamtheiten zu einander unterscheiden (Student, 1908).

4. Ergebnisse

NALFIAs liefern wichtige methodische Vorteile für *Point-of-Care* kompatible Testsysteme. So können die Stärken komplexer molekularbiologischer Tests mit der Einfachheit eines Lateral Flow Immunoassays kombiniert werden. In der Konsequenz können Nachweissysteme entwickelt werden, mit denen auch untrainiertes Personal schlüssige und wertvolle Ergebnisse generieren kann (Joung *et al.*, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit soll an praxisrelevanten Beispielen die Entwicklung von NALFIAs beschrieben werden. Darüber hinaus gilt es in diesem Zusammenhang Chancen, alternative Konzepte, Nachweisstrategien aber auch Limitationen dieser Testplattform herauszuarbeiten.

Im folgenden Ergebnisteil werden verschiedene Nachweissysteme beschrieben, die in sehr unterschiedlichen Themenfeldern angesiedelt sind. Hierzu zählen Fragestellungen aus der Lebensmittelindustrie, aus der Biotechnologie, aus Veterinär- und Humandiagnostik. Alle Kapitel eint die zugrunde liegende Methodik, die von Abschnitt zu Abschnitt an Komplexität zunimmt. Der Anwendungsaspekt spielt dabei eine vergleichsweise untergeordnete Rolle, um dem methodischen Schwerpunkt und dem damit verbundenen wissenschaftlichen Anspruch der formulierten Ziele gerecht werden zu können.

4.1. Entwicklung eines *Point-of-Care* tauglichen NALFIAs zur Identifikation historisch neuer Bierschädiger: vom Konzept zum Prototyp.

Ein wichtiger Sektor, in dem molekularbiologische und immunologische Schnelltests zunehmend an Bedeutung gewinnen, ist die Lebensmittelindustrie (Law *et al.*, 2015). Dabei sollen pathogene, produktverderbende, oder produktschädigende Organismen sensitiv und spezifisch so früh wie möglich erkannt werden. Geringe Lagerkapazitäten und möglichst lange Haltbarkeiten erfordern ein Umdenken in der Analytik und somit die Nutzung alternativer Nachweismethoden, wobei *Point-of-Care* kompatible Testformate das Potenzial besitzen, wichtige analytische Nischen besetzen zu können (Choi *et al.*, 2019). Ein repräsentatives, praxisrelevantes Beispiel, das hier präsentiert werden soll, entstammt der Brauerei. Aus mikrobiologischer Sicht ist das Produkt Bier zwar ein vergleichsweise schwer zu besiedelnder Lebensraum, nichts desto trotz gibt es einige stark spezialisierte Mikroorganismen, die das Produkt schädigen und teilweise ungenießbar machen können (Schneiderbanger *et al.*, 2018). Die Früherkennung solcher (Spuren-) Kontaminationen kann extrem herausfordernd sein. Die Kombination aus selektiver Kultivierung und nachgeschalteter, molekularbiologischer Analytik hat das Potenzial eine wichtige Rolle in Lebensmittel-assozierten Fragestellungen zu spielen (Stone *et al.*, 1994).

Der Anspruch an das Nachweissystem wurde vor Beginn klar definiert. Der Nachweis von Bierverderbenden Bakterien soll sehr einfach zu handhaben sein, sowie sensitiv und spezifisch funktionieren. Der Nachweis soll außerdem präferiert aus einer selektiven Kultivierung heraus erfolgen und das Ergebnis möglichst binnen einer Stunde vorliegen (ohne Kultivierung). Die Durchführung erfolgt i.d.R. in einem mikrobiologischen Labor mit einfacher Ausstattung, was als charakteristisch für mittlere bis große Brauereien eingestuft wurde. Anhand dieser Vorgaben wurde das folgende Nachweiskonzept erarbeitet: um der Geschwindigkeit der Analyse gerecht zu werden, wird versucht eine *duplex*-PCR zu etablieren, bei der auf eine DNA-Extraktion, durch den direkten Einsatz von Zellmaterial, verzichtet werden kann. Diese Form der Direktanalytik erfordert wiederum die Entwicklung einer internen Amplifikationskontrolle (IPK), um etwaige Inhibition von validen negativen Resultaten klar diskriminieren zu können. Entstehende Amplifikate sollen im Anschluss an die PCR mit Hilfe des Universal-Lateral Flow Teststreifens MGHD2 visualisiert werden (Abb. 14).

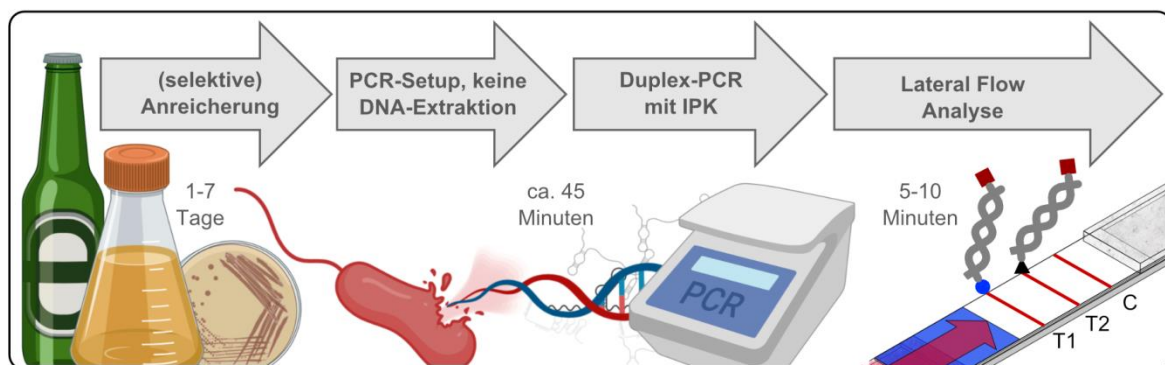


Abbildung 14 - Konzept zum Nachweis bierschädigender Bakterien. Die Analyse von Zellmaterial nach Anreicherung soll in etwa einer Stunde zu einem Ergebnis führen.

4.1.1. Identifikation von *Lactobacillus cerevisiae*

L. cerevisiae ist ein Milchsäurebakterium der Gattung *Lactobacillus*, das im Jahr 2017 erstmalig beschrieben wurde (Koob *et al.*, 2017). Das beschriebene Schadpotenzial gleicht anderen häufig vorkommenden obligat bakteriellen Bierschädigern, wie bspw. *Lactobacillus brevis*. Inzwischen wurde *L. cerevisiae* auch in einer deutschen Brauerei nachgewiesen, was eine starke Indikation für eine regionale und überregionale Verbreitung sein könnte. In gängigen RT-PCR-basierten Nachweissystemen ist dieser Organismus häufig nicht berücksichtigt, sodass z.T. Nachweislücken entstehen könnten. Ein einfacher Identifikationstest kann also im Bedarfsfall ein durchaus sinnvolles zusätzliches Werkzeug darstellen.

4.1.1.1. Entwicklung und Testung abgeleiteter Primer

Für die Identifikationen von Prokaryoten wird häufig das 16S rRNA codierende Gen genutzt (Janda und Abbott, 2007). In diesem Fall eignet sich dieser genetische Marker weniger, da die Heterogenität im Vergleich zu anderen relevanten bierschädigenden gram positiven Organismen als

unzureichend eingestuft wurde. Als Alternative wurde daher das *rpoA* Gen gewählt, das für die α -Untereinheit der RNA-Polymerase in Prokaryoten kodiert und ebenfalls für Identifikationsnachweise genutzt werden kann (Park *et al.*, 2010). In diesem genetischen Abschnitt konnte eine potenziell ausreichende Heterogenität identifiziert werden, was die Ableitung geeigneter Nachweisprimer ermöglichte.

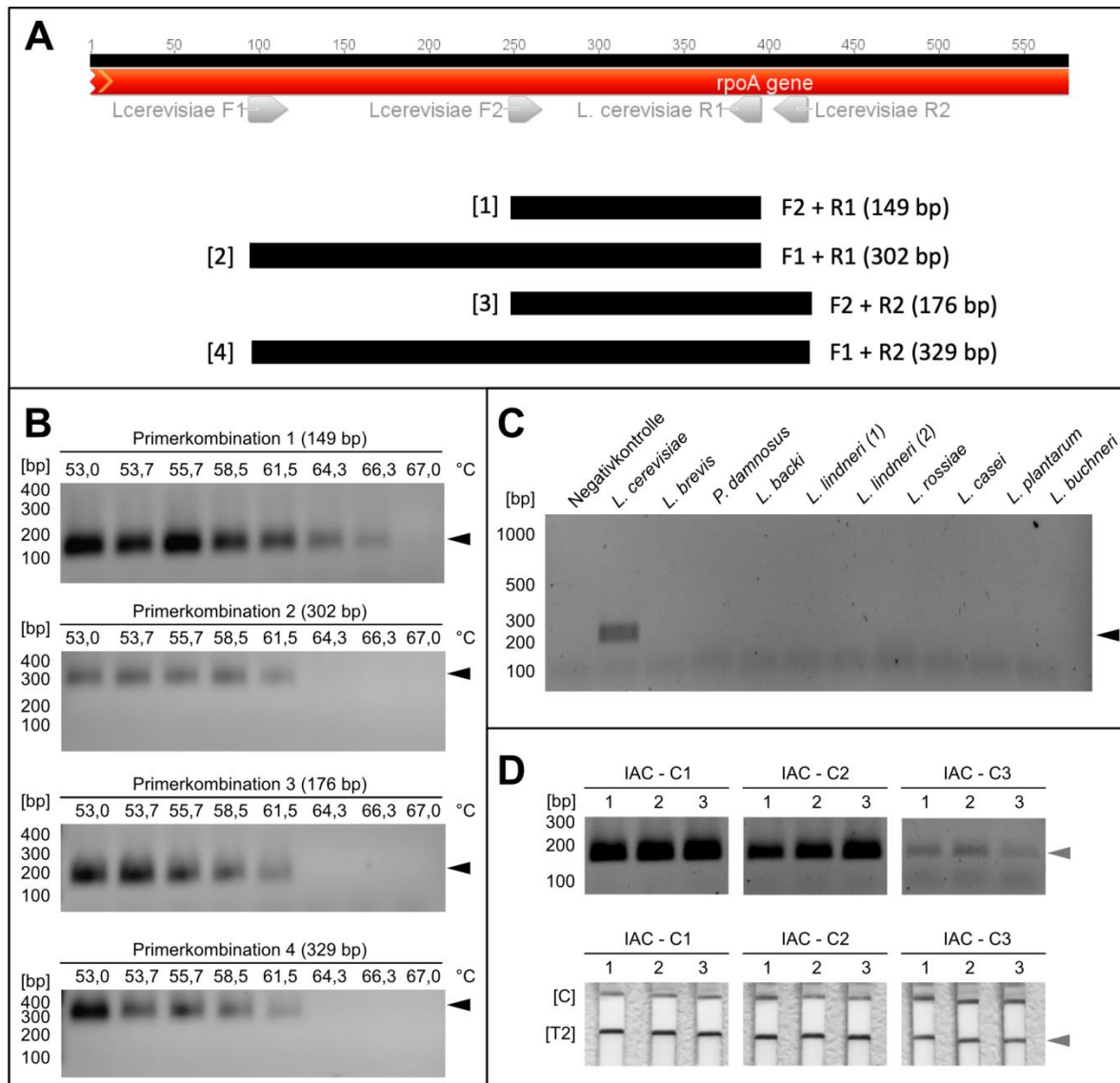


Abbildung 15 - Primerbindestellen und gelbasierte Voranalysen **(A)** Übersicht der Primerbindestellen im *rpoA* Gen von *L. cerevisiae*, sowie die vier möglichen Primerkombinationen mit dem jeweils daraus resultierenden PCR-Produkten. **(B)** Gradienten-PCR (Temperaturgradient: Annealing) mit den vier möglichen Primerkombinationen **(C)** Orientierende Spezifitätsanalyse unter Nutzung der Primerkombination 1. **(D)** Voranalyse zur Einstellung der internen PCR-Kontrolle (IAC). Untersucht wurden dabei 3 IAC-template Konzentrationen via AGE und LFA. Die schwarzen Dreiecke deuten auf die Höhe der erwarteten *L. cerevisiae*-spezifischen PCR-Produkte, wohingegen die grauen Dreiecke auf die Signale der IAC deuten.

Zunächst wurden vier Primer abgeleitet. Beide *forward* Primer sind mit beiden *reverse* Primern laut *in silico* Präanalytik kompatibel und kombinierbar, woraus sich vier mögliche Primerkombinationen ergeben. Die Produktgrößen variieren dabei von 149 bis 329 bp (Abbildung 15 A). Unter Verwendung dieser vier Primerkombinationen wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die Versuche mit variierenden Annealingtemperaturen waren ein wichtiger Indikator für die Etablierung eines

PCR-Protokolls und gaben zudem eine erste Orientierung hinsichtlich der tatsächlichen Primerkompatibilität und Amplifikationseffizienz (Abbildung 15 B).

Für den Nachweis von *L. cerevisiae* wurde beginnend ein breites Temperaturspektrum gewählt, von 53°C bis 67°C. Grundsätzlich zeigen die Kombinationen 2, 3 und 4 ein recht vergleichbares Verhalten im Primerannealing. Im Bereich zwischen 61,5°C und 64,3°C sinkt die Amplifikationseffizienz deutlich, sodass bei 64,3°C Annealing keine PCR-Produkte via AGE nachweisbar sind. Mit Hilfe der Primerkombination 1 ist bei 66,3°C noch ein sichtbares PCR-Produkt via AGE erkennbar. Diese Primerkombination wurde für weitere Analysen präferiert und für den Transfer in das Lateral Flow Format gründlicher hinsichtlich des Annealingverhaltens und der Spezifität untersucht.

4.1.1.2. Transfer des Assays in das PCR-Lateral Flow-Format

Die Entscheidung für die Auswahl der Primerkombination 1 erfolgte ohne das Wissen um die tatsächliche Spezifität, die mit Hilfe dieser Oligonukleotide im Testsystem generiert werden kann. Aus diesem Grund wurde eine erneute Gradienten-PCR-Analyse in einem deutlich engeren Bereich (Annealing: 63,5°C bis 67,7°C) durchgeführt. Im Rahmen dieser Analyse wurde nicht nur *L. cerevisiae* als *template* verwendet, sondern zusätzlich Material einer nahe verwandten Nicht-Ziel-Spezies: *Lactobacillus brevis* (Abbildung 16 B). Ziel ist es die Spezifität genauer im LFA-basierten Kontext beurteilen zu können. Gerade im Bereich der Primerbindestellen weist *Lactobacillus brevis* verhältnismäßig wenige *mismatches* bei einer potentiellen Primerbindung auf (*forward*-Primer: 5; *reverse*-Primer: 3; Abbildung 16 A). Der selten vorkommende Organismus *Lactobacillus parabrevis* stand zum Zeitpunkt der Analyse nicht zur Verfügung. Nicht nur die Auswahl der *templates* ist von Bedeutung, sondern auch die verwendete Quantität. Dabei wurde bewusst ein starkes Ungleichgewicht provoziert. Während verhältnismäßig viele *Lactobacillus brevis* – Zellen (>2.000-20.000 cfu / Analyse) zum Einsatz kamen, so wurden bewusst wenige Zellen der *L. cerevisiae* – Kultur genutzt (ca. 20 Zellen / Analyse). Es ging darum etwaige Unspezifitäten zu forcieren und gleichzeitig sicher zu stellen, dass der Nachweis in ausreichender Sensitivität reproduzierbar funktioniert.

Im gesamten Temperaturspektrum konnten keinerlei Unspezifitäten unter Verwendung des *L. brevis templates* forciert werden. Unter Zugabe von *L. cerevisiae* waren über den gesamten Temperaturbereich hinweg Signale auf Höhe der Testlinie erkennbar, wobei die Signalstärke, wie zu erwarten, mit steigender Temperatur abnahm. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein *touchdown*“Temperaturprotokoll für den *L. cerevisiae* Identifikations-Nachweis abgeleitet. Je Zyklus wurde die Annealingtemperatur um 0,18°C über die Temperaturdekrement-Funktion des Thermocyclers verringert. Im ersten Zyklus wurde die Annealingtemperatur auf 65°C festgesetzt. Nach etwa 30 Zyklen liegt die Annealingtemperatur bei unter 60°C. Folglich handelt es sich um eine *Touchdown*-PCR, bei der durch hohe Initialannealing-Temperaturen eine besonders gute Spezifität erreicht werden soll (siehe Anhang). In einem abschließenden Spezifitätstest wurden 10 Organismen

mit dem *L. cerevisiae* Identifikationstest überprüft (Abbildung 16 C). Darunter befanden sich ausschließlich Brauerei-relevante Mikroorganismen. Es handelt sich hierbei um *Lactobacillus* spp. und einen repräsentativen Vertreter der nah verwandten Gattung *Pediococcus* (*P. damnosus*, obligater Bierschädiger).

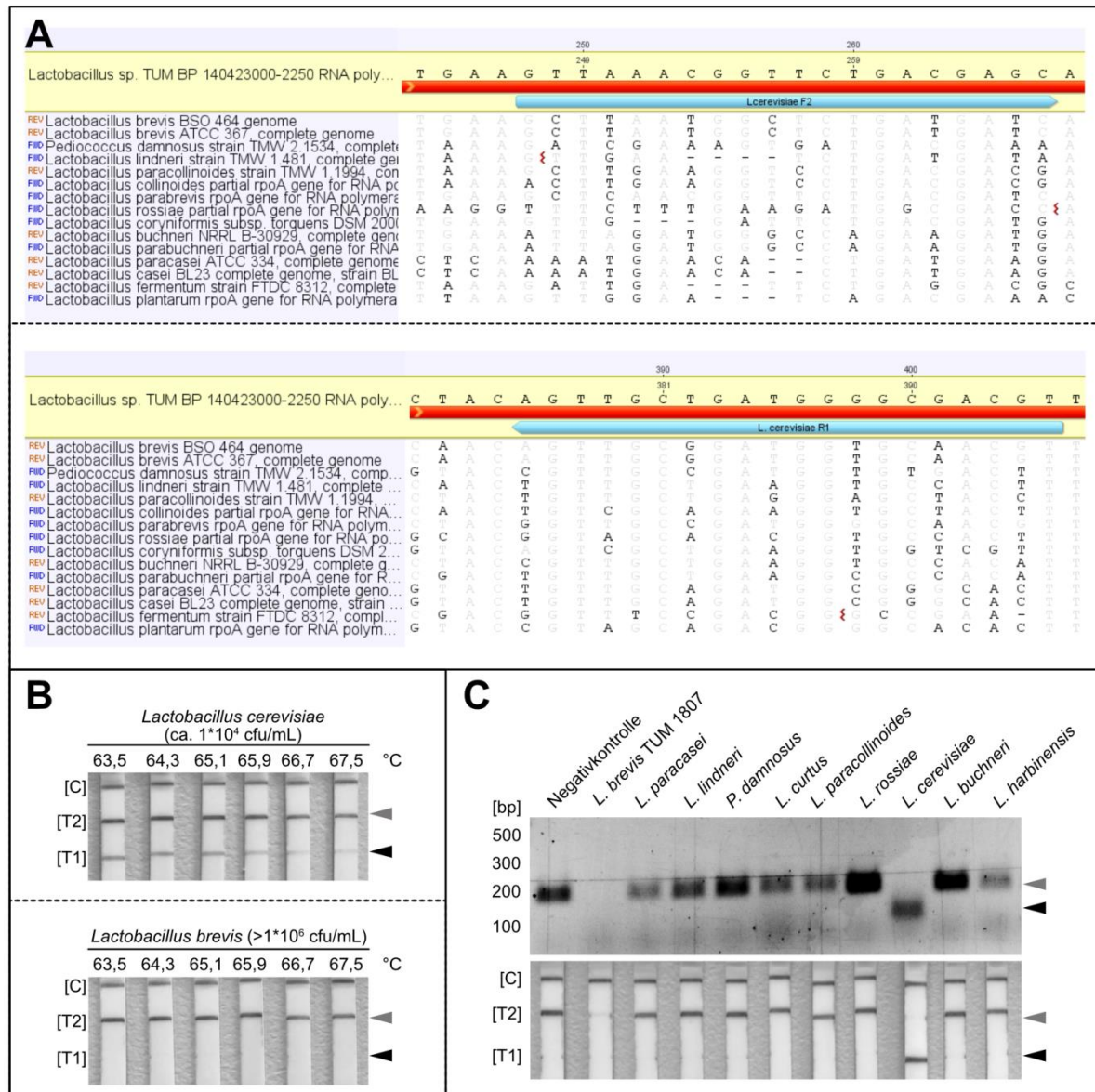


Abbildung 16 - Weiterführende Testung der favorisierten Primerkombination 1 – Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur, *multiplex*-Kompatibilität, Sensitivität und Nachweis-Spezifität. **(A)** Dargestellt sind Auszüge eines repräsentativen *Alignments* im Bereich der Primerbindestellen für *L. cerevisiae* F2 und R1. Als Referenzsequenz wurde der zu identifizierende Organismus *L. cerevisiae* definiert (*Lactobacillus* sp. TUM BP). Abweichende Basen in den Vergleichssequenzen anderer Organismen sind schwarz hervorgehoben. Der hellblaue Pfeil symbolisiert die Primerbindestelle. **(B)** vergleichende Gradienten-PCR-Analyse unter Nutzung zweier *templates* (Anreicherungen NBB-B, *L. brevis* mit $>1 \cdot 10^6$ cfu / mL und *L. cerevisiae* mit etwa $1 \cdot 10^4$ cfu/mL). Der Temperaturgradient wurde im Annealingschritt zwischen 63,5°C und 67,5°C eingefügt. Unter **(C)** sind die Ergebnisse einer orientierenden Spezifitätsanalyse dargestellt. Dabei wurde das PCR-Produkt parallel via AGE und LFA visualisiert. In das Agarosegel wurden 10 µL der PCR-Produkte geladen, wobei auf den Lateral Flow Teststreifen 2 µL aufgegeben wurden. Für die Analysen unter B und C wurden die Komponenten für die interne Amplifikationskontrolle implementiert (grauer Pfeil). Die schwarzen Pfeile in B und C deuten auf *L. cerevisiae* – spezifische Signale.

Bei keiner der verwendeten Spezies konnte eine Kreuzreaktivität bzw. Unspezifität beobachtet werden. Der verwendete *L. brevis*-Stamm (*L. brevis* TUM 1807) induzierte in diesem Versuchsteil

eine Inhibition der PCR, was sich anhand einer ausbleibenden T2-Linie auf dem LFD ableiten lässt (Abbildung 16 C). Aufgrund der vorangegangenen Gradientenanalyse kann eine Kreuzreaktivität mit *Lactobacillus brevis*-DNA trotzdem ausgeschlossen werden (Abbildung 18 B).

4.1.2. Identifikation von *Lactobacillus rossiae*

L. rossiae zählt ebenso zur Gattung *Lactobacillus*, wurde erstmalig 2005 beschrieben und erst später im Zusammenhang mit kontaminierten Bieren in Verbindung gesetzt (Corsetti *et al.*, 2005 / Schneiderbanger *et al.*, 2019). Das charakteristische Schädigungsprofil zeichnet sich durch z.T. extreme Texturveränderung (erhöhte Viskosität, Schleim) im Produkt aus, was kontaminiertes Bier u. U. ungenießbar machen kann (Schneiderbanger *et al.*, 2019).

Die Entwicklung des Nachweises von *L. rossiae* unterlag einer wichtigen Restriktion. Die Praxisrelevanz dieses Tests wurde in Vorgesprächen mit dem Referenzinstitut für Brauerei- und Lebensmittelqualität (BLQ - Technische Universität München, Weihenstephan) als verhältnismäßig hoch eingestuft, sodass eine weiterführende Nutzung des Nachweises zeitweise im Raum stand. Aus diesem Grund sollte der Nachweis nicht nur alle Anforderungen des *L. cerevisiae*-Nachweises erfüllen (Abschnitt 4.1), sondern darüber hinaus in einem vorher definierten Temperatur-Protokoll funktionieren (Anhang, Tabelle 24). Dieser Umstand erschwerte die Nachweisentwicklung erheblich, weshalb eine Anpassung der Entwicklungsstrategie erforderlich war.

4.1.2.1. Entwicklung und Testung abgeleiteter Primer

Da das Temperaturprotokoll für den Identifikationstest bereits definiert und somit nicht modifizierbar war, wurde eine bedeutend größere Auswahl an etwaigen Nachweisprimern abgeleitet.

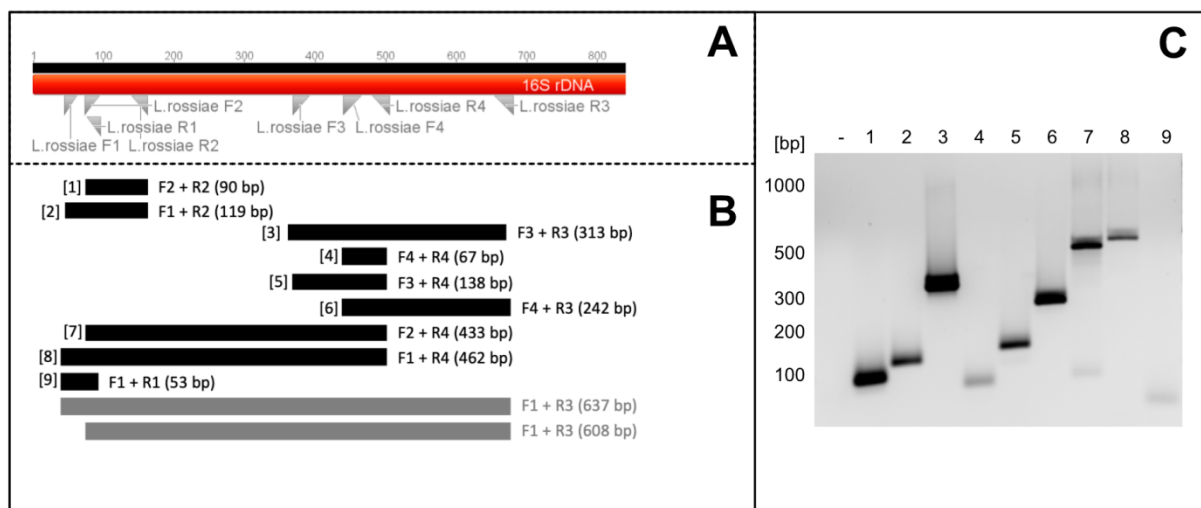


Abbildung 17 - *L. rossiae* Nachweis-Entwicklung: Lokalisierung der Bindestellen und Funktionalitätstest. **(A)** 8 Primer wurden im 16S rDNA-Gen abgeleitet. **(B)** Daraus ergeben sich 11 mögliche Primerpaare, die zur Amplifikation unterschiedlich großer Fragmente genutzt werden können. Für die praktische Testung kommen nur Kombinationen in Frage, aus denen Fragmente kleiner 500 bp hervorgehen (schwarze Balken). Amplifikate mit einer theoretischen Größe über 500 bp wurden zunächst nicht in den **(C)** praktischen Funktionalitätstest mit einbezogen. Verwendete Primerkombinationen sind unter B nummeriert und dementsprechend getestet. Die PCR-Produkte wurde in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt und visualisiert. Diese Präanalyse erfolgte mit unmarkierten Primern.

Auf Grundlage des 16S rRNA codierenden Gens wurden acht verschiedene Primer genutzt, was in 11 möglichen Kombinationen resultierte (Abbildung 17 A). Davon wurden neun in die Analysen einbezogen, weil die entstehenden Produkte eine Größe von weniger als 500 bp aufwiesen. Kleinere Fragmente wurden in Anbetracht des vorgegebenen Temperaturprotokolls präferiert (Elongationszeit 5 sek, Synthesegeschwindigkeit Polymerase: 1kb /15 sek). Für alle neun getesteten Primerkombinationen konnte ein PCR-Produkt in erwarteter Größe nachgewiesen werden, auch für die größeren Fragmente mit 433 und 464 bp. Die Kombinationen 1, 2, 5 und 6 wurden für Folgeanalysen ausgewählt (Abbildung 17 B).

Die vier favorisierten Primerkombinationen zum Nachweis von *L. rossiae* wurden in einem vergleichsweise kleinem Spezifitätstest verglichen (Abbildung 18 A1-A4). Darunter befanden sich acht relevante Bierschädiger der Gattung *Lactobacillus*, sowie *L. rossiae* als positive Kontrolle zur Bestätigung der PCR-Funktionalität. Für alle untersuchten Primerkombinationen konnten die erwarteten Amplifikate erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei variierten die Signalstärken deutlich voneinander. Während in den PCRs mit den Primerkombinationen 1 und 6 vergleichsweise viel Produkt erkennbar war, so konnte insbesondere unter Nutzung der Primerkombination 2 weniger Amplifikat im Agarosegel nachgewiesen werden. Auffällig war zudem, dass durch Verwendung der Primerkombination 1 für alle getesteten nicht - *L. rossiae*- Spezies unerwünschte Amplifikate erzeugt wurden. Weiterhin lassen sich unter Umständen aus dieser Analyse weitere Unspezifitäten oder unerwünschte Primerinteraktionen ablesen. Unter Verwendung der Primerkombination 5 wurde ein unerwünschtes Amplifikat durch Zugabe von *Lactobacillus brevis* detektiert. Dieses < 100 bp große PCR-Produkt weicht deutlich von der für *L. rossiae* erwarteten Fragmentgröße (138 bp) ab. Eben solche Unspezifitäten könnten nach dem Transfer des Nachweises in das Lateral Flow Format der Grund für falsch positive Resultate sein. Aus diesen Gründen wurde die Primerkombination 6 für weiterführende Versuche präferiert (Abbildung 18 A4).

Doch bevor es dazu kam, wurden weitere relevante Primer-Eigenschaften untersucht. Wozu insbesondere die *multiplex*-Kompatibilität zählte. Die Nutzung einer internen Amplifikationskontrolle ist gerade für Direktanwendungen (ohne DNA-Extraktion) essentiell, um die Funktionalität der Amplifikationsreaktion zu überprüfen. Dabei sollte weder die Sensitivität der Nachweisreaktion verloren gehen, noch sollten die verwendeten Primer und das zusätzliche *template* unspezifisch mit einander kreuzreagieren. Dadurch könnte es ebenfalls zu Sensitivitätseinbußen kommen oder gar zu unerklärlichen Signalen auf dem LFD. Die Abbildung 18 B verdeutlicht, dass die Nachweisprimer und IAC-Komponenten *multiplex* kompatibel und funktionell sind. In dieser Form gelingt der Nachweis von *L. rossiae* sehr robust unter Zugabe hoher Zellzahlen, aber auch wenig Zellmaterial genügt, um deutlich positive Resultate zu generieren ($1 \cdot 10^4$ Zellen/mL, also 20 Zellen je PCR). Das IAC-Fragment wird in der *duplex*-PCR erfolgreich amplifiziert und ist in allen untersuchten Verdünnungsstufen gut via AGE nachweisbar. Somit erfüllte die verwendete Primerkombination alle relevanten Kriterien für den Transfer in das PCR-Lateral Flow-System.

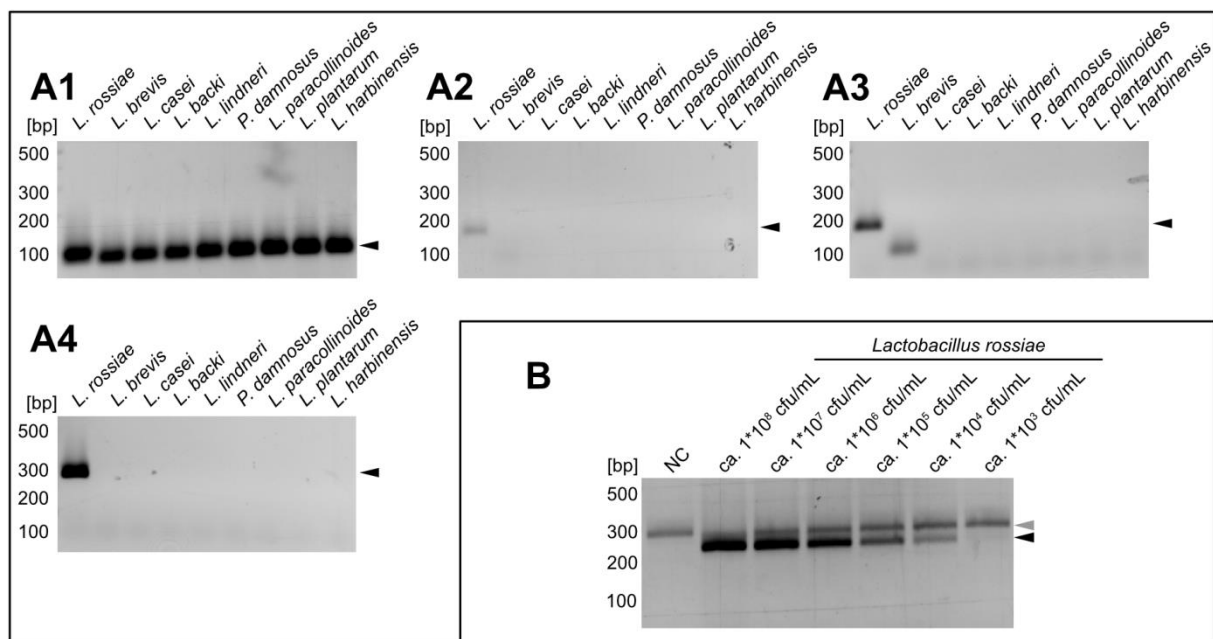


Abbildung 18 - Vergleichende Spezifitätsanalyse von 4 Primerkombinationen zum Nachweis von *L. rossiae*. Verglichen wurden die Primerkombination 1, 2, 5 und 6 (gemäß Abbildung 17) in einer orientierenden Spezifitätsanalyse (**A1** - **A4**). Die Primerkombination 6 stellte sich als vielversprechend heraus und wurde mit implementierter IAC auf Sensitivität und *multiplex*-Kompatibilität untersucht (**B**). Alle Analysen erfolgten mit unmarkierten Primern und dementsprechend via AGE ausgewertet. Der graue Pfeil deutet auf die IAC, wohingegen der schwarze Pfeil auf *L. rossiae* spezifische Signale deutet.

4.1.2.2. Transfer des Assays in das PCR-Lateral Flow-Format

Um eine LFA-kompatible Nachweis-PCR zu etablieren, wurden die Nachweisprimer am 5'-Ende modifiziert. Hierbei wurde ein Primer am 5'Ende mit einem Biotin / Digoxigenin markiert und der dazugehörige Primer ebenfalls am 5'Ende mit einem FITC-Label markiert. Durch den Einbau dieser Markierungen wird das daraus entstehende, beidseitig markierte Amplifikat auf dem verwendeten Universalteststreifen erkennbar⁴ (Abschnitt 1.2.6., Abbildung 4). In einem Funktionalitätstest wurde der Nachweis von *Lactobacillus rossiae* hinsichtlich Inklusivität, Exklusivität und Sensitivität orientierend analysiert (Abbildung 19). Fünfzehn praxisrelevante Bakterienisolate wurden in die Exklusivitätsanalyse einbezogen (Abbildung 19 A). Dabei gab es keine sichtbaren Unspezifitäten. Alle getesteten *L. rossiae*-Isolate wurden durch den Nachweis sicher erkannt (Abbildung 19 C). Der Test war in der Lage etwa 2-200.000 Zellen je PCR zu detektieren. Die verwendeten Primer erwiesen sich *multiplex* kompatibel, wobei die interne Amplifikationskontrolle etwas abgeschwächt werden könnte. So wären inhibitorische Effekte ggf. deutlicher erkennbar. Zusammenfassend erfüllt der entwickelte *L. rossiae*-Nachweis nichts desto trotz alle gestellten Anforderungen.

⁴ PCR-LFA zum Nachweis von *L. rossiae* erforderte 25 pmol des unmarkierten Oligonukleotids Anti_*L.rossiae*_revL im Laufpuffer

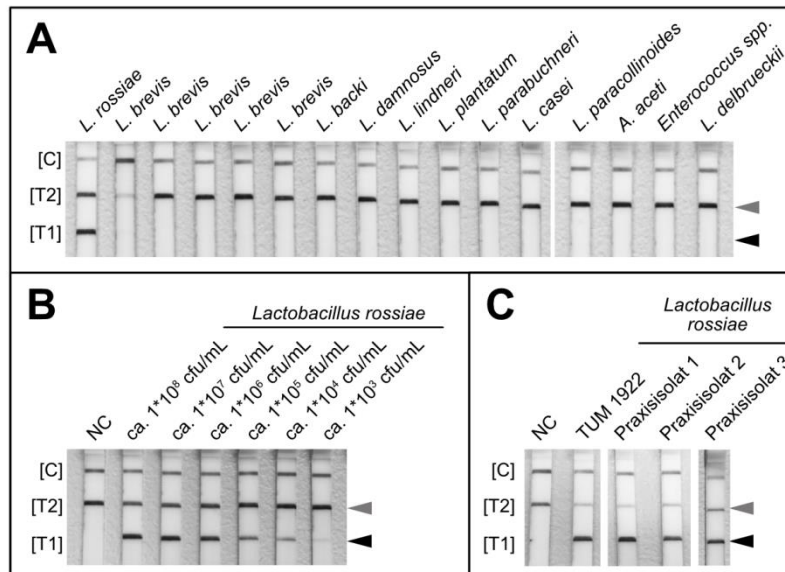


Abbildung 19 – Funktionalitätsprüfung des *L. rossiae* Nachweises **(A)** Spezifitätsanalyse mittels direkt PCR an Flüssiganreicherungen ($\geq 1 \cdot 10^6$ cfu / mL). **(B)** Sensitivitätsanalyse an Verdünnungsreihe einer *L. rossiae* Anreicherung. **(C)** Testung verschiedener *L. rossiae* Isolate aus Flüssiganreicherung ($\geq 1 \cdot 10^6$ cfu / mL). Der graue Pfeil deutet auf die IAC, der schwarze Pfeil auf *L. rossiae* spezifische Signal.

4.1.3. Matrixkompatibilität der Identifikationsnachweise

In einem weiteren Versuchsteil wurde die Praxistauglichkeit der beiden entwickelten Identifikations-Nachweise für *L. cerevisiae* und *L. rossiae* auf die Probe gestellt. Im Brauerei-mikrobiologischen Labor werden Identifikationstests präferiert aus Anreicherungen heraus vorgenommen. Die Rede ist dabei von Kolonien auf Festmedien (z.B. nach Membranfiltration) oder in Flüssigmedien (Kultivierung von Membranfiltern oder Abstrichproben). In allen Fällen liegen zum Zeitpunkt eines optischen Verdachts erhebliche Mengen an Zellmaterial vor. Die Zellmenge, Stoffwechselprodukte oder Bestandteile des Medium können für einen direkt PCR-basierten Nachweis herausfordernd sein und im Extremfall zu Inhibition führen (Schrader *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurden zusätzlich Analysen mit diesem beschriebenen Ausgangsmaterial durchgeführt (Flüssiganreicherung in NBB-Bouillon mit $> 1 \cdot 10^7$ cfu / mL, Kolonie von NBB-Agar). Je Probenart wurden je drei Tests durchgeführt. Für alle Analysen konnten eindeutig positive Ergebnisse erzielt werden, was auf keinerlei inhibitorische Effekte hindeutet und die Robustheit des Nachweissystems unterstreicht (Abbildung 20).

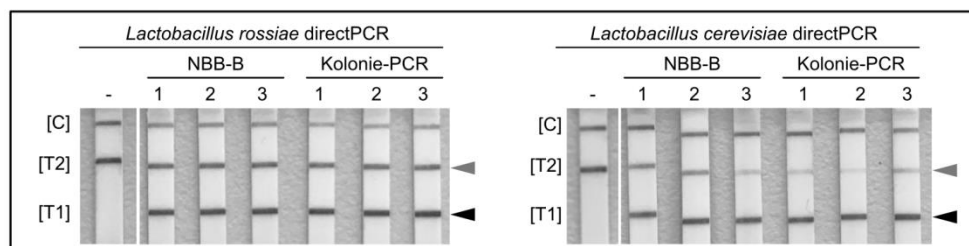


Abbildung 20 - Praxisrelevante Direktanalytik: Untersucht wurde Zellmaterial aus Flüssiganreicherung mit NBB-B® oder vom Festmedium NBB-A® mittels direkt PCR in Dreifachbestimmung.

4.1.4. Eigenschaften der Identifikationsnachweise von *L. rossiae* und *L. cerevisiae*

Es ist gelungen zwei Nachweisprototypen zu entwickeln, mit deren Hilfe die einfache und schnelle Identifikation der zwei historisch neuen bierschädigenden Bakterien, *Lactobacillus rossiae* und *Lactobacillus cerevisiae*, gelingt. Für die Nachweisführung war keine DNA-Isolation erforderlich. Sofern genügend biologisches Material in die PCR eingebracht wurde, funktionierte der Nachweis sehr robust und trotzdem sensitiv. Die untere Nachweisgrenze lag bei etwa 20 KBE je Reaktion. Die Nachweissysteme erwiesen sich als kompatibel mit NBB-B[®], einem der am häufigsten verwendeten Anreicherungsmedien in der Brauerei-Mikrobiologie. Auch Kolonien von Festmedien lassen sich direkt beproben, wobei mit einer einfachen Vorverdünnung in Wasser gearbeitet wurde. Beide Identifikations-Tests beinhalten eine interne Amplifikationskontrolle, die eine Beurteilung der PCR-Kompatibilität und -Funktionalität erlaubt und somit eine valide Nachweisführung über direkt PCR ermöglicht.

4.2. Alternativer Homoplasmie-/Heteroplasmie-Schnelltest für *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii ist eine einzellige Grünalge, die in vielerlei Hinsicht als Modellorganismus betrachtet wird (Harris, 2001 / Scaife *et al.*, 2015). In den vergangenen 15 Jahren, rückten einzellige Algen u.a. als Plattform für die Überexpression von Proteinen und auch im Kontext der synthetischen Biologie in den Fokus der Forschung und Wirtschaft (Rasala *et al.*, 2010). Dabei wurde neben der zytosolischen Überexpression insbesondere der große, becherförmige Chloroplast von *C. reinhardtii* als Ort der Überexpression von (Fremd-) Proteinen genutzt (Mayfield *et al.*, 2007). Dabei wurden teils spezielle Transformationssysteme erarbeitet, wie im Jahr 2015 durch Bertalan und Kollegen beschrieben. Dieses markerfreie System nutzt die Komplementation des für die Fotosynthese erforderlichen *psbA*-Gens einer *psbA*-Deletionsmutante (Fud7). Basierend auf diesem System können potentielle Transformanten über die Eigenschaft Photoautotrophie selektiert werden. Zusätzlich kann genetisches Material inseriert werden, welches die Synthese heterologer Proteine ermöglicht (Bertalan *et al.*, 2015).

Eine wichtige Analyse für die Charakterisierung von Mutanten ist die sogenannte Homo-/ Heteroplasmie-Untersuchung, bei der der Anteil modifizierter Plastomkopien überprüft wird. Das daran geknüpfte Ergebnis ist essentiell für Kultivierungsbedingungen, sowie für die Beurteilung und das *Timing* von Expressionsanalysen. Ein kontinuierliches Monitoring kann vor falscher Kultivierung und Verlust der Transformante schützen (Bateman und Purton *et al.*, 2000 / Fischer *et al.*, 1996).

Eine „historisch gewachsene“ und nach wie vor häufig verwendete Methode zur Beurteilung der Homo-/ oder Heteroplasmie ist die Southern Blot Analyse (Sambrook *et al.*, 1989 / Bertalan *et al.*, 2015). Diese ist material- und zeitintensiv, sodass 3 bis 4 Tage zum Ergebnis benötigt werden, was die Erarbeitung alternativer, schneller Analysen notwendig macht.

4.2.1. Nachweis von Homo-/ Heteroplasmie via PCR-LFA

Wie beschrieben, wird im pMM2-abhängigen Transformationssystem, unter Verwendung der *psbA*-Deletionsmutante Fud7, das für die Fotosynthese essentielle *psbA*-Gen komplementiert (gemäß Bertalan *et al.*, 2015), was Transformanten zu photoautotrophem Wachstum befähigt (Abbildung 21 A). Dieser genetische Locus wird für die Erarbeitung eines alternativen PCR-Lateral Flow basierten Homo-/ Heteroplasmietest verwendet. Hierfür wurde eine einfache *duplex* PCR abgeleitet, aus der ein Rezipienten-spezifisches PCR-Fragment und ein Transformanten-spezifisches Fragment hervorgehen (Abbildung 21 B). Ein universeller FITC-markierter Primer soll dabei im Exon I des *psbA*-Gens binden. Diese Primerbindestelle existiert sowohl im Plastom des Rezipienten, als auch im modifizierten Plastom der Transformante. Zusätzlich adressiert ein weiterer biotinylierter Primer das Intron I des *psbA*-Gens, was charakteristisch für den Rezipienten ist. Das sich daraus ableitende Rezipienten-spezifische PCR-Produkt ist folglich Biotin- und FITC-markiert und kann somit auf der T1-Linie des MGH22 abgebildet werden (Abbildung 21 A).

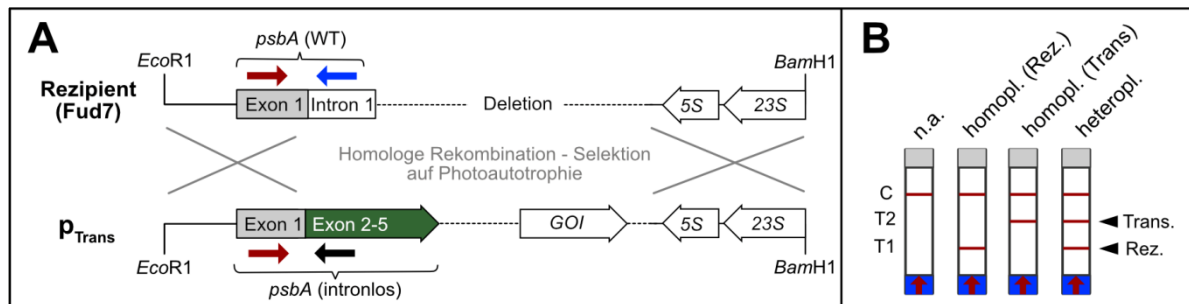


Abbildung 21 - Einfacher Homoplasmie-Test mit Hilfe einer PCR-LFA: Transformationssystem und Nachweisstrategie (A) Übersicht pMM2-basiertes Transformationssystem und Strategie für den Nachweis von Homo- und Heteroplasmie im pMM2-Fud7 Transformationssystem (rote Pfeile: Forward FITC Primer; blauer Pfeil: Rezipienten-spezifischer, biotinylierter reverse Primer; schwarzer Pfeil: Transformanten spezifischer, DIG-markierter reverse Primer) (B) Übersicht Interpretation der LFDs.

Zusätzlich wird in das PCR-System ein DIG-markierter Primer gegeben, der im Exon 2 des *psbA*-Gens bindet (Transformanten-spezifischer Locus). Folglich ist das DIG-FITC-markierte Amplikon spezifisch für das transformierte Plastom und kann auf der T2 des genutzten LFDs abgebildet werden. Die fast gleichgroßen Amplifikate (120bp und 121 bp) lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Markierungen auf dem Universalteststreifen HybriDetect 2T differenzieren, nicht aber via AGE.

4.2.2. Nachweis-Optimierung: Cross Primer Dimere, Matrix-Kompatibilität und der Einfluss einfacher DNA-Extraktionsmethoden

Ein häufig beobachtetes NALFIA-Phänomen ist die unerwünschte Interaktion zwischen unterschiedlich markierten Oligonukleotiden. LFA werden zumeist bei Raumtemperatur durchgeführt, was dazu beitragen kann, dass durch geringe Affinitäten von Primern oder Sonden zueinander Amplifikations-unabhängige Signale auf den Teststreifen entstehen. Untersucht wurden vier mögliche markierte Primer, von denen zwei FITC- und je einer biotinyliert bzw. DIG-markiert vorlagen. Das

Mischen sowie die anschließende Analyse via Lateral Flow führte zu unerwünschten, Amplifikations-unabhängigen Signalen auf dem LFD (Abbildung 22 A, Teststreifen 5-10). Die Nutzung dieser Primerkombination(en) unter diesen Bedingungen würde folglich zu einem nicht interpretierbaren Test führen. Die LFA bei höheren Temperaturen durchzuführen (37°C) erwies sich als einfache und effiziente Anpassung, um die Bildung der Heterodimere weitestgehend zu unterbinden (Abbildung 22 A, Teststreifen 5-10). Diese methodische Adaptierung versteht sich als essentielle Maßnahme, um die Interpretierbarkeit des Nachweises zu gewährleisten.

Ein wichtiges Charakteristikum von NALFIAs ist neben der Analysegeschwindigkeit, die Einfachheit und Robustheit mit der ein Nachweis geführt werden kann. Die Probenvorbereitung ist dabei als wesentliche Komponente der Nachweisführung nicht zu vernachlässigen. Das direkte Einbringen von Algenmaterial in die Amplifikationsreaktion würde folglich den genannten NALFIA-Charakteristika entgegenkommen. Aus diesem Grund wurde die Funktionalität dieser direkt PCR und Einflüsse des für Anzucht verwendeten Selektivmediums (*high salt*, HS) und Vollmediums (*Tris Acetate Phosphate*, TAP) genauer untersucht. In ersten Experimenten erwies sich die direkt PCR an Flüssiganreicherungen als funktionell. Rezipient und Transformante wurden via PCR-LFA korrekt als solche identifiziert und sogar die 1 zu 100 Mischung von Rezipient und Transformante führte zu einem erfolgreichen Nachweis der Heteroplasmie (Abbildung 22 B). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Anreicherungsmedien keinen negativen Einfluss auf die Amplifikationsreaktion ausüben (Abbildung 22 B).

Via direkt PCR gelang die erfolgreiche Identifizierung der Heteroplasmie bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:100 bis 1:1000 (Rezipient : Transformante). Vergleichend konnte durch die Verwendung einfacher „*quick and dirty*“-Extraktionsmethoden die Nachweisempfindlichkeit gesteigert werden (Abbildung 22 C). Dabei ermöglichte die Chelex-basierte und die EDTA-basierte Schnellextraktion eine sensitive und sichere Identifizierung der Heteroplasmie bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:1000. Der empfindlichste Nachweis gelingt durch Nutzung des aufwändigen klassischen DNA-Isolationsprozederes (Abbildung 22 C).

Ein entscheidender Faktor bei der Nutzung einer vorgeschalteten Extraktionsmethode ist das Wissen um die Funktionalität mit unterschiedlichen Mengen an biologischem Material. Deshalb wurden die genutzten Extraktionsmethoden (EDTA, CHELEX, ETNA) und die direkt PCR unter Verwendung unterschiedlicher Zellzahlen getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die CHELEX-basierte Extraktion besser mit geringeren Zellzahlen funktionierte ($4,5 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^6$ cfu/mL), wohingegen EDTA- und ETNA-basierte Schnellextraktion eher für die Nutzung höherer Zellzahlen geeignet sind. Die direkt PCR funktionierte überraschenderweise über ein recht breites Spektrum an Kulturen mit Zellzahlen zwischen $4,5 \cdot 10^4$ bis $4,5 \cdot 10^7$ cfu/mL. In diesem Bereich konnte die 1:100 Mischung aus Rezipient und Transformante sicher korrekt positiv identifiziert werden (Abbildung 22 C).

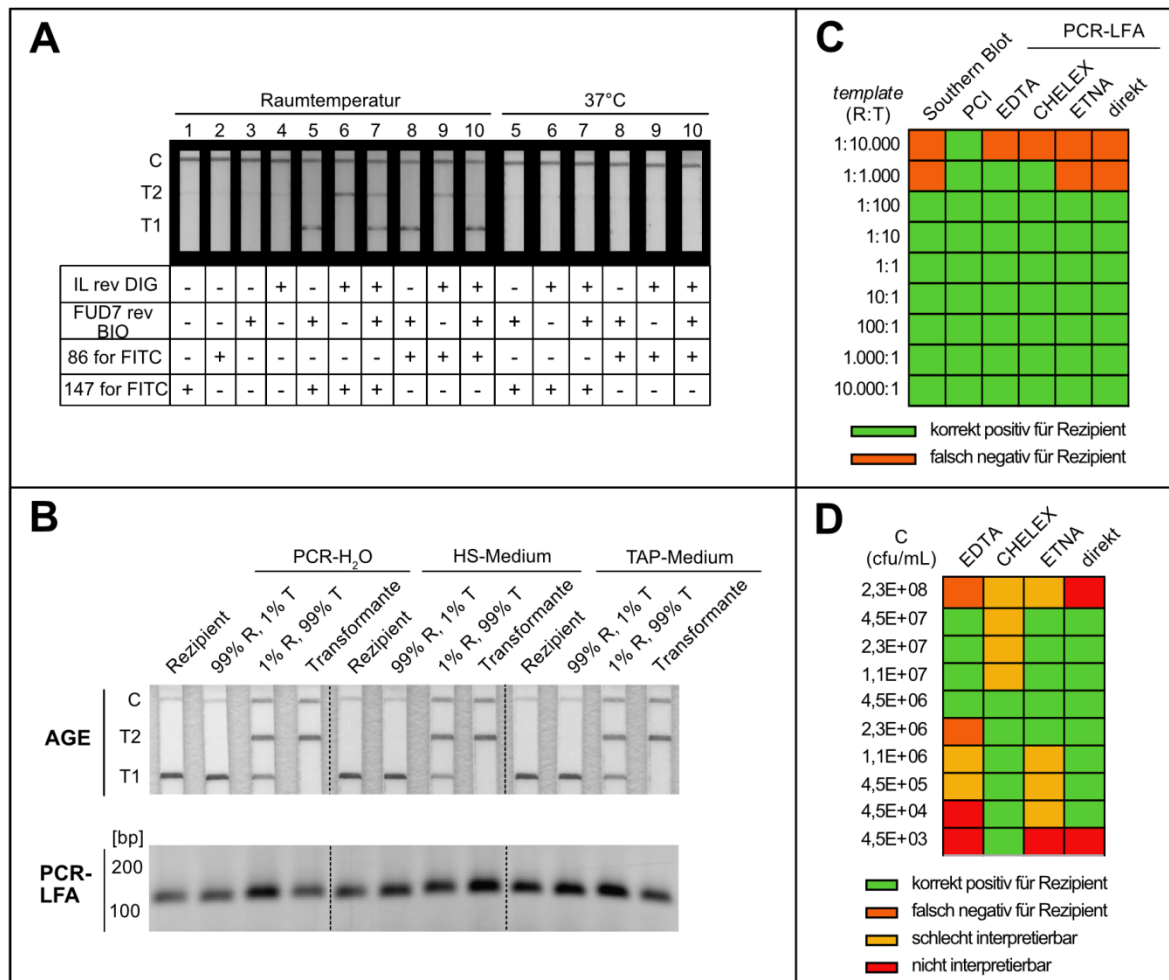


Abbildung 22 – Assay-Optimierung: Cross Primer Dimere, direkt PCR und der Einfluss einfacher DNA-Extraktionsmethoden (A) Eliminierung von Cross-Primer-Dimeren durch Wärme. (B) Kompatibilität direkt PCR: Zellen einer Kultur mit der OD 0.3 wurden in verschiedenen Medien aufgenommen, resuspendiert und in direkt, ohne weitere Aufarbeitung in die *multiplex*-PCR gegeben. PCR-Produkte wurden via AGE und LFA ausgewertet. (C) Nachweis-Sensitivität der Southern-Blot-Analyse im Vergleich zur PCR-LFA in Kombination mit verschiedenen Extraktionsmethoden, bzw. der direkt PCR. Als Grundlage für die Analyse wurden Mischungen aus Kulturen des Rezipienten und der Transformante für die Bestimmung herangezogen (OD 0.3). (D) Funktionalität der PCR-LFA in Kombination mit verschiedenen Extraktionsmethoden in Abhängigkeit zur verwendeten Zellzahl. Verwendet wurde das Mischungsverhältnis 1:100 (Rezipient : Transformante).

4.2.3. Vergleich: Southern Blot Analyse und PCR-LFA

Praktisch ist es gelungen durch die Nutzung einer speziellen Polymerase (Maxima HotStart Polymerase, Thermo Fisher) ein für das Nachweiskonzept passendes Enzymsystem zu identifizieren. Nach Nachweis-Optimierung gelang es, im Vergleich zur Referenzmethode (Southern Blot Analyse), ein vergleichsweise sensitives Nachweissystem zu etablieren. Vorangegangene Versuche belegten den sicheren und deutlichen Nachweis des Rezipienten-Plastoms unter Verwendung der direkt PCR. Dabei konnte mehrfach die 1:100 Mischung (Rezipient : Transformante) sicher als heteroplasmisch identifiziert werden. In einer Vergleichsuntersuchung wurde das identische Probenmaterial zusätzlich für eine Southern Blot Analyse herangezogen, welche gemäß Bertalan *et al.* (2015) durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Southern Blot Analyse in dieser Form sogar etwas insensitiver funktionierte (Abbildung 23).

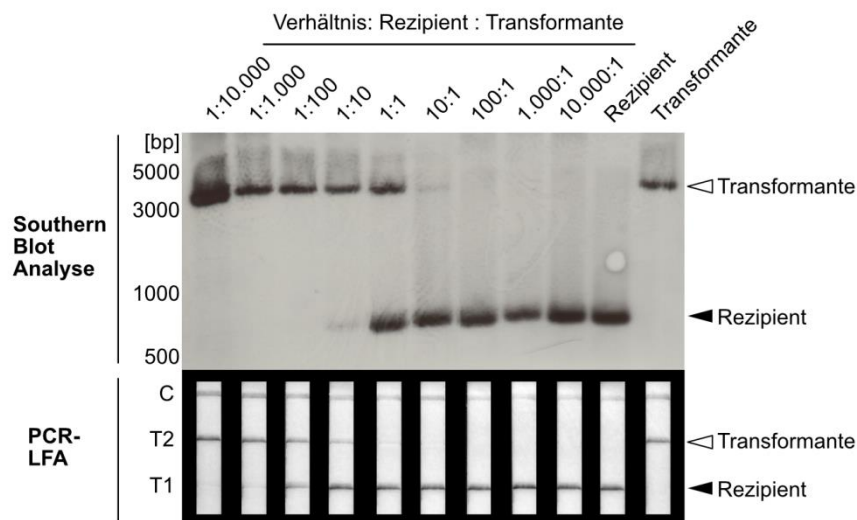


Abbildung 23 – Funktionalität der PCR-Lateral Flow-basierten Analyse im Vergleich zur Southern Blot Analyse (gemäß 8.2.5.1)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es gelungen ist, eine einfache und schnelle Alternativmethode zur herkömmlichen Southern Blot-basierten Untersuchung der Homo-/Heteroplasmie zu etablieren. Die beschriebene PCR-LFA bietet trotz gewisser Limitationen die Möglichkeit Kulturen schnell und ohne besonderen Aufwand zu prüfen.

4.3. Validität eines kommerziellen NALFIA Nachweissystems – *Alicyclobacillus* Detektion aus Fruchtsaftkonzentraten

Die bis hierhin beschriebenen Nachweisprinzipien wurden bereits erfolgreich in kommerziell verfügbaren Nachweis-Systemen verwendet. Ein geeignetes Beispiel ist ein Testsystem, bei dem relevante Fruchtsaftschädiger einfach und schnell detektiert und identifiziert werden können. Genau wie bei den bisher präsentierten Tests wird dabei der Universalteststreifen HybriDetect 2T mit einer vorgeschalteten *multiplex*-PCR kombiniert (Abbildung 24 A). Detektiert werden Spezies der Bakteriengattung *Alicyclobacillus* (ACB). Hierbei handelt es sich um thermophile, acidophile Sporenbildner, die in der Lage sind Pasteurierungsprozesse zu überdauern und Fruchtsäfte durch die Bildung erheblicher Fehl aromen zu schädigen (Wisotzkey *et al.*, 1992 / Walls und Chuyate, 2000 / Groenewald *et al.*, 2008 / Pettipher *et al.*, 1997 / Gocmen *et al.*, 2005).

Das verwendete Nachweissystem setzt sich aus einer recht einfachen Extraktionsmethode und zwei parallel oder sequenziell nutzbaren PCR-Systemen, die via LFA auswertbar sind, zusammen (Abbildung 24 A). In der ersten PCR wird die Funktionalität der Amplifikation über eine integrierte interne Amplifikationskontrolle (IAC) überprüft und parallel auf die Anwesenheit von ACB getestet.

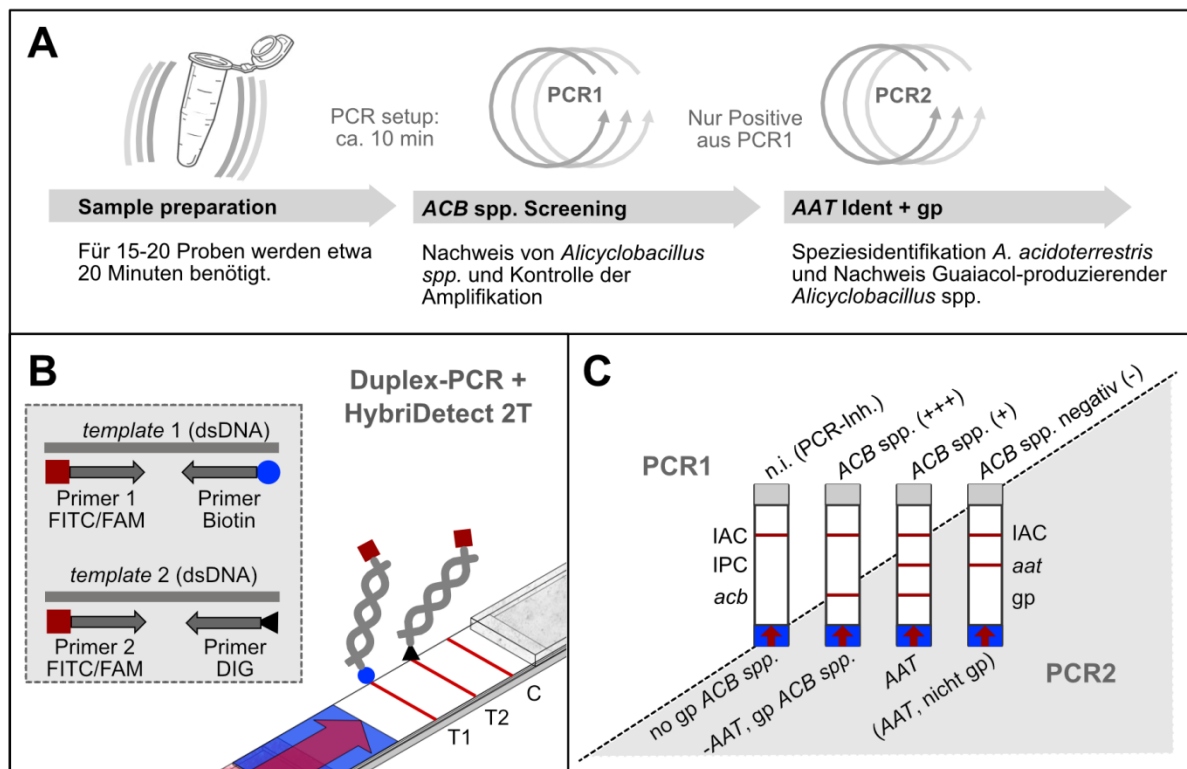


Abbildung 24 - Übersicht *Alicyclobacillus* Nachweissystem, Assay-Sensitivität und Assay-Spezifität. **(A)** Abarbeitung des Nachweissystems: Nach einer einfachen Probenaufarbeitung werden Gattungsnachweis, sowie Nachweis zur Fähigkeit der Guaiacolbildung und AAT-Identifizierung durch sequenziell durchgeführte PCRs durchgeführt. **(B)** Nachweisprinzip, in zwei nacheinander geschalteten duplex-PCRs werden markierte Amplifikate erzeugt und anschließend über den MGH2-Universalteststreifen analysiert. **(C)** Interpretation der Teststreifen: in der ersten PCR sind *Alicyclobacillus* spp. (ACB) nachweisbar. Parallel wird die Funktionalität der PCR mit einer internen Amplifikationskontrolle (IPC) überprüft. In der Folge-PCR kann *Alicyclobacillus acidoterrestris* (aat) identifiziert werden und Guaiacol-produzierende ACB spp. (gp) erkannt werden.

Sind ACB nachweisbar, kann bei Bedarf die zweite Amplifikationsreaktion unter Nutzung des gleichen Extrakts durchgeführt werden. Die zweite duplex-PCR identifiziert den häufigsten Saftschädiger *A. acidoterrestris* (AAT), sowie Guaiacol-produzierende ACB (Abbildung 24 C). In den folgenden Abschnitten ist es das Ziel, dieses kommerziell verfügbare Nachweissystem zur Detektion und Charakterisierung von ACB auf dessen Praxistauglichkeit hin zu testen. Es sollte untersucht werden, wie valide die Kombination aus Amplifikationsmethode und Lateral Flow Analyse im praktischen Kontext funktioniert. Dabei sollte die *Performance* der Detektionsmethode mit anderen Nachweiskonzepten verglichen werden. Um dies zu bewerkstelligen wurden drei generelle Fragestellungen umfangreich bearbeitet. Hierbei handelt es sich um die Frage nach der Spezifität, die über Untersuchungen zur Inklusivität und Exklusivität des Testsystems beantwortet werden sollten. Weiterhin wurde versucht in einem praktischen Kontext die Nachweisgrenzen der Tests zu ermitteln. Abschließend galt es das gesamte Nachweissystem in einer umfassenden Vergleichsuntersuchung gemäß DIN ISO EN 16140 zu überprüfen. Als Referenzmethode wurde eine in der Praxis sehr relevante Kultivierungsmethode, mit dem Namen IFU No. 12, herangezogen

4.3.1. Funktionalität und Spezifität

Eine grundlegende Funktionalität des Testsystems konnte rasch gezeigt werden (Abbildung 25 A). So gelang es 1000 cfu / mL AAT sowohl mit dem Screening-Test (PCR1), als auch mit dem Folgetest (PCR2) als Guaiacolbildner zu identifizieren. Auch nicht-Guaiacol-produzierende ACB (hier exemplarisch *A. acidocaldarius*) wurden im Screening korrekt erkannt und gaben in der Folge-PCR korrekt-negative Ergebnisse. Weiterhin wurde *A. acidiphilus* getestet. Bei diesem selteneren Saftschädiger handelt es sich ebenfalls um einen Organismus, der zur Guaiacol-Produktion befähigt ist (Matsubara *et al.*, 2002). Und hier gelang die korrekte Einordnung. Der ACB-Screening-Test fiel positiv aus und es wurde die Anwesenheit eines Guaiacol-produzierenden ACB bestätigt, bei dem es sich jedoch nicht um AAT handelt (Abbildung 25 C).

Entsprechend dieses Prinzips wurden insgesamt 45 *Alicyclobacillus* spp. Isolate analysiert (Abbildung 25 C). Die Untersuchung hinsichtlich der Inklusivität ergab, dass alle sieben getesteten Spezies (darunter AAT, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius*, *A. pomorum*, *A. fastidiosus*) erfolgreich nachgewiesen werden konnten. Alle 38 Praxisisolate (ausschließlich AAT und *A. acidocaldarius*) wurden ausnahmslos korrekt via PCR-LFA charakterisiert. Im praktischen Kontext können falsch positive Resultate ebenfalls erhebliche wirtschaftliche Schäden zur Folge haben. Aus diesem Grund sind Analysen hinsichtlich der Exklusivität ebenfalls von großer Bedeutung. Für das *Alicyclobacillus* Nachweissystem wurden insgesamt zehn verschiedene nicht-ACB Spezies getestet, darunter besonders praxisrelevante Vertreter der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* (Mast *et al.*, 2016). In keinem Fall konnten reproduzierbar falsch positive Ergebnisse beobachtet werden (Abbildung 25 C).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass das untersuchte *Alicyclobacillus* Nachweissystem in der Lage ist, ACB spezifisch nachzuweisen. Im getesteten Umfang gelang es alle relevanten ACB zu erkennen und korrekt zu charakterisieren. Besonders hervorzuheben ist die korrekte Identifikation aller Guaiacol-produzierenden ACB, da es bislang keinen vergleichbaren Nachweis auf Ebene von DNA-Amplifikationsreaktionen gibt. Die detaillierten Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität sind im Anhang zudem in umfangreicherer Form dargestellt (Tabelle 26.1 und 26.2, sowie Abbildung 73).

4.3.2. Sensitivität unter Nutzung verschiedener Matrices

Der Nachweis von ACB erfolgt in den meisten Fällen aus Fruchtsäften oder Fruchtsaftkonzentraten heraus. Gerade Konzentrate zeichnen durch ein enormes PCR-Inhibitionspotential aus (Cai *et al.*, 2015), was die Bedeutung der vorgeschalteten Extraktionsmethode unterstreicht. Hier wird versucht einen Großteil potentieller Inhibitoren zu entfernen, ohne *Alicyclobacillus*-Zellmaterial zu verlieren. Um den Einfluss der Matrix nicht zu vernachlässigen, wurde die Sensitivitätsanalyse aus drei verschiedenen Medien durchgeführt. Verwendet wurde dabei der Referenzstamm *Alicyclobacillus*

acidoterrestris DSM 49025. Definierte Zellzahlen ($1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^6$ cfu / mL) wurden in das Standard-Anreicherungsmedium BAT-B, in Orangensaft-Konzentrat (OSK) und Apfelsaftkonzentrat (ASK) gegeben. Die beiden Fruchtsaftkonzentrate wurden gemäß IFU No. 12 mit BAT-B im Verhältnis 1:9 gemischt. Analysiert wurden diese Proben mit beiden verfügbaren PCRs (Abbildung 25 B). In BAT-B und ASK waren mit jedem PCR-Test sicher $1 \cdot 10^3$ cfu / mL detektierbar. Im OSK konnten ACB-Screening-Test und der Nachweis Guaiacol-produzierender ACB ebenfalls bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^3$ cfu / mL eindeutig positive Ergebnisse liefern. Der Identifikationstest zur Erkennung von AAT erwies sich als etwas insensitiver in der Matrix OSK, weshalb eine Mindestkonzentration von $1 \cdot 10^4$ cfu / mL für ein eindeutig positives Ergebnis erforderlich war (Abbildung 25 B).

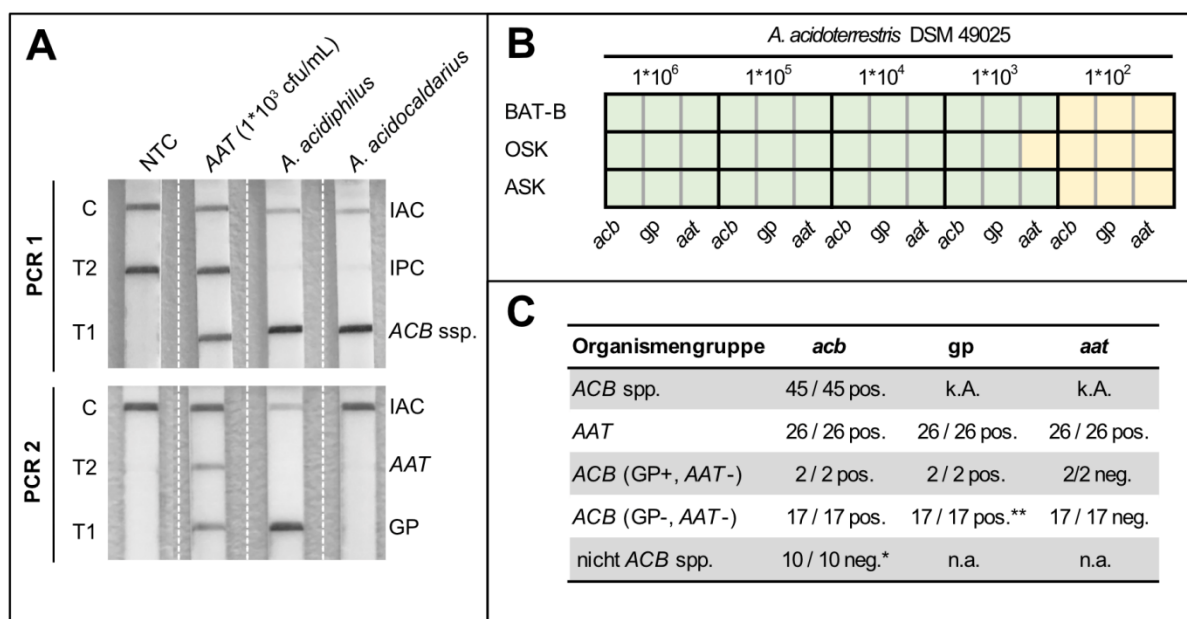


Abbildung 25 – Funktionalität des Testsystems: Spezifität und Sensitivität **(A)** Funktionalität: repräsentative Ergebnisse der PCR-LFA sind dargestellt. **(B)** Matrix-abhängige Sensitivitätsanalysen: Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe des Referenzstamms *A. acidoterrestris* DSM 49025 in BAT-B (Anreicherungsmedium, Döhler GmbH), sowie Mischungen aus BAT-B und Orangensaftkonzentrat (OSK) und Apfelsaftkonzentrat (ASK) beimpft und dann mit dem *Alicyclobacillus* Nachweissystem untersucht. Die Analyse erfolgte mit beiden Test-PCRs, weshalb je Verdünnungsstufe und Matrix zwischen dem Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. (*acb*), Guaiacol-produzierenden *Alicyclobacillus* spp. (*gp*) und *A. acidoterrestris* (*aat*) unterschieden wird. Ein grünes Feld symbolisiert einen positiven Nachweis und die gelben Felder repräsentieren negative Testergebnisse. **(C)** Spezifitätsanalyse: 55 Proben wurden in dieser Analyse herangezogen, darunter 45 Organismen der Gruppe *Alicyclobacillus* (*ACB* spp.) Unter diesen 45 Organismen befinden sich 25 *Alicyclobacillus acidoterrestris*-Stämme (AAT), 2 Guaiacol-produzierende *Alicyclobacillus* Spezies, die nicht AAT sind (*ACB*, GP+, AAT-), und 17 nicht-Guaiacol-produzierende *Alicyclobacillus* spp. (*ACB*, GP-, AAT-). Zusätzlich wurden für Exklusivitätsanalysen wurden 10 praxisrelevante nicht-*Alicyclobacillus* Spezies (nicht-*ACB* spp.) genutzt. Betrachtet wurden die PCR-Resultate der Nachweis *acb*, *gp* und *aat*, analog zu B. [*] symbolisiert ein falsch positives Resultat, welches sich nicht reproduzieren ließen, [**] symbolisiert ein falschpositives Resultat, welches sich in Folgeanalysen korrekt positive herausstellte.

4.3.3. Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140

Die Zusammensetzung des Probensets ist entscheidend für die Aussagekraft der darauf fußenden Vergleichsanalyse. Gemäß DIN ISO EN 16140 wurden insgesamt 60 bereits voranalysierte Proben auf das Vorhandensein von *ACB* getestet. Bei dem Probenmaterial handelt es sich um natürlich kontaminierte Realproben (Fruchtsaftkonzentrate, Fruchtsäfte, Pürees, etc.). Das Probenset setzte sich

aus 30 filtrierbaren und 30 nicht-filtrierbaren Proben zusammen. In Voranalysen wurden 30 Proben positiv analysiert und 30 Proben negativ. Als Referenzmethode wurde die praxisrelevante Kultivierungsvorschrift herangezogen mit dem Namen IFU No. 12. Diese Methode gilt nach wie vor als Goldstandard in der *Alicyclobacillus*-assoziierten Nachweisanalytik (Smit *et al.*, 2011). Ziel einer so aufwendigen Vergleichsanalyse ist es, die alternative Nachweismethode hinsichtlich der Genauigkeit, der Empfindlichkeit und der Robustheit mit einer etablierten Referenzmethode zu vergleichen.

Mit Hilfe der IFU No. 12 wurden von 60 analysierten Proben, 25 *ACB*-negativ bestimmt. In 35 Proben konnten *ACB* nachgewiesen werden. Der enzymatische Guaiacoltest identifizierte 21 *ACB*-Isolate als Guaiacol-Produzenten. Via 16S-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS wurden 22 *ACB*-Isolate als *AAT* und 13 *ACB*-Isolate als *A. acidocaldarius* identifiziert. Unter Verwendung des PCR-LFA *Alicyclobacillus* Nachweissystems wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten (vor Anreicherung (0d), nach 48h Anreicherung (2d), nach 72h Anreicherung (3d) und nach 5-tägiger Anreicherung (5d)) ein Aliquot der Anreicherungskultur für die Analyse herangezogen. Der Tabelle 12 lassen sich die Kerndaten dieser Vergleichsanalyse entnehmen. Die Zusammensetzung des genutzten Probensets, sowie die erzeugten Resultate dieser Untersuchung sind zusätzlich im Anhang gelistet (Tabelle 30).

Tabelle 12 - Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140. Errechnete statistische Parameter gemäß Tabelle 11. (PA – positive Übereinstimmung, PD – positive Abweichung, NA – negative Übereinstimmung, PD – positive Abweichung)

PCR-LFA-system	Dauer Anreicherung [d]	Anzahl analysierter Proben					SE _{alt} [%]	AC [%]	FPR [%]	SP [%]	k
		PA	NA	PD	ND	total					
acb	0	4	23	2	31	60	16,2	45	8,7	92	<0,1
	2	26	24	1	9	60	75	83,3	4,2	96	0,67
	3	30	23	2	5	60	86,5	88,3	8,7	92	0,76
	5	35	23	2	0	60	100	96,7	8,7	92	0,93
aat	0	0	36	2	22	60	8,3	60	5,6	94,7	<0,1
	2	20	38	0	2	60	90,9	96,7	0	0	0,93
	3	21	38	0	1	60	95,5	98,3	0	0	0,96
	5	22	38	0	0	60	100	100	0	0	1
gp	0	1	38	1	20	60	9,1	65	2,6	97,4	<0,1
	2	19	38	1	2	60	90,9	95	2,6	97,4	0,89
	3	20	38	1	1	60	95,5	96,7	2,6	97,4	0,93
	5	21	38	1	0	60	100	98,3	2,6	97,4	0,96

Zum Zeitpunkt 0 (ohne Voranreicherung) lassen sich keine schlüssigen Ergebnisse mit Hilfe des PCR-LFA-Systems generieren. Nach 48-stündiger Anreicherung konnten bereits 26/35 *ACB* detektiert werden. Hervorzuheben ist, dass 20/22 *AAT*-Isolate zu diesem Zeitpunkt nachweisbar waren. Nach weiteren 24h verbesserte sich die Nachweisbarkeit auf 30/35 *ACB*-positiven Proben. Aber erst nach 5-tägiger Anreicherung wurden 100% *ACB* detektiert. Diese Kernergebnisse unterstreichen die Funktionalität der PCR-LFA-Methode im Vergleich zur langwierigen, selektiven

Kultivierungsmethode. Als besonders wichtig ist die Dauer der Voranreicherung zu werten. Die sich daraus ableitenden statistischen Parameter (SE_{alt} , AC, FPR, SP, k) sind für die folgende Diskussion von entscheidender Bedeutung.

4.4. Entwicklung einer universellen Hybridisierungsstrategie

Die Etablierung einer sehr einfachen Hybridisierungsstrategie stellt eine wertvolle Komponente in Nukleinsäure-basierten Lateral Flow Nachweissystemen dar. Gerade in Amplifikationsreaktionen können bei zunehmender Dauer (Zyklenzahl) vermehrt unspezifische Reaktionsprodukte entstehen, die dann unter Umständen zu falsch positiven Resultaten führen. Insbesondere bei der bisher präsentierten Nachweisstrategie mit markierten Primern ist die Sensitivität der Nachweisreaktion unter Beibehaltung der Spezifität ab einem gewissen Punkt limitiert. Aus diesen Gründen ist ein zusätzliches Werkzeug, das eine sehr sensitive und trotzdem spezifische Nachweisführung ermöglicht, von besonderem Interesse. Durch eine an die Amplifikationsreaktion anschließende sequenzspezifische Hybridisierung einer markierten Sonde an das Amplifikat, würden unspezifische Reaktionsprodukte keine sichtbaren Signale generieren. Darüber hinaus könnte ein zusätzlicher post-Amplifikations-Hybridisierungsschritt zu einer gesteigerten Nachweisspezifität beitragen.

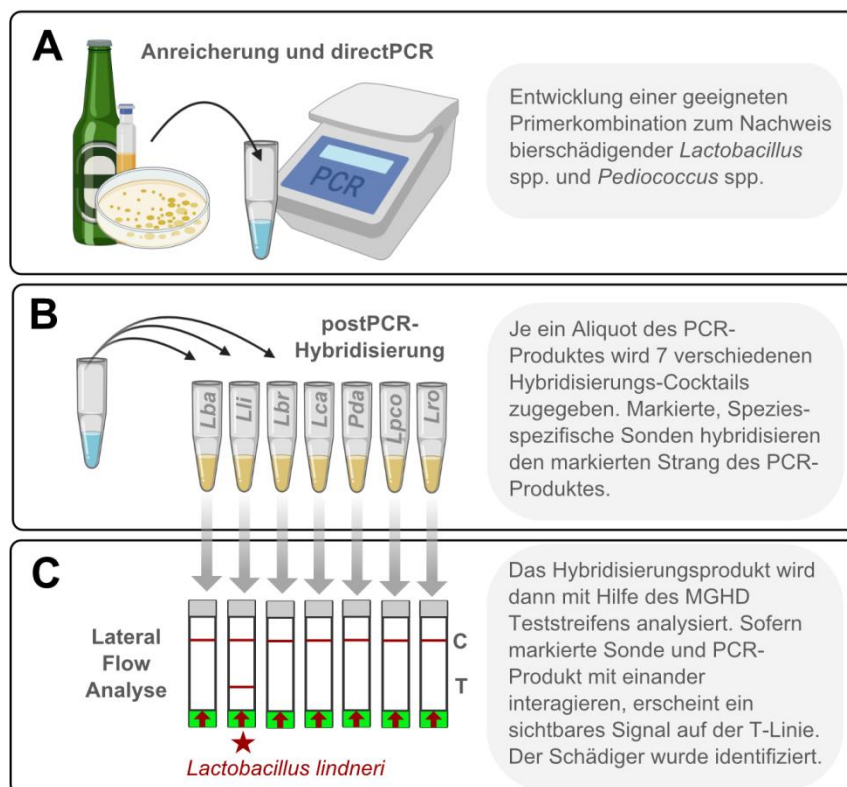


Abbildung 26 - Nachweisstrategie zur Speziesidentifikation der häufigsten bierschädigenden Bakterien. **(A)** Kultur und direkt PCR: Anhand einer Anreicherungskultur wird Material für eine direkt PCR eingesetzt. Dabei wird mit einer konservierten Primerkombination ein FITC-markiertes Amplifikat für bierschädigende *Lactobacillus* spp. und *Pediococcus* spp. erzeugt. **(B)** post PCR-Hybridisierung: Dieses PCR-Produkt wird dann in sieben verschiedene Hybridisierungscocktails gegeben und die Hybridisierungsreaktion durchgeführt, wobei spezifische Biotin-Sonden ggf. den FITC-Strang des PCR-Produktes binden. **(C)** LFA: Jedes Hybridisierungsprodukt wird separiert mit Hilfe des MGH-Teststreifen analysiert. Entstehende Signale auf der Test-Linie bestätigen die Anwesenheit des jeweiligen Organismus (hier exemplarisch: *L. lindneri*).

4.4.1. Identifikation relevanter Bierschädiger durch post PCR-Hybridisierung

Um eine universelle und sehr einfache Hybridisierungsstrategie zu entwickeln, wurde ein bereits bekanntes Testsystem genutzt: die Speziesidentifikation bierschädigender Bakterien. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Nachweisen historisch neuer Schädiger (Abschnitt 4.1.), wurden in diesem Testsystem die relevantesten, bierschädigenden Bakterien adressiert (Abb. 26). Als Zwischenziel wurde definiert, dass ein Gruppen-spezifisches Amplifikat (bierschädigende *Lactobacillus* spp. und *Pediococcus* spp.) via PCR erzeugt wird, welches anschließend durch Hybridisierung genauer charakterisiert wird. Durch Nutzung spezifischer Sonden soll zwischen den am häufigsten vorkommenden Brauerei-assoziierten prokaryotischen Schädigern differenziert werden können.

4.4.2. Optimierung der Hybridisierungsreaktion

Aus vorangegangenen Analysen wurde eine grundlegende Konstellation gefunden, in der die Hybridisierung einer Sonde an ein PCR-Produkt gelingt. Durch Erhöhung der Salzkonzentration und der genutzten Temperatur gelang es Hybridisierungsprodukte via LFA abzubilden. Die daraus resultierenden Signalintensitäten waren gerade im Vergleich zur PCR mit markierten Primern verhältnismäßig schwach (Abbildung 28 B, Teststreifen „-H“). Aus diesem Grund wurde eine Optimierung der Hybridisierung einer Sonde an ein PCR-Produkt angestrebt.

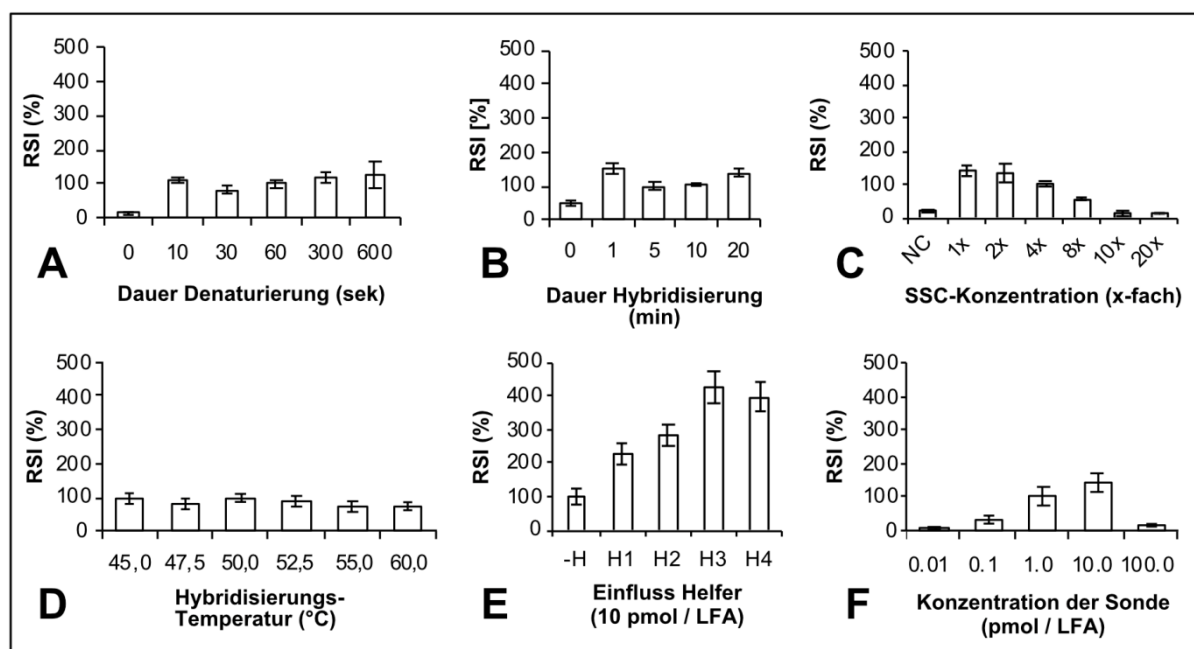


Abbildung 27 - Einfluss verschiedener Parameter auf die Hybridisierungseffizienz. Dargestellt ist die relative Signalintensität der Test-Linie nach Hybridisierung. Die Durchführung der Hybridisierungsreaktion, sowie die nachgeschaltete Dokumentation wurde standardisiert, sodass alle Intensitätswerte vergleichbar sind. Als Referenz (100% RSI) wurden die Parameter des bisherigen Standard-Hybridisierungsprotokolls genutzt (Denaturierung: 60 sek, Hybridisierung: 5 min, 4xSSC, Hybridisierungstemperatur: 50°C, ohne Helfer, 1 pmol Sonde / LFA).

Als Testsystem diente der Nachweis von *Lactobacillus backi*. Orientierende Versuche belegten, dass gerade diese Hybridisierungsreaktion verhältnismäßig schwache Signale liefert. Als potentiell

relevante Parameter wurden die Denaturierungsdauer, die Hybridisierungsdauer, die Hybridisierungstemperatur, sowie die Salz- und Sondenkonzentration definiert. Diese zu variieren, führte in keiner Konstellation zu einer deutlichen Verbesserung der Signalstärke auf der T-Linie (Abbildung 27. A, B, C, D, F). Erst durch Zuhilfenahme sogenannter Faltungshelfer gelang eine deutliche Verbesserung der Nachweisbarkeit des *L. backi* PCR-Produktes.

In dieser Arbeit werden Helfer als nicht-markierte Oligonukleotide definiert, die keinen direkten Einfluss auf die Lateral Flow Analyse nehmen, da ihnen die für die Erkennung erforderlichen Markierungen fehlen. Faltungshelfer sind komplementär zu angrenzenden Bereichen der Sondenbindestelle des PCR-Produktes und sollen durch Modifizierung der Sekundärstruktur des zu hybridisierenden DNA-Einzelstranges Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz nehmen. Folglich wurden Helfer abgeleitet, die beinahe die gesamte Länge des zu hybridisierenden PCR-Produktes abdecken, ausgenommen der Sondenbindestelle (Abbildung 28. A). Aus der Abbildung 27 geht hervor, dass die Zugabe der Helfer durchaus einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit nimmt. So gelingt es in diesem Testsystem in Anwesenheit der Helfer 3 oder 4 die Signalstärke auf der T-Linie um das Vierfache zu steigern. Aus diesem Grund wurde der Versuch erweitert und alle möglichen Helferkombinationen in einer Dreifachbestimmung untersucht, vereinheitlicht dokumentiert und über ImageJ quantifiziert.

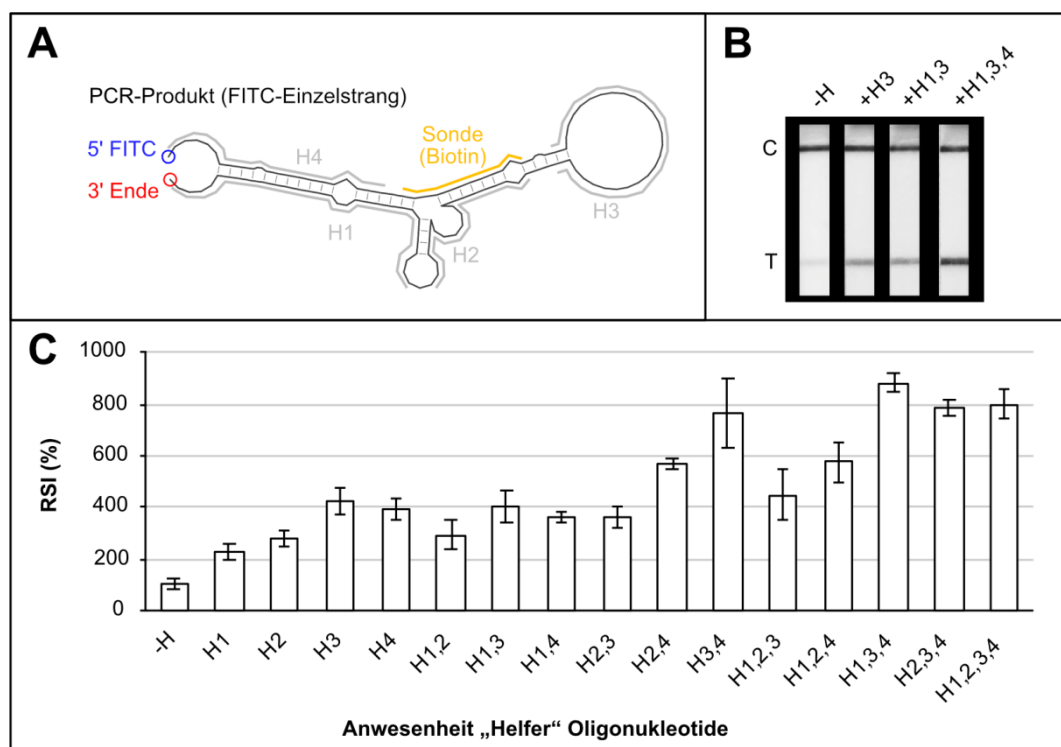


Abbildung 28 - Einfluss von Faltungshelfern auf die Hybridisierungseffizienz. **(A)** Potentielle Sekundärstruktur des nachzuweisenden Einzelstranges (Geneious R7, Algorithmus: DNA-Fold, Matthews *et al.* 2004 bei 20°C). **(B)** Repräsentative Teststreifen (MGHD) unter Verwendung unterschiedlicher Helfer. **(C)** Übersicht zum Einfluss aller möglicher Helfer-Kombinationen, als Referenz diente die Signalstärke des Hybridisierungsprodukts ohne Helfer (100%).

Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 28 C dargestellt. Tatsächlich lassen sich die positiven Effekte auf die Nachweisbarkeit der einzelnen Helfer aufsummieren, sodass eine Signalverstärkung um das etwa 8-fache gelingt (Helfer 3, 4 / Helfer 1, 3, 4 / Helfer 2, 3, 4 /Helfer 1, 2, 3, 4). Ohne die Verwendung von Helfern entsteht ein spezifisches Signal auf dem Teststreifen, das mit bloßem Auge erkennbar aber trotzdem sehr schwach, und somit schlecht zu interpretieren ist. Durch die Nutzung der Helfer kann aus einem schwer interpretierbarem Ergebnis ein eindeutig Interpretierbares werden (Abbildung 28 B). Der Einsatz von Faltungshelfern erwies sich in diesem Fall als der entscheidende Parameter zur Optimierung der Hybridisierungsreaktion.

Ein weiteres interessantes und praxisrelevantes Ergebnis, das aus der Abbildung 27 hervorgeht ist, dass sich das Hybridisierungsprotokoll deutlich verkürzen lässt. So scheint eine Denaturierung über 10 Sekunden vergleichbar effizient, wie Inkubation über mehrere Minuten bei einer Temperatur über 90°C. Darüber hinaus liefert die 1-minütige Hybridisierung bei 50°C vergleichbare Ergebnisse wie eine Hybridisierung über 20 Minuten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die post PCR-Hybridisierung auf etwa 1 Minute reduzieren lässt.

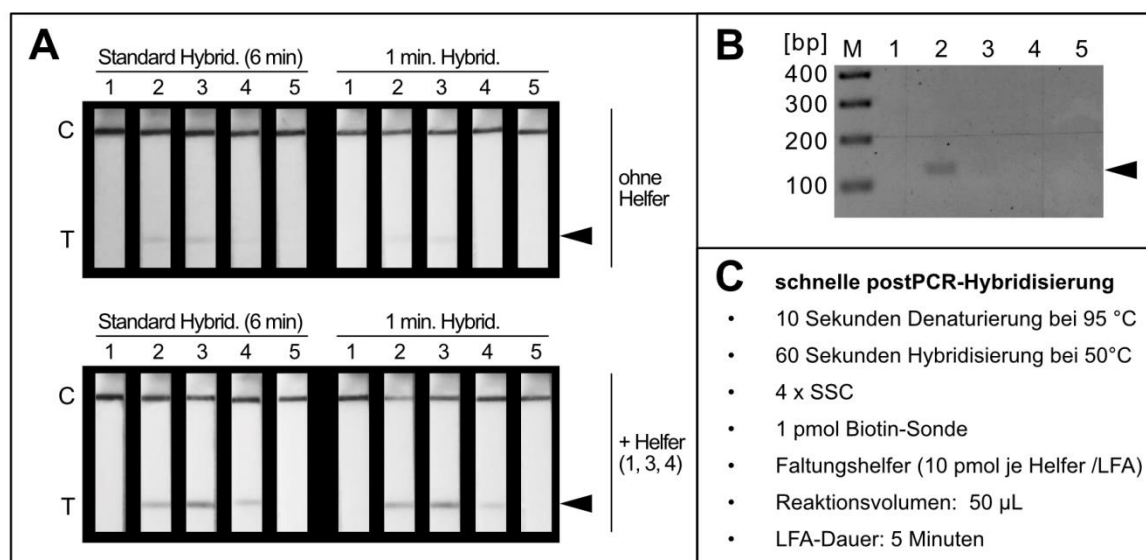


Abbildung 29 - Etablierung eines schnellen Hybridisierungsprotokolls nach Amplifikation (Nachweis *L. backi*). **(A)** Vergleich des bisherigen „Standard-Protokolls“ (6 min Hybridisierung und 5 min LFA) mit der etablierten schnellen Hybridisierungsreaktion (ca. 1 min Hybridisierung und 5 min LFA) in Abhängigkeit zur Anwesenheit von Faltungshelfern: (1) Negativkontrolle (ohne PCR-Produkt); (2) unverdünntes PCR-Produkt; (3) PCR-Produkt 1:10 verdünnt; (4) PCR-Produkt 1:100 verdünnt; (5) PCR-Produkt 1:1000 verdünnt. **(B)** Analyse unter A beschriebenen Proben 1-5 via AGE. Identische Volumina (5 µL je Probe) wurden verwendet. **(C)** Zusammenfassung relevanter Parameter der etablierten post PCR-Hybridisierung.

Die Ergebnisse der Abbildung 29 belegen, dass die schnelle post PCR-Hybridisierung mit Helfern deutlichere Resultate liefert, als die bisherige Standard-Hybridisierung (ca. 6 Minuten, ohne Helfer). Dabei kann über die Lateral Flow Analyse ein im Vergleich zur AGE sensitiverer Nachweis des PCR-Produktes erfolgen. Via AGE ist die 1:10 Verdünnung des PCR-Produkts sehr schwer erkennbar, wohingegen mittels post PCR-Hybridisierung und LFA die 1:100 Verdünnung des PCR-Produktes noch ein deutlich erkennbares Signal auf der T-Linie zu sehen ist (Abbildung 29 A und B). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Hybridisierungscocktails für die Nachweise der Organismen:

Lactobacillus backi (Lba), *Lactobacillus lindneri* (Lli), *Lactobacillus brevis* (Lbr), *Lactobacillus casei* (Lca), *Pediococcus damnosus* (Pda), *Lactobacillus (para-) collinoides* (Lpco) und *Lactobacillus rossiae* (Lro) hinsichtlich der Helfer-Zusammensetzung optimiert.

Alle anderen Parameter blieben entsprechend der Abbildung 29 C unverändert. Dass die Faltungshelfer einen deutlichen Einfluss auf die Nachweisbarkeit mit verschiedensten Sonden nehmen, belegen die Ergebnisse dieses umfangreichen Versuches, für die 336 Hybridisierungen via LFA durchgeführt und ausgewertet wurden (siehe Anhang, Tabelle 28). Für jede Speziesidentifikation gelang eine Verstärkung der Signalintensität durch die Zugabe von Faltungshelfern. Interessanterweise ließen sich in einigen Fällen die Nachweisbarkeit des FITC-markierten Stranges durch Hybridisierung einer biotinylierten Sonde über die Zugabe von Helfern verschlechtern. Diese Daten erlaubten jedoch keinen Vergleich der Signalstärken zwischen verschiedenen Nachweissystemen, weshalb in Abbildung 30 die absoluten Signalstärken der Testlinie Nachweis-übergreifend miteinander verglichen wurden. Gegenübergestellt ist stets die Hybridisierung ohne Helfer gegen die Hybridisierung mit Helfer, bei der das stärkste Signal detektiert wurde.

Die Abbildung 30 verdeutlicht, um welches Maß die Signalstärken durch den Einsatz definierter Helferkombinationen verstärkt werden können. Auffällig ist hierbei, dass einige Hybridisierungsreaktionen auch ohne Helfer vergleichsweise starke Signale hervorbringen. So ist bspw. das *L. rossiae* spezifische Signal ohne Helfer etwa 15-mal so stark wie das *L. backi* spezifische Signal. Das bedeutet auch, dass eine Signalverstärkung durch Helfer um 30% einem ähnlichen Absolutwert entsprechen kann, wie die 8-fache Signalverstärkung beim Nachweis des *L. backi* PCR-Produktes. Die Anwesenheit einer definierten Faltungshelfer-Kombination nimmt in jedem Nachweissystem einen positiven Einfluss, auch wenn die relative Signalverstärkung von Nachweis zu Nachweis sehr unterschiedlich ausfallen kann.

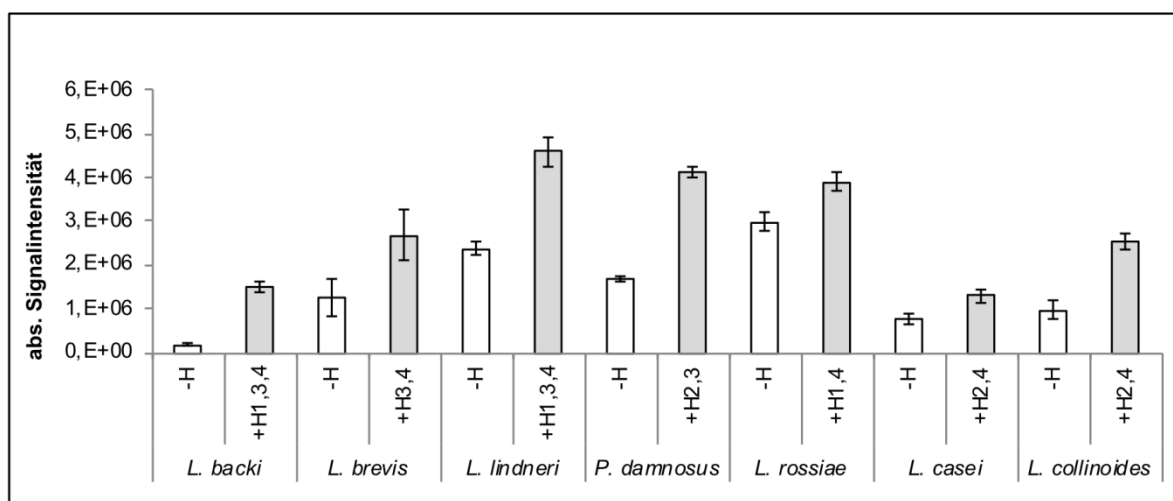


Abbildung 30 - Einfluss der Faltungshelfer auf die Signalstärke der T-Linie auf dem Teststreifen. Verglichen wurden die Absolutwerte aus den Quantifizierungen der T-Linien-Intensitäten. Jede Kombination (mit und ohne Helfer) wurde mindestens als Triplikat untersucht.

4.4.3. Eliminierung unerwünschter Hybridisierungsprodukte

In einem einfachen Test wurden die PCR-Produkte der sieben relevanten Bierschädiger mit allen möglichen Hybridisierungscocktails getestet und hinsichtlich ihrer Nachweisspezifität beurteilt (Abbildung 31 A). Dabei wurde deutlich, dass die post PCR-Hybridisierungen für den Nachweis von: *Lba*, *Lbr*, *Lca*, *Pda* und *Lro* im getesteten Umfang spezifisch den jeweiligen Zielorganismus identifizieren konnten. Die Hybridisierungen mit dem *L. linderi*- und *L. (para-) collinoides* - Hybridisierungscocktail wiesen den Zielorganismus sicher nach, zeigen aber zusätzlich Kreuzreaktivitäten mit dem Amplifikat anderer Organismen.

Gerade diese falsch positiven Ergebnisse sind innerhalb des Testsystems interessant und bieten die Möglichkeit Stellschrauben zu finden oder Werkzeuge zu etablieren, mit deren Hilfe sich die Spezifität einer einfachen post PCR-Hybridisierung manipulieren lässt. Im Sinne der Signalverstärkung der Testlinie spielen Faltungshelfer wie beschrieben eine sehr wichtige Rolle und können starke Effekte bewirken (Abschnitt 4.4.2.). Es ist durchaus denkbar, dass diese signalverstärkenden Faltungshelfer auch Einfluss auf die Spezifität einer Hybridisierung nehmen. So könnte bspw. die Spezifität herabgesetzt werden, indem Sondenbindestellen besser zugänglich gemacht werden. Im Umkehrschluss ist es auch denkbar, dass Helfer Sondenbindestellen maskieren. Durch diese Schlussfolgerungen wurde die Idee der Spezifitäts-Helfer geboren. Hierbei wurde versucht durch den Einsatz definierter unmarkierter Oligonukleotide Sondenbindestellen in Nicht-Ziel-Organismen gezielt zu maskieren oder blockieren, sodass die unerwünschte Kreuzreaktivität weitestgehend unterdrückt wird. In der Abbildung 31 sind repräsentative Ergebnisse zu diesem experimentellen Ansatz dargestellt.

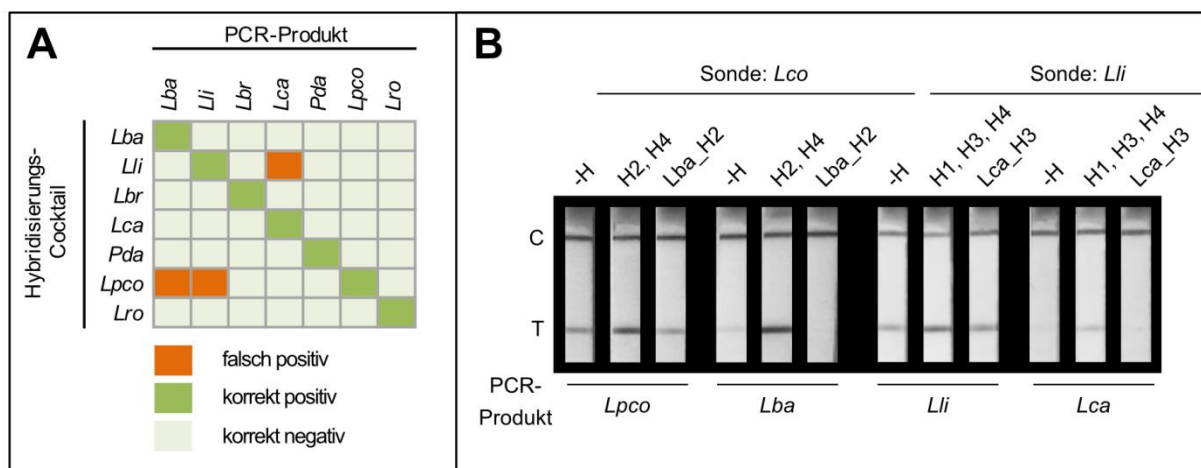


Abbildung 31 - Spezifität der post PCR-Hybridisierung und Eliminierung von Unspezifitäten durch Helfer. **(A)** Die sieben Identifikationstests wurden je mit sieben spezies-spezifischen PCR-Produkten hinsichtlich der Hybridisierungsspezifität untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Form einer *heatmap* dargestellt. **(B)** Eliminierung unspezifischer Hybridisierungsprodukte unter Zuhilfenahme von Spezifitätshelfern.

So zeigt zum Beispiel der Hybridisierungsmix zur Identifikation von *L. (para-) collinoides* eine starke Kreuzreaktivität mit dem PCR-Produkt von *L. backi* (Abbildung 31 A). Dabei wird deutlich, dass die

L. (para-) collinoides spezifischen Helfer auch die Nachweisbarkeit des *Lba*-Fragmentes verbessern (Abbildung 31 B). Nutzt man den *Lba*-spezifischen Helfer 2, der im Bereich der *Lpco*-Sondenbindestelle hybridisiert, so kann die beschriebene Unspezifität vollständig eliminiert werden. Auch der *L. lindneri*-Nachweis liefert eine deutliche Kreuzreaktivität. In diesem Fall hybridisiert die *Lli*-Sonde auch das *L. paracasei*-PCR-Produkt. Interessanterweise lässt sich diese Unspezifität auf zwei Wegen eliminieren. Analog zum vorher beschriebenen Beispiel führt die Nutzung des *Lca*-spezifischen Helfers zur Maskierung der Bindestelle zu einer vollständigen Eliminierung der Unspezifität (Abbildung 31 B). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Nutzung der *Lli*-spezifischen Faltungshelfer 1, 3 und 4 diese Unspezifität überhaupt ermöglichen (Abbildung 31 B). Durch Nutzung eines Hybridisierungscocktails zum Nachweis von *Lli* ohne Faltungshelfer, konnte ebenfalls die Kreuzreaktivität mit dem *Lca*-PCR-Produkt fast vollständig unterbunden werden (Abbildung 31 B).

Zusätzlich zu den Helfern wurde versucht, weitere Stellschrauben zu identifizieren, die Einfluss auf die Spezifität einer post PCR-Hybridisierung nehmen können. Ein einfacher und naheliegender Ansatz war die Nutzung unterschiedlicher Hybridisierungstemperaturen. Um den Einfluss der Temperatur auf die Spezifität zu überprüfen, wurde erneut das *L. lindneri*-Hybridisierungssystem mit der Unspezifität gegenüber dem *Lca*-PCR-Produkt genutzt (Abbildung 31 B). Die Hybridisierungstemperaturen wurden von 50°C bis auf 65°C sukzessiv gesteigert. Bei einer Temperatur von 65°C funktionierte der Test spezifisch für das *Lli*-PCR-Produkt. Die Unspezifität zum *Lca*-PCR-Produkt konnte eliminiert werden (Abbildung 32).

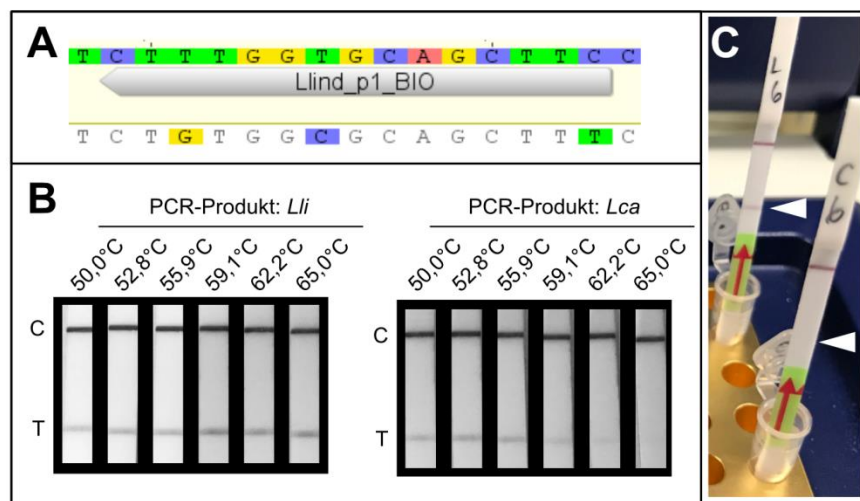


Abbildung 32 - Eliminierung unspezifischer Hybridisierungsprodukte durch Temperatur. **(A)** Sequenzvergleich im Bereich der Sondenbindestelle (grauer Pfeil) zwischen dem Zielorganismus (*Lactobacillus lindneri*, Sequenz oben, bunt) und kreuzreagierenden Organismus (*Lactobacillus paracasei*, untere Sequenz). Drei mismatches (bunt hinterlegte Basen in der unteren Sequenz) liegen im Bereich der Sondenbindestelle vor. **(B)** Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Nachweis-Spezifität (Anwesenheit Helfer: Uni_H4.1). **(C)** Foto von den beiden Streifen bei 65°C Hybridisierungstemperatur nach genau 5 min LFA. [L6, Streifen hinten] PCR-Produkt: *Lli*, [C6, Streifen vorn] PCR-Produkt: *Lca*.

Wenn verschiedene Hybridisierungsreaktionen zur gleichen Zeit ablaufen sollen, ist es problematisch, wenn verschiedene Hybridisierungsprotokolle erforderlich sind. Dadurch wird der Ablauf

verkompliziert und die Analysedauer verlängert sich. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Parameter gesucht, mit dessen Hilfe sich eine post PCR-Hybridisierung hinsichtlich der Nachweis-Spezifität modifizieren lässt, ohne das Temperaturprotokoll oder die Sondensequenzen zu ändern. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Dimethylsulfoxid (DMSO), welches bereits als PCR-Additiv häufig genutzt wird, genauer untersucht. Um den Einfluss von DMSO zu überprüfen, wurde erneut das *L. lindneri*-Hybridisierungssystem mit der Unspezifität gegenüber dem *Lca*-PCR-Produkt verwendet. Die Zugabe von DMSO führte zu einer deutlichen Abschwächung der Nachweisbarkeit beider untersuchter PCR-Produkte (Abbildung 33).

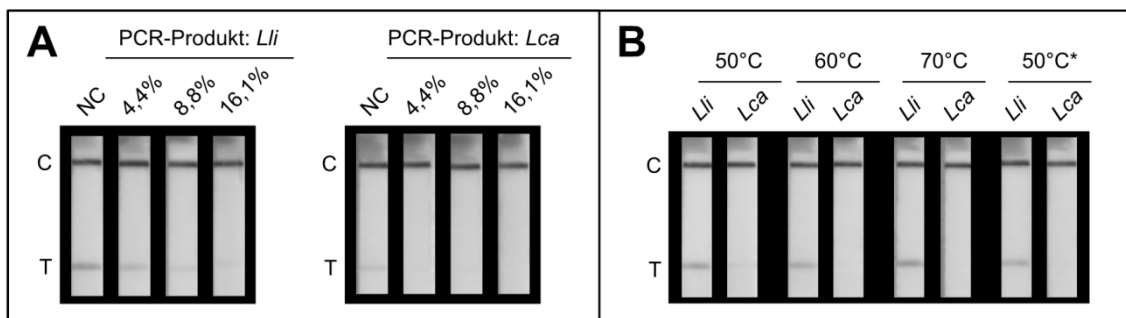


Abbildung 33 - Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungsprodukte durch Zusatz von DMSO. **(A)** Einfluss der DMSO-Konzentration auf die Hybridisierung (Hybridisierungstemperatur: 50°C, Anwesenheit Helfer: Uni_H4.1). [NC] Negativkontrolle ohne DMSO. **(B)** Nutzung von DMSO in Kombination mit einem alternativen Faltungshelfer (Lli_H3). Die PCR-Produkte von *L. lindneri* (Lli) und *L. (para-) casei* (Lca) wurden unter verschiedenen Bedingungen hybridisiert (50, 60 und 70°C). Die Untersuchung bei 50°C* erfolgte bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C, wobei dem Hybridisierungscocktail 3,8% DMSO zugefügt wurden.

Kombiniert man den Einfluss des DMSO mit der Wahl des richtigen Faltungshelfers, so können Unspezifitäten effizient unterdrückt werden. Das ist in der Abbildung 33 B verdeutlicht. Unter Zuhilfenahme des Faltungshelfers *Lli* H3 kann durch den Zusatz von 3,8% DMSO bei einer unveränderten Annealingtemperatur von 50°C die Unspezifität zum *Lca*-PCR-Produkt vollständig eliminiert werden.

In einem Versuch mit 24 Praxisproben aus verschiedenen Brauereien wurde das entwickelte Testsystem orientierend hinsichtlich der Funktionalität und Praxis-Kompatibilität untersucht (Anhang Tabelle 29). Dabei wurden die Proben angereichert, auf NBB-Agarplatten vereinzelt und analysiert. Alle 24 Proben wurden durch PCR und anschließende Sequenzierung identifiziert. Vergleichend wurden die Proben mit der etablierten PCR-Hybridisierungs-Methode charakterisiert. In 21/24 Proben waren *Lactobacillus* spp. identifizierbar. 20 dieser 21 Proben wurden übereinstimmend identifiziert. Eine Probe (laut Sequenzierung: *L. backi*) wurde falsch negativ bestimmt. Unter den nachgewiesenen Organismen befand sich 9 mal *Lactobacillus paracasei*, 6 mal *Lactobacillus brevis*, 2 mal *Lactobacillus rossiae* und 3 mal *Lactobacillus backi*. Eine deutliche und irritierende Kreuzreaktivität des *Lli*-Hybridisierungscocktails mit den *L. paracasei*-Amplifikaten fiel dabei negativ auf, was eine weiterführende Optimierung unumgänglich macht.

4.5. post PCR-Hybridisierung - Entwicklung praxisnaher Tests

Das Werkzeug einer schnellen, einfachen Hybridisierungsmethode nach einer Amplifikationsreaktion ermöglicht potenziell die Erarbeitung spezieller Nachweise, die sehr empfindlich sind und dabei trotzdem spezifisch funktionieren. Gerade die Detektion viraler Pathogene zeichnet sich u.U. durch dieses beschriebene Anforderungsprofil aus (Myhrvold *et al.*, 2018). Aus diesem Grund widmen sich die folgenden Abschnitte dem Nachweis von DNA-Viren, die Karpfen befallen können und dort Krankheiten verursachen, die mit hohen Sterblichkeitsraten innerhalb einer Population einhergehen.

4.5.1. Das Anforderungsprofil offenbart methodische Limitation – der Nachweis viraler Karpfenpathogene

Der sichere Nachweis viraler Fischpathogene wie dem Carp Edema Virus (CEV) und Koi-Herpesvirus (KHV) ist aus methodischer Sicht sehr herausfordernd, da mit hoher Sensitivität, sichere Befunde generiert werden müssen (Soliman *et al.*, 2018 / Myhrvold *et al.*, 2018). Da auch in diesem Nachweis-Kontext die *Point-of-Care*-Tauglichkeit eine entscheidende Rolle spielt, soll eine interne Amplifikationskontrolle Teil des Nachweissystems sein. Als Probenmatrix dient Material aus einem Kiemenabstrich, welches in die DNA-Amplifikationsreaktion eingebracht wird. Um aufwändige Probenvorbereitungsschritte zu vermeiden, soll möglichst direkt analysiert werden. Dieser Umstand unterstreicht die Wichtigkeit einer IAC zur Überprüfung der Funktionalität der Amplifikation. Die Geschwindigkeit des Nachweises wurde zunächst als sekundär eingestuft, sollte aber im Optimalfall 120 min nicht überschreiten. Die Tabelle 13 zeigt verschiedene Nachweisstrategien für die Detektion von CEV.

Tabelle 13 - Verschiedene Nachweisstrategien zur Detektion des Carp Edema Virus (CEV). Sensitivitätsanalyse mit Hilfe vier verschiedener Detektionsstrategien. [pos.] steht für eindeutig positives Resultat, [neg.] steht für negatives Resultat, [(pos)] steht für ein schwach positives Ergebnis.

PCR-Variante	Information (LFD)	NTC	Kopien je Reaktion (<i>template</i>)					
			1,75*10 ⁸	1,75*10 ⁴	1,75*10 ³	1,75*10 ²	1,75*10 ¹	1,75*10 ⁰
singleplex PCR	IAC [T2]	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	CEV [T1]	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	(pos.)	neg
duplex PCR	IAC [T2]	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
	CEV [T1]	neg	pos.	pos.	pos.	neg.	neg	neg
nested duplex PCR	IAC [T2]	pos.	(pos.)	(pos.)	(pos.)	(pos.)	(pos.)	pos.
	CEV [T1]	neg	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg
one pot semi nested duplex PCR	IAC [T2]	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
	CEV [T1]	neg	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg

Dabei wurde zunächst verstärkt der Fokus auf die Sensitivität der jeweiligen Nachweismethodik gelegt. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Limitationen, die mit der bisher häufig genutzten *duplex*-PCR einhergehen. Im *singleplex* PCR Ansatz funktioniert der Nachweis schon sehr sensitiv und es gelingt etwa 2*10¹ Kopien der Zielsequenz nachzuweisen. Die Implementierung der IAC führt zu

einem Sensitivitätsverlust um den Faktor 10 bis 100. In einem nested PCR Ansatz werden in der ersten PCR IAC-Fragment (markierte Primer) und ein größeres CEV-Fragment (Primer ohne Label) amplifiziert. In einer zweiten PCR dient das Produkt aus PCR 1 als *template*. Mit markierten CEV-Primern wird ein auf dem LFD nachweisbares Amplifikat vervielfältigt. Diese recht aufwändige Strategie liefert ein klar interpretierbares Ergebnis mit sehr guter Sensitivität. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die sogenannte *one pot* semi nested PCR entwickelt. Hier werden für den CEV-Nachweis drei Primer verwendet und das PCR-Protokoll untergliedert sich in zwei Abschnitte, die in ein und demselben Reaktionsgefäß ablaufen. Der erste Teil der PCR findet bei hoher Annealingtemperatur statt. Hier binden vorrangig die IAC-Primer und auch CEV-Nachweisprimer, wobei nur einer der beiden Oligos in markierter Form vorliegt. Das entstehende CEV-Amplifikat ist in dieser Form nicht für das LFD detektierbar. Im zweiten Teil der PCR wird die Annealingtemperatur verringert, sodass zusätzlich ein kurzer CEV-spezifischer Primer (markiert) zur Amplifikation eines dual-markierten CEV-PCR-Produktes beiträgt. Durch diese Strategie konnte die Zyklenzahl massiv gesteigert werden, ohne dass auf dem Teststreifen nachweisbare Unspezifitäten auftauchten. Folglich wurde geschlussfolgert, dass die *one pot* semi nested PCR genauer charakterisiert werden sollte.

Somit wurde die *one pot* semi nested PCR im Friedrich-Löffler-Institut für eine orientierende Spezifitätsanalyse herangezogen. Getestet wurden einige CEV-positive Proben, sowie CEV-negative Proben, aber auch nicht-CEV Isolate. Dabei wurden wiederholend Ergebnisse erzeugt, die eine mangelhafte Spezifität offenbarten. CEV-negative Proben und auch nicht-CEV-Virus Proben lieferten durchgängig falsch-positive Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde in der weiteren Assay-Entwicklung zum Nachweis viraler Karpfenpathogene die Amplifikation mit nachfolgender Hybridisierung methodisch präferiert.

4.5.2. Der Nachweis von Cyprinid Herpesvirus-3 (CyHV-3) / Koi-Herpesvirus (KHV)

Im Falle einer Infektion mit dem hochansteckenden Koi-Herpesvirus, kann es durch Krankheitsausbruch zu massiven Verlusten innerhalb einer Fischpopulation kommen (Baumer *et al.*, 2013 / Perelberg *et al.*, 2003). Die *Koi Herpesvirus disease* (KHVD) ist meldepflichtig, zeichnet sich durch hohe Mortalitätsraten aus und ist deshalb auch unter Züchtern von Kois sehr gefürchtet. In veterinärmedizinischen Laboratorien werden Proben auf die Anwesenheit von KHV präferiert via PCR untersucht (Soliman *et al.*, 2018). Diese gut charakterisierten und erprobten Nachweissysteme sind u.a. Teil der amtlichen Methodensammlung des Friedrich-Löffler-Instituts. Aus diesem Grund wurde versucht ein Nachweissystem zu entwickeln, welches einem der amtlichen Methodensammlung weitestgehend entspricht. Als Referenz wurde der qPCR-basierte Nachweis nach Gilad *et al.* (2004) herangezogen. In diesem Nachweis werden zwei KHV-spezifische Primer sowie eine KHV-spezifische Taqman-Sonde genutzt. Darüber hinaus wurde zusätzlich eine interne *multiplex*-fähige Amplifikationskontrolle erarbeitet und in das Nachweissystem integriert.

4.5.2.1. Primer-/ Sonden-Design und Nutzung einer alternativen IAC für den Nachweis von KHV

Bei der Etablierung des PCR-LFA-Tests wurden KHV-spezifische Oligonukleotidsequenzen entsprechend der Veröffentlichung von Gilad *et al.* (2004) übernommen. Der *reverse* Primer KHV163r wurde am 5'-Ende mit einem FITC-Label markiert, der *forward* Primer blieb unverändert. Die Sonde KHV109p wurde als komplementäre Sequenz genutzt und am 5'Ende mit einem Biotin-Label markiert. Die etablierte Methode der post PCR-Hybridisierung sollte im Rahmen dieser Assay-Entwicklung genutzt werden.

Im Falle der Taqman-basierten qPCR wurde eine zweite Primer-/Sonden-Kombination in das Nachweissystem implementiert, welches als Extraktions- und Amplifikationskontrolle fungiert. Dabei entsteht ein 69 bp großes Amplifikat, das auf ein *single-copy, house-keeping* Gen des Karpfens zurückgeht. Im Falle des PCR-LFAs soll perspektivisch auf eine Extraktionsmethode verzichtet und Probenmaterial so direkt und konzentriert wie möglich verwendet werden. Aus diesem Grund wurde eine alternative IAC genutzt für den Nachweis von KHV, die als Amplifikationskontrolle die Funktionalität der Reaktion anzeigt. Das Nachweisprinzip ist in Abbildung 31 A verdeutlicht.

Tabelle 14 - Übersicht der Primer- und Sonden-Sequenzen inklusive enthaltener Modifikationen für den Nachweis von CyHV-3. (°) Reporter-Farbstoff: FAM, (°) Quencher-Farbstoff: TAMRA, (°) FITC, (°) Biotin, (°) Digoxigenin.

Gilad <i>et al.</i> 2004		Loose u. Breitbach <i>et al.</i> , 2020	
Name	Sequenz (5' - 3')	Name	Sequenz (5' - 3')
KHV86f	GACGCCGGAGACCTTG TG	KHV-86f	GACGCCGGAGACCTTG TG
KHV163r	CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTT	KHV-163r-FITC	°CGTGCTCGCCGAGCAGAGGAAG
KHV109p	°CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG°	KHV-109p (rc)-Biotin	°CGGGTTCTTATTTTGTCTTGTT
CgGluc-162f	ACTGCGAGTGAGACACATGAT	147f-DIG	°GCGATCCATGGACGCATACC
CgGluc-230r	TCAGGTGTGGAGCGGACAT	412r-FITC	°CATCGCTTTCATCGCTGCTCC
CgGluc-185p	AAGCCAGTGTCAAAATGCTGCCCACT	IAC-Sonde	-
template	-	template	IAC-Fragment 1*

4.5.2.2. KHV-Nachweis: Nachweisprinzip und Testperformance

Aus vorangegangenen Analysen war bekannt, dass insbesondere nicht-markierte Faltungshelfer einen erheblichen Einfluss auf die Nachweisbarkeit des PCR-/ Hybridisierungsproduktes via LFA nehmen können (Abschnitt 4.4). Deshalb wurden für den Nachweis von KHV ebenfalls Helfer-Oligonukleotide abgeleitet und getestet. Das KHV-spezifische Amplifikat ist mit 78 bp recht kurz. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von lediglich zwei möglichen Helfern genauer beleuchtet (Abbildung 34 C). In Anwesenheit des Faltungshelfers 2 kann die Intensität des KHV-Signals auf dem Teststreifen deutlich verstärkt werden. Die Signalstärke wird dabei im Vergleich zum Nachweis des Hybridisierungsproduktes in Abwesenheit eines Helfers um den Faktor 2,5 verstärkt. Auch andere Hybridisierungsparameter (Ionenstärke, Sondenkonzentration, Denaturierungsdauer, Hybridisierungs- und Auswertetemperatur, etc.) wurden untersucht. Die Ergebnisse dieser Optimierungsversuche

decken sich mit den Ergebnissen vorangegangener Analysen und können dem Anhang entnommen werden (Anhang, Abbildung 75).

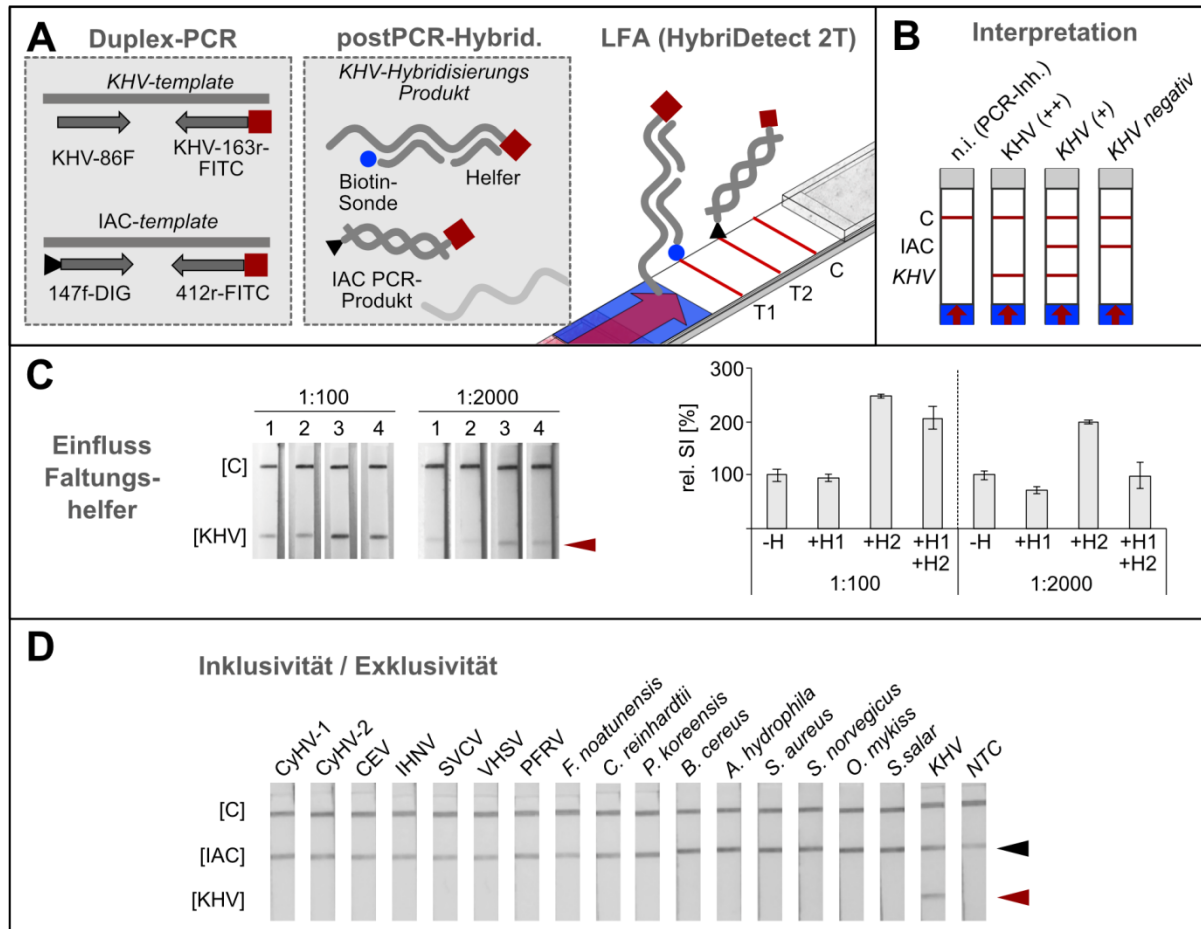


Abbildung 34 - Nachweisprinzip und Testperformance des KHV-PCR-LFAs. **(A)** Das Nachweisprinzip: In der *duplex*-PCR wird das beidseitig markierte IAC-Fragment und in Anwesenheit des KHV-templates das FITC-markierte KHV-PCR-Produkt amplifiziert. In einer post PCR-Hybridisierung wird der FITC-markierte Strang des KHV-PCR-Produkts durch die Amplifikat-spezifische Sonde unter Mitwirkung eines Faltungshelfers hybridisiert. Das IAC-PCR-Produkt und das KHV-Hybridisierungs-Produkt sind dann via LFA detektierbar. **(B)** Interpretation der Teststreifen: Die Anwesenheit der T1-Linie repräsentiert ein KHV-positives Ergebnis. Bleibt das KHV-spezifische Signal aus, entscheidet die Anwesenheit des IAC-spezifischen Signals über die Validität der Analyse. Ist die T2-Linie deutlich zu erkennen, handelt es sich um einen KHV-negativen Test. Bleibt die T2-Linie aus, ist der Test nicht interpretierbar. **(C)** Einfluss der Faltungshelfer: Die Hybridisierungseffizienz wurde unter Zugabe zweier Faltungshelfer untersucht. Verwendet wurden 2 Verdünnungsstufen des KHV-PCR-Produktes (1:100 und 1:2000). Dargestellt sind repräsentative Streifenbilder (1-4 entspricht der Reihenfolge der Beschriftung im Säulendiagramm), sowie die Quantifizierung der relativen Intensität der T-Linie in Abhängigkeit zur An-/Abwesenheit der Faltungshelfer (H1 und H2) in Form eines Säulendiagramms. **(D)** Analyse zur Spezifität: Dabei wurden 16 relevante nicht-KHV-Spezies, sowie eine KHV Positivkontrolle für die Analyse herangezogen.

Ein wichtiger Faktor hinsichtlich der Nutzbarkeit des Testsystems in der Praxis ist die Sensitivität des Nachweises (Soliman *et al.*, 2018 / Myhrvold *et al.*, 2018). Aus diesem Grund wurde die untere Nachweisgrenze experimentell ermittelt. Dafür wurden neun verschiedene Konzentrationen zwischen 600 – 0,06 Kopien / μL in je 5 Replikaten untersucht. Anhand der generierten Ergebnisse ließ sich eine Regressionsanalyse durchführen und auf dieser Basis der $\text{LOD}_{0,95}$ -Wert berechnen (*limit of detection*, 95%). Im Falle des KHV-Nachweises liegt dieser Wert bei etwa 9 Kopien je μL .

CyHV-3 möglichst sensitiv nachweisen zu können, ist wichtig, aber nur eine Facette der erforderlichen Nachweis-*Performance*. Ein ebenso bedeutsamer Parameter ist die Spezifität der Analyse. Kreuzreaktivität mit anderen Fischviren, relevanten Bakterien oder anderen Lebewesen des gleichen Ökosystems sollten nicht vorkommen, um falsch-positive Resultate ausschließen zu können. Deshalb wurden in einer umfassenden Exklusivitätsanalyse 16 relevante nicht-KHV Spezies einbezogen. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der Test spezifisch funktioniert. Es konnten keine falsch-positiven Resultate beobachtet werden, was ein starker Indikator für die Tauglichkeit des Nachweissystems in der Praxis ist.

Im Folgenden wurde der Nachweis in einer umfangreichen Vergleichsuntersuchung genauer charakterisiert. Als Referenzmethode wurde die quantitative RT-PCR nach Gilad *et al.* (2004), modifiziert nach Gaede *et al.* (2017) genutzt. Dieses Testsystem wird in dieser Form für KHV-Diagnostik verwendet und entspricht den Richtlinien der amtlichen Methodensammlung für den Nachweis des Koi-Herpesvirus vom FLI. Im Rahmen dieser Vergleichsanalyse wurden insgesamt 120 Proben untersucht. Das Probenstet untergliedert sich in verschiedene Probentypen. Zum einen wurde isolierte DNA aus den Geweben Kieme und Niere genutzt. Zum anderen wurden je Organ fünf DNA-Proben von je fünf Fischen mit dem Vorab-Befund: „KHV-negativ“, „KHV-schwach positiv“, „KHV-positiv“ und „KHV-hoch positiv“ für die Analyse herangezogen. Jede Probe wurde als Triplikat getestet, wodurch sich 120 Analysen je Testmethode ergeben. „Schwach positive“ Proben entsprechen in etwa $1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^3$ Kopien / μL , „positive“ Proben entsprechen in etwa $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^5$ Kopien / μL und „hoch positive“ entsprechen mehr als $1 \cdot 10^6$ Kopien / μL . In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse der beschriebenen Tests zusammengefasst.

Tabelle 15 - Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung zum Nachweis von KHV mittels qRT-PCR und PCR-LFA. Es handelt sich um ein vorab charakterisiertes Probenstet, welches via qRT-PCR vor der Lagerung untersucht wurde. Dargestellt sind übereinstimmende Befunde zwischen Vorabanalyse und der aktuellen Nachweismethode.

untersuchtes Organ	Ergebnis Voranalyse	übereinstimmende Befunde	
		PCR-LFA	qRT-PCR
Kieme	negativ	15/15	14/15
	schwach positiv	13/15	14/15
	positiv	15/15	15/15
	hoch positiv	15/15	15/15
Niere	negativ	14/15	15/15
	schwach positiv	12/15	14/15
	positiv	15/15	15/15
	hoch positiv	15/15	15/15
Kieme & Niere	gesamt	114/120	117/120

Die durchgeführte Vergleichsuntersuchung zeigte, dass die erfolgreiche Erkennung von Proben mit „mittleren“ und „hohen“ KHV-DNA-Konzentrationen in beiden Testsystemen sicher funktionierte. In diesen Bereichen waren keinerlei Abweichungen detektierbar. Im Bereich der „schwach positiven“ Proben gab es erkennbare Abweichungen. Insgesamt lieferte die qRT-PCR zwei falsch-negative Befunde, wohingegen durch die PCR-LFA-Methode fünf falsch-negative Befunde erzeugt wurden. Zurückzuführen sind die Abweichungen auf zwei zu analysierende Proben (UI-36-Ki und IB-57-Ni). Mittels qRT-PCR wurde jede dieser beiden Proben in zwei von drei Fällen als KHV-positiv definiert mit C_t -Werten $> 38,0$. Das entspricht rechnerisch einer Konzentration der Zielsequenz von weniger als 10 Kopien / μL und liegt somit im Bereich der unteren Nachweisgrenze der PCR-LFA-Methode.

Über beide Nachweismethoden wurden 29/30 Proben als korrekt-negativ identifiziert. Je eine Analyse erbrachte ein falsch positives Ergebnis. In der Summe funktionieren beide Nachweismethoden vergleichbar und erbringen weitestgehend übereinstimmende Resultate. Die qRT-PCR funktioniert etwas sensitiver ($\text{LOD}_{0,95}$ ca. 6 Kopien / μL), was sich in Testungen mit schwach-positiven Proben widerspiegelte.

Die Ergebnisse zum KHV-Nachweis belegen, dass mit Hilfe eines *Point-of-Care*-tauglichen Testformats wie der hier präsentierten PCR-LFA eine Nachweis-*Performance* erzielt werden kann, die etablierten Labormethoden gleicht. Der entwickelte KHV-Nachweis ist in der Lage mit einer sehr guten Spezifität und einer Nachweis-Sensitivität von weniger als 10 Kopien je μL das Koi-Herpesvirus sicher zu erkennen. Aus methodischer Sicht beweist dieser Nachweis die praktische Bedeutung der entwickelten post PCR-Hybridisierung. Mit Hilfe dieses methodischen Werkzeugs gelingt es Nachweisempfindlichkeit zu steigern, ohne dabei Genauigkeit einzubüßen.

4.5.3. Der Nachweis des Carp Edema Virus

Bei Carp Edema Virus (CEV) handelt es sich ebenfalls um dsDNA-Virus. CEV gilt als Verursacher der Koi-Schlafkrankheit (*Koi sleepy disease*, KSD), wobei KSD-assoziierte Symptome dem KHVD charakteristischen Krankheitsbild (Apathie, Hautveränderungen und Kiemennekrose) ähnelt (Jung-Schroers *et al.*, 2015). Ein CEV-assoziiierter Krankheitsausbruch kann in einem Bestand ebenfalls hohe Mortalitäten von über 80% auslösen (Way *et al.*, 2017 / Adamek *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu KHVD ist KSD in Deutschland weder anzeige-, noch meldepflichtig. Trotzdem ist auch hier die molekularbiologische Diagnostik das entscheidende Hilfsmittel für einen eindeutigen tierärztlichen Befund (Matras *et al.*, 2017 / Adamek *et al.*, 2017). Gerade die Differential-Diagnostik von KHV und CEV ist aufgrund der sehr ähnlichen Symptomatik interessant und sinnvoll (Soliman *et al.*, 2018). Das Anforderungsprofil an einen etwaigen CEV-Nachweis gleicht folglich dem für den Nachweis von KHV (Abschnitt 4.5.1.).

4.5.3.1. Erweiterung der NALFIA-toolbox, und trotzdem kein funktioneller Test

Es kann an dieser Stelle vorweggenommen werden, dass es nicht gelang, einen funktionellen CEV-Nachweis zu etablieren. Nichts desto trotz beinhaltet die Entwicklungshistorie des CEV-Tests wichtige Punkte, die im Kontext dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis und zur Erweiterung der NALFIA-toolbox leisten. Die Entwicklungsarbeiten des CEV-Nachweises sind von ständigen Anpassungen, Verbesserungen und das Umgehen LFA-charakteristischer Limitationen geprägt.

Bereits die Tabelle 13 verdeutlicht, dass verschiedenste Markierungsstrategien getestet wurden, um einen Nachweis des Carp Edema Virus zu gewährleisten. Dabei stellte sich die *one-pot* semi nested PCR als eine vielversprechende Variante für das beschriebene Anforderungsprofil des Tests heraus. In externen Versuchen am Friedrich-Loeffler-Institut zeigte sich, dass dieser Ansatz nicht ausreichend spezifisch funktionierte. Analog zum KHV-Nachweis wurde deshalb versucht eine Amplifikationsreaktion mit folgender post PCR-Hybridisierung zu etablieren.

4.5.3.2. CEV-Nachweis: Untersuchungen zur post PCR-Hybridisierung

Über die Etablierung einer funktionellen post PCR-Hybridisierung für den CEV-Nachweis sollten zusätzlich grundlegende Fragen zu diesem Detektionsverfahren beantwortet werden. Diese Fragen betreffen die Positionierung einer Amplifikat-spezifischen Sonde, der Einfluss der Länge des Amplifikationsproduktes und den Einfluss eines erhöhten Anteils einzelsträngigen Amplifikats.

Hierfür wurden vier unterschiedlich große CEV-spezifische Fragmente erzeugt und durch AGE und Sequenzierung bestätigt. Diese PCR-Produkte wurden nicht nur symmetrisch, sondern auch asymmetrisch amplifiziert und mit zwei unterschiedlichen Amplifikat-spezifischen Sonden hybridisiert. Unter einer symmetrischen PCR versteht man den Einsatz möglichst gleicher Mengen an *forward*- und *reverse*-Primer, wodurch vorrangig doppelsträngiges PCR-Produkt gebildet wird. Die asymmetrische PCR wird hingegen als Amplifikationsreaktion verstanden, bei der die Stoffmenge des FITC-markierten Nachweisprimers, die des dazugehörigen unmarkierten Primers deutlich übersteigt, wodurch die Menge an entstehendem FITC-markiertem, einzelsträngigem PCR-Produkt zunehmen sollte. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass mit Hilfe der Sonde CEV probe 2 durchgehend stärkere Signale auf der Testlinie generiert wurden als mit der Vergleichssonde CEV probe 1, wobei keine klare Korrelation zur Länge des zu hybridisierenden Produktes auszumachen war. Weiterhin zeichnete sich die Tendenz ab, dass Produkte aus der asymmetrischen PCR zu einer verbesserten Darstellung der PCR-Produkte auf dem Teststreifen beitrugen. Die hier beschriebenen, abgeleiteten Ergebnisse lassen der Abbildung 35 entnehmen. Auch am Beispiel des CEV-Nachweises sollte der Einfluss der Faltungshelfer untersucht werden. Hierfür wurde das PCR-Produkt A (asymmetrisch) und B (asymmetrisch) in Kombination mit der Sonde 2 (CEV probe 2) genutzt.

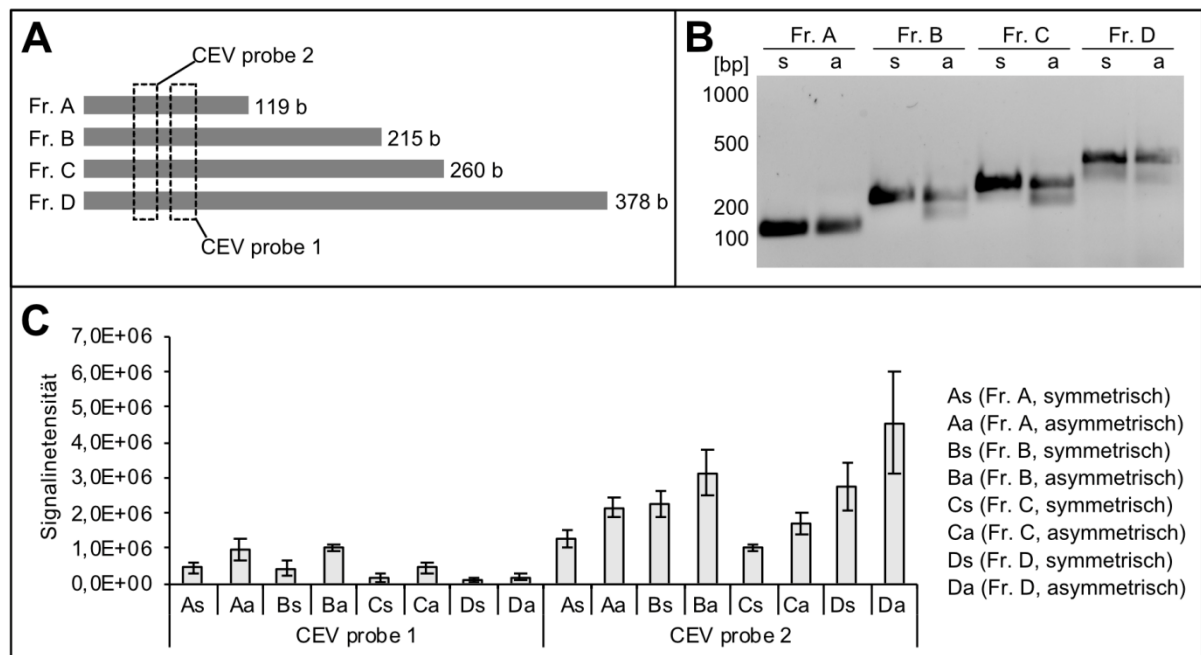


Abbildung 35 – Einfluss der Sondenpositionierung, Symmetrie und Asymmetrie der PCR. **(A)** Übersicht der vier unterschiedlich großen zu hybridisierenden Fragmente (ssDNA), sowie der dazugehörigen Sondenbindestellen von CEV probe 1 und 2. **(B)** AGE der aufgereinigten Fragmente A bis D aus symmetrischer PCR („s“) und asymmetrischer PCR („a“). **(C)** Vergleich der absoluten Signalintensitäten der Testlinie nach LFA der Hybridisierungsprodukte, die sich aus den gereinigten Fragmenten A bis D, sowie den beiden Sonden CEV probe 1 und CEV probe 2 zusammensetzen. Diese Resultate liegen einer Dreifachbestimmung zugrunde.

Aus der Abbildung 35 geht hervor, dass diese Kombination ohne die Nutzung von Faltungshelfern schwache Signale auf dem Teststreifen ermöglicht. Ziel der Untersuchung war es, durch die Nutzung von Faltungshelfern die Nachweisbarkeit dieser Fragmente mit der Sonde 2 deutlich zu verbessern. Deshalb wurden für das kurze Fragment A sieben verschiedene Helferkombinationen und für das längere Fragment B, 31 Helferkombinationen mit der Hybridisierungskontrolle (ohne Helfer) verglichen. Aus diesen 31 Helferkombinationen für die Hybridisierung der Sonde 2 wurden die acht Vielversprechendsten vorselektiert (Anhang, Abbildung 83) und in Mehrfachbestimmung genauer charakterisiert. Aus der Abbildung 36 gehen die Kernergebnisse dieser Versuchsreihe hervor. Dabei zeigt sich erneut, dass bestimmte Faltungshelferkombinationen einen deutlich positiven Effekt auf die Nachweisbarkeit eines Hybridisierungsproduktes nehmen. So lässt sich bspw. unter der Verwendung des Helfers 2 die Signalstärke auf dem Teststreifen für das Produkt A in etwa verdreifachen. Unter Zuhilfenahme der Helferkombination 3.6, bei der drei verschiedene Helfer kombiniert werden, kann die Signalstärke auf dem Teststreifen in etwa um den Faktor 5-6 intensiviert werden (Abbildung 36 und Abbildung 83).

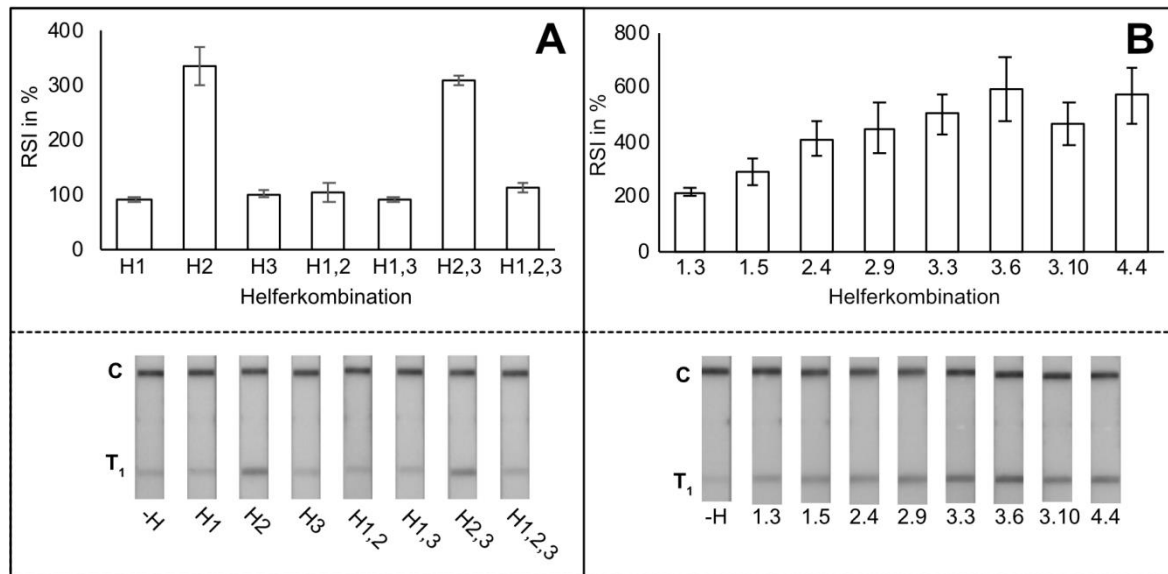


Abbildung 36 - Einfluss der Faltungshelfer auf die Nachweisbarkeit zweier CEV-PCR-Produkte. **(A)** Das Säulendiagramm im oberen Teil des Bildes zeigt den Einfluss der getesteten Faltungshelfer auf das CEV-PCR-Produkt A (asymmetrisch). Aufgetragen wurde die relative Signalintensität der Testlinie 1, wobei die Intensität der Kontrollhybridisierung ohne Helfer als Referenz herangezogen wurde. Die Analyse wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Im unteren Teil des Bildes sind die dazugehörigen repräsentativen Teststreifen (MGHD2) dargestellt. **(B)** Diese Teilabbildung ist analog zu (A) zu verstehen. Die Untersuchungen erfolgten hier jedoch mit dem CEV-PCR-Produkt B (asymmetrisch). Aufgrund der Produktgröße wurde der Einfluss fünf verschiedener Helfer und somit 31 möglicher Helferkombinationen untersucht. Helferkombinationen mit deutlich positivem Einfluss wurden in Dreifachbestimmung analysiert, woraus sich das Säulendiagramm ableitet. Auch hier sind repräsentative Teststreifen im unteren Teil des Bildes abgebildet. Die Zahlen stehen jeweils für eine definierte Helferkombination. Die Zuordnung der genutzten Helfer entsprechend der verwendeten Nummerierung lassen sich Abbildung 83 (Anhang) entnehmen.

4.5.3.3. CEV-Nachweis: Strategien zur Eliminierung von Cross-Primer-Dimeren

Im Falle des hier vorgestellten CEV-Nachweises kam es immer wieder zu unerwünschten Interaktionen von markierten Primern und / oder Sonden. Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Stellschrauben zur Eliminierung der falschpositiven Signale verursachenden Heterodimere / Cross Primer Dimere (CPDs) beleuchtet.

Anhand vorheriger Analysen wurde eine Primer-/Sonden-Kombination genutzt, bei der es zu einer unerwünschten Interaktion zwischen dem FITC-markierten *reverse* Primer und der biotinylierten Sonde kommt. Vorangegangene Hybridisierungsstudien wurden mit gereinigten FITC-markierten Fragmenten durchgeführt, sodass die Interaktion zwischen freien Primern und Sonde nicht beurteilt werden konnte. Die Inkubation von CEV-Primermix und dem CEV-Hybridisierungscocktail offenbarte ein deutlich erkennbares Heterodimer (Abbildung 37 A). Ein Herabsetzen der Salzkonzentration und die Zugabe eines spezifischen unmarkierten Oligonukleotids (CPD-Helfer, komplementäre Sequenz zum FITC-Primer) im Hybridisierungsmix bewirkt eine Abschwächung des Heterodimers, aber keine vollständige Auslöschung (Abbildung 37 A). Wird der Mix zusätzlich auf etwa 50°C erhitzt, gelingt es, in Anwesenheit des Helfers, das CPD vollständig zu eliminieren (Abbildung 37 A; 3,2x SSC und 50°C).

Der CEV-Nachweis sollte jedoch nicht nur spezifisch und sensitiv funktionieren, sondern perspektivisch *multiplex* kompatibel mit dem bereits präsentierten KHV-Nachweissystem sein. In einem orientierenden Test zeigte sich, dass die interne Amplifikationskontrolle aus dem KHV-Nachweis nicht kompatibel mit der gewählten CEV-Primer-Sonden-Kombination war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine alternative interne Amplifikationskontrolle gesucht. Es war naheliegend eine für den KHV-Nachweis bereits genutzte IAC in den zu entwickelnden CEV-Nachweis zu implementieren, um die Funktionalität dieser Kontrolle Assay-übergreifend zu gewährleisten. Obwohl sich diese Primerkombination bereits im Kontext der qPCR bewährt hat (Gilad *et al.*, 2004), zeigt sie bei Raumtemperatur im Kontext einer LFA eine deutliche Tendenz zur Heterodimerisierung auf der Testlinie 2 des LFDs (Abbildung 37 B). Dieses CPD ließ sich im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Heterodimeren nicht durch die Kombination aus Hitze und CPD-Volllängenhelfer eliminieren. Unter Zuhilfenahme eines kürzeren Helfers, der nur einen Teil des FITC-markierten, CPD-verursachenden Primers abdeckt, gelingt die Eliminierung des unerwünschten Signals auf dem LFD bei 50°C (Abbildung 37 B).

Die Nutzung kurzer oder partieller Helfer eröffnet zudem die Möglichkeit, diese bereits in den Amplifikationsmix zu integrieren. Die Verwendung eines zusätzlichen 3'-Elongationsblocks (Spacer C3) schützt, neben der Kürze, zusätzlich vor unerwünschter Elongation des Helfers. Aus der Abbildung 37 C geht hervor, dass in Anwesenheit des elongationsblockierten partiellen CPD-Helfers im PCR-Mix die Amplifikation nicht maßgeblich beeinflusst wird und dabei trotzdem unerwünschte Heterodimere effizient eliminiert werden, sodass eine klare Interpretation des LFA erfolgen kann.

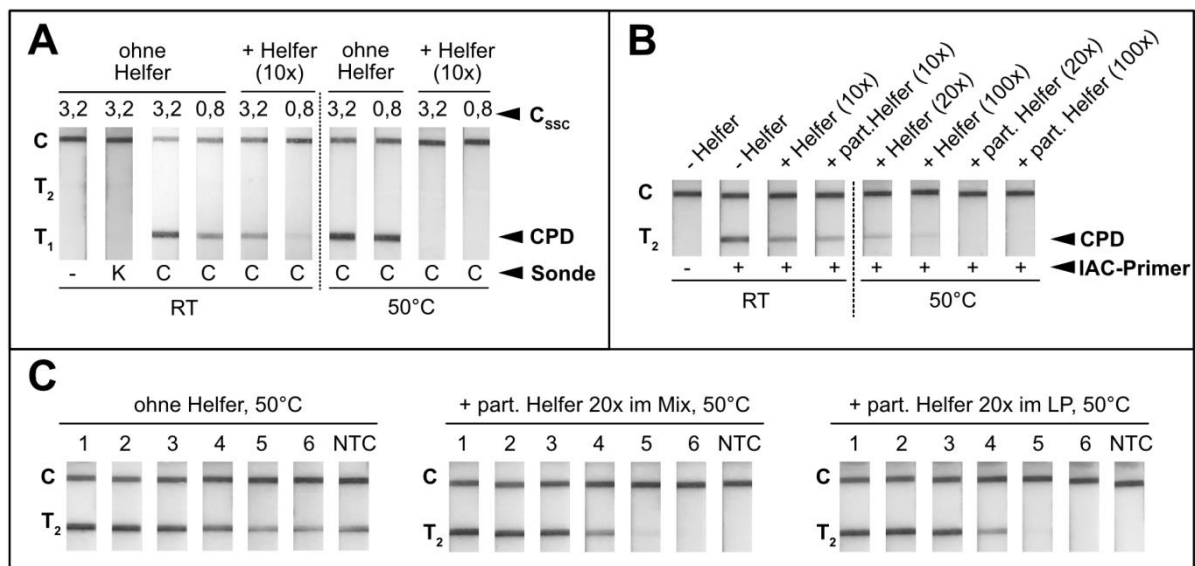


Abbildung 37 - Strategien zur Eliminierung von Cross Primer Dimeren. **(A)** Eliminierung zwischen FITC-markierten CEV-Primer und Biotin-markierter CEV-Sonde „C“. Untersucht wurde der Einfluss der Salzkonzentration (0,8x oder 3,2x SSC), der Temperatur (RT: Raumtemperatur, 50°C) und der Anwesenheit des spezifischen CPD-Helfers. **(B)** Eliminierung des CPDs der alternativen internen Amplifikationskontrolle – Untersucht wurde der Einfluss unterschiedlicher Helfer (Volllängen-Helfer und partieller Helfer) bei Raumtemperatur und 50°C. **(C)** Verwendung der partiellen Helfer in Laufpuffer (LP) und im PCR-Mastermix (Mix). In den Proben 1-6 wurde eine dekadische Verdünnungsreihe mit absteigender Konzentration des IAC-templates untersucht. Gemäß Voranalysen (AGE, nicht gezeigt) wurde in den Proben 1-4 ein erkennbares Signal auf der T2-Linie erwartet. Die Proben 5 und 6 sollten keine deutlichen Signale liefern.

4.5.3.4. Vermeidung von *carryover* Kontaminationen – Implementierung der UDG

Im Zuge der diagnostischen Validierung des KHV-Nachweises kam es zu massiven Kontaminationsproblemen. Trotz räumlicher Trennung der Arbeitsschritte (Abschnitt 3.2.6) wurden Arbeitsbereiche in einem Maß mit dem Amplifikat kontaminiert, dass Folgeanalysen zeitweise unmöglich waren. Dieser Umstand beschreibt eine erhebliche Limitation von Nachweissystemen, bei denen Nukleinsäure-Amplifikation und LFA kombiniert werden. Durch das Öffnen der Reaktionsgefäße nach Ablauf der Amplifikationsreaktion, gelangen unter bestimmten Bedingungen erhebliche Mengen an Amplifikat in die Umgebung (Longo *et al.*, 1990 / Wang *et al.*, 2018). Die Hybridisierung bei erhöhten Temperaturen im offenen Gefäß scheinen die Freisetzung darüber hinaus zu verstärken. Bei einer sehr sensitiven Nachweisführung führte dies zu falsch-positiven Resultaten, da das übertragene Amplifikat als *template* für Folgereaktionen zur Verfügung stand. Um dieses Problem zu vermeiden, sollte das Enzym Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) sowie dUTPs in das Nachweissystem implementiert werden. U-haltige Amplifikate werden durch die UDG erkannt und innerhalb eines 37°C Inkubationsschritts hydrolysiert bevor die Amplifikation startet (Longo *et al.*, 1990 / Ma *et al.*, 2017). Durch diesen Zusatzschritt stehen U-haltige Amplifikate aus vorangegangenen PCRs nicht als *template* für Folgereaktionen zur Verfügung.

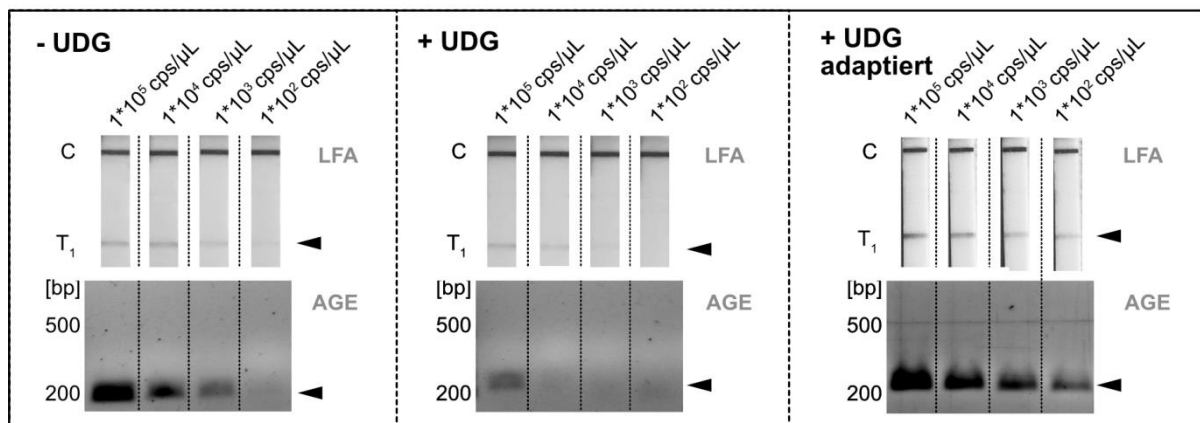


Abbildung 38 - Implementierung der UDG in das CEV-Nachweissystem. (cps/μL – Kopien je μL des Plasmids pCEV). Die schwarzen Pfeile deuten auf PCR-Produkte (der erwarteten Größe).

Die Verwendung des UDG-Systems führte zu einer maßgeblichen Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit im bestehenden CEV-Nachweis (Abbildung 38, Vergleich „-UDG“ mit „+UDG“). Aus diesem Grund wurde die CEV-PCR adaptiert. Weder die Steigerung der Polymerase-Konzentration oder die Zugabe von PCR-Zusätzen, wie PVP oder DMSO, konnte den Verlust der Empfindlichkeit kompensieren (Daten nicht gezeigt). Durch das Hinzufügen zusätzlicher Zyklen gelang es, dass die Empfindlichkeit sukzessiv verbessert werden konnte. Die größte Sensitivität ließ sich nach insgesamt 60 Zyklen herstellen, was sich negativ auf die Analysedauer auswirkte.

4.5.3.5. Sensitivitätsverlust durch die Wahl der internen Amplifikationskontrolle

Es ist gelungen, einen CEV-Nachweis mit einer funktionierenden, alternativen, internen Amplifikationskontrolle zu erarbeiten. Dieses Nachweissystem beinhaltet Helfer-Oligonukleotide, die die Nachweisbarkeit des Amplifikats im Zuge der Hybridisierung verbessern und unerwünschte Heterodimere (T1 und T2) effizient unterdrücken. Um die Gefahr von *carryover* Kontaminationen zu limitieren, wurden zusätzlich dUTPs und die Uracil-DNA-Glycosylase in das Nachweissystem implementiert. Weiterhin wurde der Test in einer Form adaptiert, dass trotz aller Anpassungen sehr empfindliche Nachweisführung sicher gestellt sein sollte. Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene und öffentlichem Veterinärwesen (Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig) eine orientierende Vergleichsanalyse an CEV-positiven Fischen durchgeführt. Hierbei wurden zehn Kiemenabstriche in Mehrfachbestimmung mit der entwickelten Methode untersucht und zusätzlich mit einer RT-qPCR verglichen (Anhang, Tabelle 34). Dabei zeichnete sich ein überraschendes Ergebnis ab. 21 von 35 CEV-positiven Proben wurden via PCR-LFA bestätigt, obwohl gemäß RT-qPCR in allen Proben mehr als $1 \cdot 10^4$ Kopien je μL vorhanden waren. In einer zusätzlichen Analyse zur unteren Nachweisgrenze des PCR-LFA zeigte sich jedoch, dass sogar 6 Kopien des Zielgens mittels PCR-LFA detektierbar waren, was dem Ergebnis der Vergleichsuntersuchung entgegenstand (Anhang, Tabelle 33). Eine Abstrichprobe (VD-17) wurde mittels PCR-LFA in 6 von 6 Analysen falsch-negativ bestimmt. Mittels Teilsequenzierung dieser Probe, wurde ein 424 bp Fragmentes des Protein 4a codierenden Gens analysiert. Zusätzlich wurde die ermittelte Sequenz einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Dabei ergab die Analyse, dass es sich um ein CEV-Isolat handelte (Anhang, Abbildung 84). Zudem konnte gezeigt werden, dass die für den Nachweis verwendeten Primer und die Sonde zu 100% zur Sequenz passen und nicht abweichen. Daher wurde geschlossen, dass die interne Kontrolle einen wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität des CEV-Nachweises zu nehmen schien. Die Analysen zur unteren Nachweisgrenze wurden mit Hilfe eines Plasmides durchgeführt, welches quantifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu erfolgte die Vergleichsuntersuchung mit biologischem Material, welches genomische DNA der Karpfen beinhaltete. Diese fungierte als zusätzliches *template* für die IAC in der multiplex PCR und nahm so wahrscheinlich Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit der CEV-PCR. In einem abschließenden Versuch wurde die Probe VD-17 erneut mit der PCR-LFA untersucht, aber die IAC wurde bewusst aus dem Testsystem entfernt. Dieser Test bestätigte die beschriebene Hypothese, da die Probe „VD-17“ in Doppelbestimmung CEV-positiv bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stellten einen Rückschritt hinsichtlich eines funktionierenden CEV-Nachweises dar, weshalb im Rahmen dieser Arbeit der CEV-Test wegen mangelnder Zeit nicht weiter optimiert werden konnte. Die Erarbeitung einer alternativen IAC sollte gemäß der hier gesammelten Erfahrungen das Problem lösen und wäre der logische Folgeschritt zur Kompletierung der CEV-Nachweisentwicklung.

4.6. Reporter-basierte RNase H2-abhängige Amplifikation Lateral Flow Analyse: Rep-rhAMP-LFA

Im Jahr 2017 präsentierte die Gruppe um Feng Zhang (Broad Institute, MIT – Harvard) eine innovative CRISPR-Cas-basierte DNA/RNA-Detektions-Strategie (Abschnitt 1.3.4.). Diese Methode wurde in den vergangenen zwei bis drei Jahren editiert, optimiert und zum Teil kommerzialisiert (Mustafa *et al.*, 2020). Das grundlegende Nachweiskonzept ist kompatibel mit einer einfachen Lateral-Flow-basierten Auswertung (Broughton *et al.*, 2020 / Myhrvold *et al.*, 2018). Interessanterweise wird in den relevanten Publikationen ebenfalls der in dieser Arbeit genutzte Teststreifen verwendet.

Durch die Nutzung sogenannter Reporter wird die bisherige Definition von Test- und Kontrolllinie des MGHD-Teststreifens verändert (Abschnitt 1.3.4.). Reporter werden hier als terminal markierte Oligonukleotide (DNA / RNA) verstanden, die durch den Lateral Flow Teststreifen erkannt werden. Im Sinne des MGHD handelt es sich somit um ein Biotin- und FAM/ FITC-markiertes Oligonukleotid. Dieses Molekül wird während des Lateral Flow auf der T-Linie gestoppt und durch das mobile Goldkonjugat erkannt. Durch den Einsatz einer definierten Menge des Reporters kann ein überwältigender Teil des Konjugats auf der T-Linie zurückgehalten werden, wodurch die Kontrolllinie sehr schwach erscheint oder vollständig ausbleibt. Kommt es innerhalb der Nachweisreaktion zur Degradierung des Reporters werden die endständigen Markierungen voneinander separiert. Beim Überfließen des Teststreifens kann das Konjugat nicht mehr auf der T-Linie gestoppt werden. Dadurch wird nicht nur die Intensität der T-Linie abgeschwächt, sondern gleichzeitig intensiviert sich das Signal der C-Linie (Abbildung 10). Diese alternative Nutzungsstrategie des Teststreifens stellte die Grundlage für die Entwicklung einer neuen Nachweisteknik dar.

4.6.1. Entwicklung einer neuen Nachweismethodik

Durch den Einsatz einer Amplifikat-spezifischen Sonde kann die Nachweisempfindlichkeit unter Beibehaltung der Spezifität gesteigert werden (Abschnitt 4.5). Im Folgenden soll eine neue Methode beschrieben werden, die den direkten Einsatz einer Sonde in der Amplifikationsreaktion ermöglicht. Dabei soll der Status der Sonde via Lateral Flow Analyse angezeigt werden.

Die neu entwickelte Methodik beruht auf der Verwendung einer speziell konzipierten Reportersonde. In Anwesenheit eines speziellen Enzyms, der RNase H2 wird DNA amplifiziert. Die RNase H2 ist in der Lage zwischen 60-75°C Hybride aus RNA- und DNA-Basen zu erkennen und genau dort zu „schneiden“. Analog zu den Reportern der CRISPR-Cas-assoziierten Nachweistekniken ist auch diese Sonde terminal mit einem Biotin und einem 6-FAM markiert. Zusätzlich wurde eine RNA-Base in das Oligonukleotid implementiert (Abbildung 39 B).

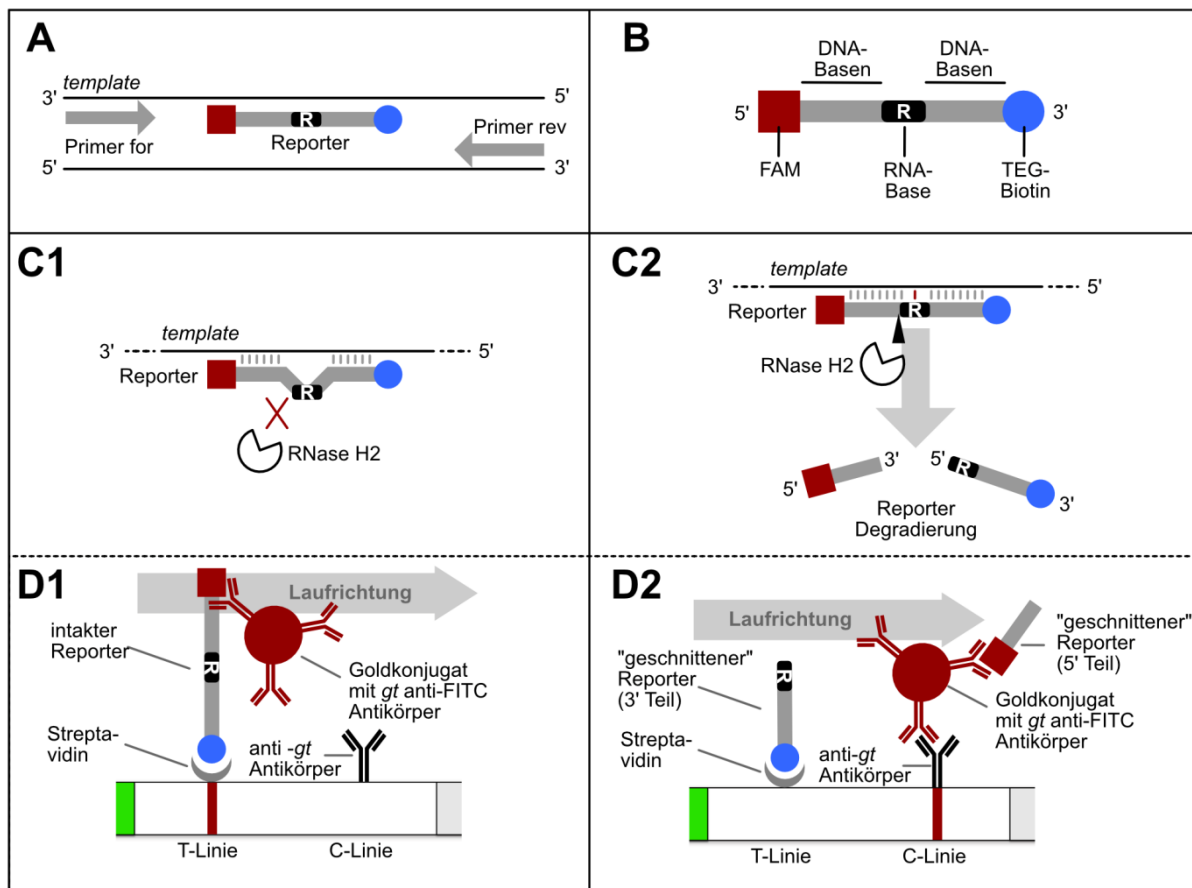


Abbildung 39 - Nachweisprinzip der Reporter basierten rhPCR mit anschließender Lateral Flow Analyse: **(A)** Übersicht Primer-Sondenbindestellen, **(B)** grundlegender Aufbau des Reporters, **(C1)** Kommt es zu keiner Bindung zwischen der RNA-Base des Reporters zum *template* / PCR-Produkt, kann die RNase H2 nicht schneiden. Der Reporter bleibt intakt. **(D1)** Intakter Reporter kann auf der C-Linie des MGHD abgefangen werden. Das führt zu einer stark ausgeprägten C-Linie und einer deutlichen Abschwächung der T-Linie. **(C2)** Bei einer vollständigen Hybridisierung der Sonde an den *template*-Strang wird der DNA-RNA-Hybrid durch die RNase H2 erkannt. Diese Nuklease setzt dann einen Schnitt im Reporter vor der RNA-Base. **(D2)** Durch Degradierung des Reporters werden Biotin- und FAM-Label voneinander separiert, wodurch die C-Linien-Intensität verstärkt und die T-Linien-Intensität abgeschwächt wird.

Bindet diese Sonde im Zuge der Reaktion an das Amplifikat und es kommt zur Ausbildung des RNA-DNA-Hybrides, kann die RNase H2 dies erkennen und „schneidet“ die Sonde (Abbildung 39 C2). Bleibt die Ausbildung des DNA-RNA-Hybrides aus, kann die RNase H2 nicht schneiden. Die Reportersonde bleibt intakt (Abbildung 39 C1). Dieser Erkennungsmechanismus ist die Grundlage für die Lateral Flow-basierte Auswertung, die identisch zu beschriebenen Reporter-basierten Nachweismethoden ist (Abbildung 10 und Abbildung 39 D). Um Verwirrung zu vermeiden, bleibt im Kontext dieser Arbeit die Benennung von T- und C-Linie methodenübergreifend identisch, auch wenn sich bei Reporter-basierten Analysen die Bedeutung der Linien ändert (Abschnitt 1.3.4).

4.6.1.1. **Proof of Concept - Identifikation von *L. lindneri***

Um die Funktionalität der Methode zu überprüfen wurde der Themenkomplex: Nachweis bierschädigender Organismen aufgegriffen. Ziel war es, *Lactobacillus lindneri* über eine semiselektive PCR in Kombination mit einer speziesspezifischen Reportersonde zu identifizieren (Abbildung 40). Die verwendeten Primer wurden bereits in vorherigen Analysen genutzt (Abschnitt 4.4.1.) und erwiesen sich als nutzbar, um ein Gruppen-spezifisches Amplifikat zu erzeugen (bierschädigende

Lactobacillus spp. und *Pediococcus* spp.). Die genutzten Primer überspannen eine variable Sequenzregion, die eine Identifizierung durch zusätzliche Sondenhybridisierung ermöglichen sollte (Abbildung 40).

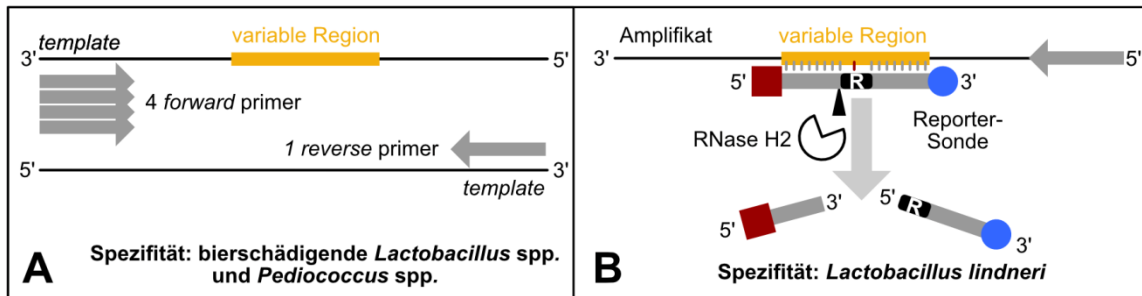


Abbildung 40 - Konzeptionierung der Rep-rhPCR zum Nachweis von *L. lindneri*. **(A)** Amplifikationsreaktion wird über 5 Primer initiiert (1 reverse Primer und 4 forward Primer). Amplifikate entstehen (durch semi-selektive Primer) an DNA relevanter Bierschädiger der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*. **(B)** Die speziesspezifische Reporter-Sonde sollte möglichst nur dann degradiert werden, sofern das *L. lindneri*-spezifische Amplifikat hybridisiert wird.

In einem ersten Versuch wurde die grundlegende Funktionalität dieser Testmethode durch die Nutzung einer Gradienten PCR untersucht. Die variierenden Annealing-Temperaturen sollten sicherstellen, dass eine Amplifikation stattfindet. Als *template* diente Zellmaterial einer *Lactobacillus lindneri* Kultur mit einer Konzentration von etwa $1 \cdot 10^6$ cfu / mL. Zusätzlich wurde eine *no template*-Kontrolle (NTC) bei der geringsten Annealing-Temperatur mitgeführt. Das gesamte Reaktionsvolumen (20 µL) beinhaltete eine Reportermenge von 8 pmol. Je LFA wurden 5 µL, also 2 pmol Reporter-sonde, genutzt. Ziel dieser Analyse war es herauszufinden, ob die Degradierung des Reporters im Zuge einer funktionierenden PCR stattfindet und ob man diese via LFA tatsächlich sichtbar machen kann. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend visualisiert und dokumentiert. Die Funktionalität der PCR mit einer Annealing-Temperatur zwischen 50,0°C und 58,1°C konnte bestätigt werden (Abbildung 41 B). Bei einer Temperatur von 60°C konnte kein PCR-Produkt via AGE detektiert werden (Abbildung 41 B). Die Analyse der PCR-Produkte durch LFA konnte das Ergebnis der AGE bestätigen. Tatsächlich ließen sich in den Amplifikathaltigen Proben stärkere C-Linien-Intensitäten ablesen (Abbildung 41 A). Die errechneten Ratios (Intensität T / Intensität C) der AGE-positiven Proben unterscheiden sich mit Werten < 6,0 deutlich von denen der Negativkontrolle (NTC) und der Reaktion mit einer Annealing-Temperatur von 60,0°C (17,7 und 14,8). Je kleiner der errechnete Wert (T/C), desto deutlicher positiv ist das Ergebnis. Folglich konnte erstmalig eine grundlegende Funktionalität dieses Reaktionsmechanismus beschrieben werden. Bezeichnet wird diese Technik fortan als Reporter-basierte RNase H2-abhängige *Polymerase Chain Reaction* – Lateral Flow Analyse, kurz: Rep-rhPCR-LFA.

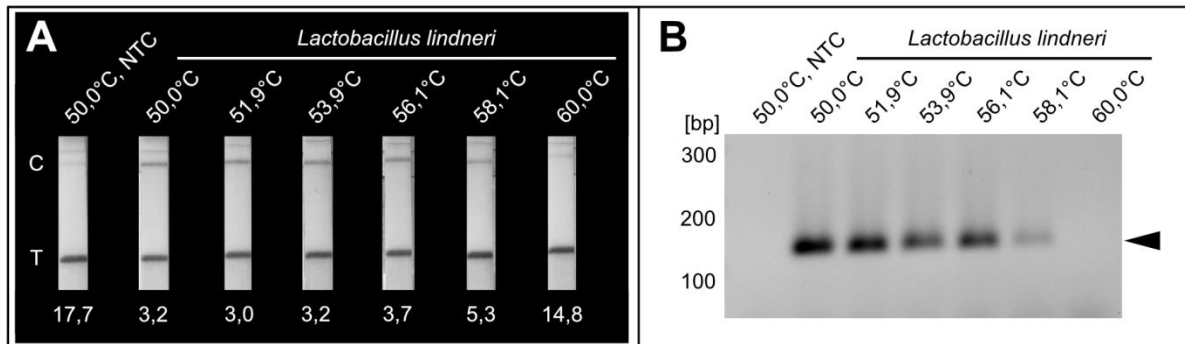


Abbildung 41 - Rep-rhPCR-LFA: Gradienten-Analyse. **(A)** Auswertung der PCR-Produkte via Lateral Flow Analyse. 5 μ L je LFA werden verwendet. Die Intensitäten der T- und C- Linien wurden quantifiziert und dann je Streifen die Ratio (T/C) errechnet. Dieser Wert findet unter den Streifenbildern. **(B)** Auswertung der PCR-Produkte via AGE. 10 μ L der Probe wurde aufgetrennt. Der schwarze Pfeil in B deutet auf das PCR-Produkt in erwarteter Größe.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu belegen, wurde ein vergleichsweise kleines *template*-Set in Mehrfachbestimmung analysiert. Für diese Analyse wurden insgesamt 47 PCR-Proben mit nachgeschalteter LFA herangezogen. Mitgeführt wurden Proben ohne *template* (NTC), Proben mit Zellmaterial einer *L. brevis*-Kultur (*Lbr*, $1 \cdot 10^7$ cfu / mL), sowie Proben mit Zellmaterial aus einer *L. lindneri*-Kultur (*Lli*, ca. $1 \cdot 10^5$ cfu / mL). Darüber hinaus wurden 12 der 47 Proben als no PCR Kontrollen (NPC) untersucht. Für alle Proben wurden die Ratios (T/C) errechnet und diese für die Erstellung des Boxplots (Abbildung 42 A) und der nachfolgenden statistischen Analyse genutzt.

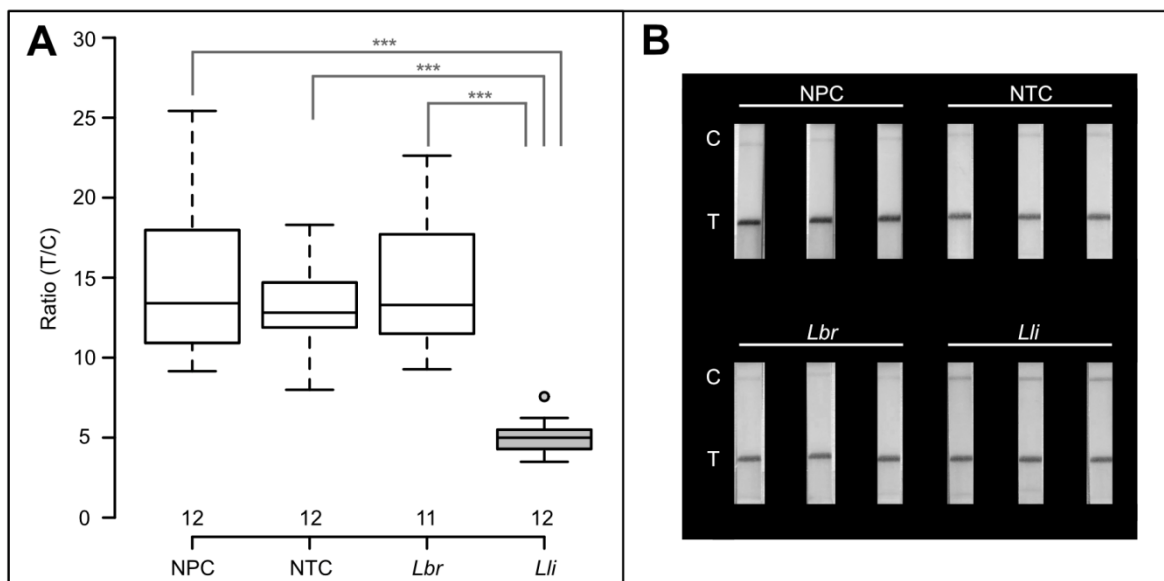


Abbildung 42 - Proof of Concept – Test zur Funktionalität der Rep-rhPCR-LFA: NPC – no PCR control, NTC – no template control, *Lbr* – *Lactobacillus brevis* ca. 10.000 cfu / Analyse, *Lli* – *Lactobacillus lindneri* ca. 100-1000 cfu/mL. **(A)** Boxplot verbildlicht die ermittelten Ratios (T/C) nach Rep-rhPCR-LFA. Über den verwendeten templates ist die Anzahl durchgeführter Tests aufgeführt (n). Mit Hilfe des *Student's t-test* wurde bestätigt, dass die errechneten Ratios der Proben mit *L. lindneri* DNA hoch signifikant [***] von den Ratios der NTC-, NPC- und *Lbr*-Proben abweichen ($p < 0,001$). **(B)** Repräsentative Darstellung von je 3 Replikaten der beschriebenen proof of concept – Analyse.

Bei ausbleibender PCR konnte das Signal auf der C-Linie des MGHD abgeschwächt, jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Daraus ergab sich eine Ratio (T/C) von etwa $14,8 \pm 5,1$. Vergleichbare Werte wurden auch für die Probensets NTC und *Lbr* errechnet ($13,1 \pm 3,1$ und $14,7 \pm 4,7$). Deutlich

abweichende Resultate lieferten die Proben mit dem *template* *L. lindneri* ($5,1 \pm 1,1$). Rein visuell ließ sich dieses Ergebnis ebenso interpretieren, was aus der Abbildung 42 B hervorgeht. Ein *Pool* der Proben wurde zusätzlich via AGE überprüft. Dabei konnte die Funktionalität der PCR bestätigt werden. Für *Lbr* und *Lli* sind deutliche Fragmente in der erwarteten Größe erkennbar, für NPC und NTC sind keine Amplifikate im Agarosegel sichtbar (Anhang, Abbildung 86). Mittels Shapiro-Wilks-Test wurden die errechneten Werte der verschiedenen Probensets auf eine Normalverteilung hin untersucht. Für die vier Probensets wurde die Normalverteilung ($p < 0,01$) bestätigt. Dieses Zwischenergebnis erlaubte die Nutzung des Student's t-test zur Bestimmung einer statistisch signifikanten Abweichung der Mittelwerte der verglichenen Stichproben. Dabei konnte eine hoch signifikante Abweichung der errechneten Ratios zwischen dem Probenset *Lli* und jedem anderen Probenset (NTC, NPC und *Lbr*) errechnet werden ($p < 0,001$). Der beschriebene *proof of concept* Versuch belegt die Reproduzierbarkeit der Rep-rhPCR-LFA.

4.6.1.2. Rep-rhPCR-LFA: Nachweisempfindlichkeit und Sensitivität

Ein wichtiger Faktor zur Beurteilung einer Testmethode im diagnostischen Kontext ist die Sensitivität, mit der ein Nachweis erbracht werden kann. Für das erarbeitete Testsystem wurde dieser Versuch an einer Verdünnungsreihe einer *Lactobacillus lindneri*-Kultur durchgeführt. Dabei wurde die Ausgangskultur auf eine Zellzahl von etwa $1 \cdot 10^7$ cfu / mL eingestellt und anschließend dekadisch verdünnt. 2 μ L dieser Proben wurden dann als *template* in die Amplifikationsreaktion gegeben. Das PCR-Produkt wurde nach abgelaufener Amplifikation durch LFA und AGE untersucht (Abbildung 43).

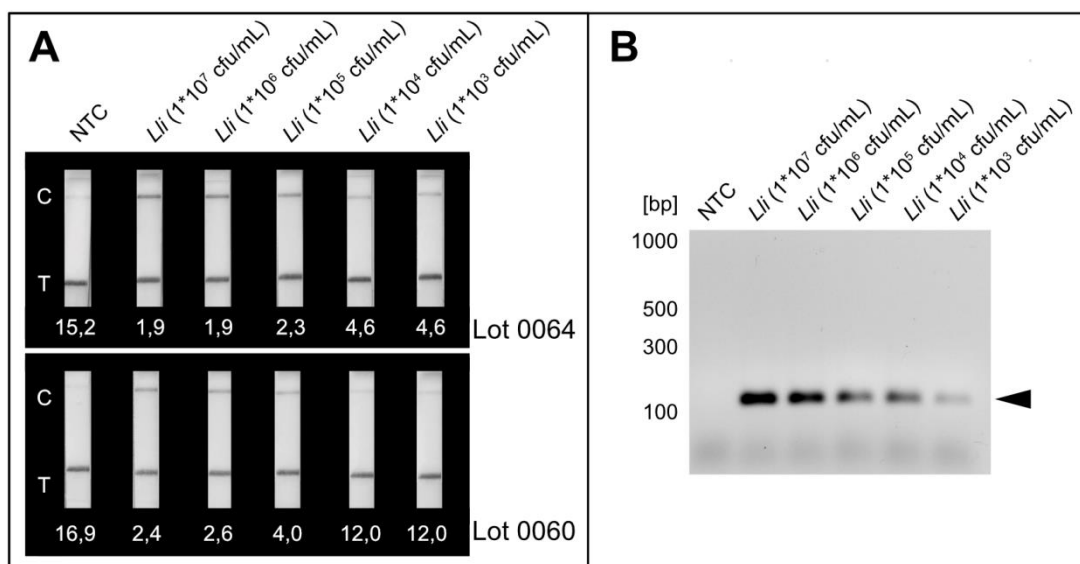


Abbildung 43 - Orientierender Sensitivitätstest der Rep-rhPCR: **(A)** Auswertung des PCR-Produkts durch Lateral Flow Analyse mit 2 unterschiedlichen Teststreifen-Lots (0064 und 0060). Für die Analyse wurden 5 μ L des Produkts verwendet. **(B)** Zusätzlich wurden die PCR-Produkte via AGE analysiert. Hier wurden 10 μ L je Probe verwendet. Der schwarze Pfeil deutet auf PCR-Produkte in der erwarteten Größe.

Dabei konnte in allen *L. lindneri*-haltigen Proben ein Amplifikat erzeugt werden. Selbst in der Verdünnungsstufe mit der geringsten Zellzahl (ca. $1 \cdot 10^3$ cfu / mL bzw. 2 cfu / PCR) war das spezifische Amplifikat im Gel erkennbar. Die Negativkontrolle hingegen blieb wie erwartet negativ (Abbildung 43 B). Die LFA wurde mit zwei unterschiedlichen Tesstreifen- (MGHD-) Lots durchgeführt. Diese lieferten abweichende Ergebnisse (Abbildung 43 A). Während die Lot 0064 die Reporterdegradierung in allen PCR-positiven Proben darstellen konnte, war das mit Lot 0060 weniger gut abbildbar. In allen Fällen wichen die errechneten Ratios PCR-positiver Proben von denen der Negativkontrolle ab. Letztlich konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Methode durchaus empfindlich zu funktionieren scheint und 2 cfu je Reaktion nachweisen kann. Dabei unterliegt die Methode jedoch in erheblichem Maße der Qualität des genutzten LFDs.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der alternativen Reporter-basierten PCR-LFA ist die Nachweis-Genauigkeit. Insbesondere die Spezifität der RNase H2 scheint essentiell für die Performance der Analyse. Um die Spezifität dieser Nachweismethode in dem gewählten praktischen Kontext beurteilen zu können, wurden zwölf relevante *Lactobacillus* – und *Pediococcus* - Isolate für einen orientierenden Test herangezogen (Tabelle 16).

Tabelle 16 - Spezifitätsuntersuchung der Rep-rhPCR zur Identifikation von *L. lindneri*. In allen Proben wurden Zellzahlen $> 1 \cdot 10^5$ cfu / mL eingesetzt. Die Abbildung zu dieser Analyse ist im Anhang zu finden. Der errechnete *cut-off* Wert, der eine klare Diskriminierung zwischen positivem und negativem Ergebnis erlaubt, beträgt 7,0. Ratio (T/C) < 7 entspricht positivem Resultat, Ratio (T/C) ≥ 7 entspricht negativem Ergebnis.

Nr.	template	AGE	Ratio (T/C)	Ergebnis (cut-off 7,0)
1	<i>L. brevis</i> I	positiv	17,4	negativ
2	<i>L. brevis</i> 623	positiv	24,6	negativ
3	<i>L. lindneri</i> 1601	positiv	4,8	positiv
4	<i>L. paracollinides</i>	positiv	16,9	negativ
5	<i>P. damnosus</i>	positiv	12,1	negativ
6	<i>L. rossiae</i> 1922	positiv	18,6	negativ
7	<i>L. curtus</i>	positiv	11,6	negativ
8	<i>L. cerevisiae</i>	positiv	14,2	negativ
9	<i>L. casei</i> 365	positiv	12,4	negativ
10	<i>L. buchneri</i> 1431	positiv	17,0	negativ
11	<i>L. backi</i> 121	positiv	11,6	negativ
12	<i>L. plantarum</i> 1295	positiv	13,7	negativ

Da es sich bei den genutzten Primern um Gruppen-spezifische handelt, war im Agarosegel bei jedem der getesteten Organismen ein PCR-Fragment in der erwarteten Größe detektierbar. Erst die LFA konnte die tatsächliche Nachweisgenauigkeit abbilden. Wie bereits zuvor mehrfach gezeigt, gelingt die Erzeugung eines eindeutig positiven Resultats für den Zielorganismus *Lactobacillus lindneri*. Die Amplifikation an allen anderen *templates* führte zu visuell negativen Ergebnissen, welche mit T/C-Ratios zwischen 11 und 25 deutlich über dem errechneten *cut-off* von 7,0 lagen und somit deutlich negativ gewertet wurden. Dementsprechend lässt sich schlussfolgern, dass die Rep-rhPCR-LFA spezifisch funktioniert und die eindeutige Identifikation von *L. lindneri* erlaubt.

4.7. NALFIA-basierte SNP-Detektion

In der bisherigen Arbeit wurden primär Ergebnisse präsentiert, die auf den Nachweis einzelner Spezies, Speziesgruppen oder speziesspezifischer Eigenschaften zielen. Eine weitere diagnostische Facette ist der Nachweis von Punktmutationen oder Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs). Aus methodischer Sicht ist diese Form der Nachweisführung u.U. sehr herausfordernd (Belousov *et al.*, 2014). Belegt wird dies durch etablierte, in der Regel recht aufwändige und mit erheblichem technischem Aufwand verbundene Nachweistechiken. Sequenzierungsmethoden (Sanger-Sequenzierung oder NGS), RFLP-Analysen oder qRT-PCR-basierte Schmelzkurvenanalysen werden häufig für die SNP-Diagnostik herangezogen (Lefever *et al.*, 2019). Einfache, schnelle, *Point-of-Need*-taugliche Nachweismethoden finden sich in der Fachliteratur aber auch in kommerziellen Produkten verhältnismäßig selten. Aus diesem Grund widmet sich dieses Kapitel der vorliegenden Arbeit dem NALFIA-basierten Nachweis von SNPs.

SNP-Diagnostik spielt häufig eine bedeutende Rolle in humanmedizinischen Fragestellungen (Kim und Misra, 2007). Aus diesem Grund wurde als praxisrelevantes Testsystem die Detektion des Faktor-V-Leiden (FVL) herangezogen. FVL beruht auf einer vererbaren Punktmutation an Position 1691 des Faktor-V-Gens (Van Cott *et al.*, 2016). Der Basenaustausch 1691 G→A zieht eine Veränderung der Aminosäuresequenz des Faktor-V-Proteins nach sich, wobei ein Arginin an Position 501 durch ein Glutamat ersetzt wird (Bertina *et al.*, 1994 / Greengard *et al.*, 1994 / Zöller *et al.*, 1994). Diese Veränderung führt zu einer modifizierten Prozessierbarkeit des Faktors V, was zu einem Ungleichgewicht in der Blutgerinnung führt und wodurch sich das Risiko einer Thrombose deutlich erhöht (Ridker¹ *et al.*, 1997 / Dizon-Townson *et al.*, 1997 / Ridker² *et al.*, 1997). Innerhalb dieses Kapitels, soll die Nachweisbarkeit der Faktor-V-Leiden-Mutation unter Zuhilfenahme verschiedener Amplifikationstechniken in Kombination mit einer Lateral Flow basierten Auswertung untersucht werden.

4.7.1. Der Nachweis der FVL-Mutation mittels RNase H2-abhängiger PCR

Die rhPCR ist eine bereits etablierte und funktionierende PCR-Methode (Dobosy *et al.*, 2011). In Real-Time PCR Analysen wird diese Technik präferiert für die Erkennung von SNPs verwendet (Broccanello *et al.*, 2018). Methodisch beruht diese Variation der PCR auf der Zuhilfenahme einer speziellen thermostabilen RNase. Diese RNase H2 ist in der Lage RNA-DNA-Hybride zu erkennen und dann vor der RNA-Base einen Schnitt zu setzen. Durch die Nutzung speziell modifizierter Primer lässt sich die Spezifität der Amplifikationsreaktion in einem Maße erhöhen, dass SNPs diskriminiert werden können (Dobosy *et al.*, 2011). Die in der Arbeit präsentierten Ergebnisse beruhen auf der Idee die rhPCR so zu adaptieren, dass die Amplifikate mittels LFA auswertbar sind (Abbildung 44).

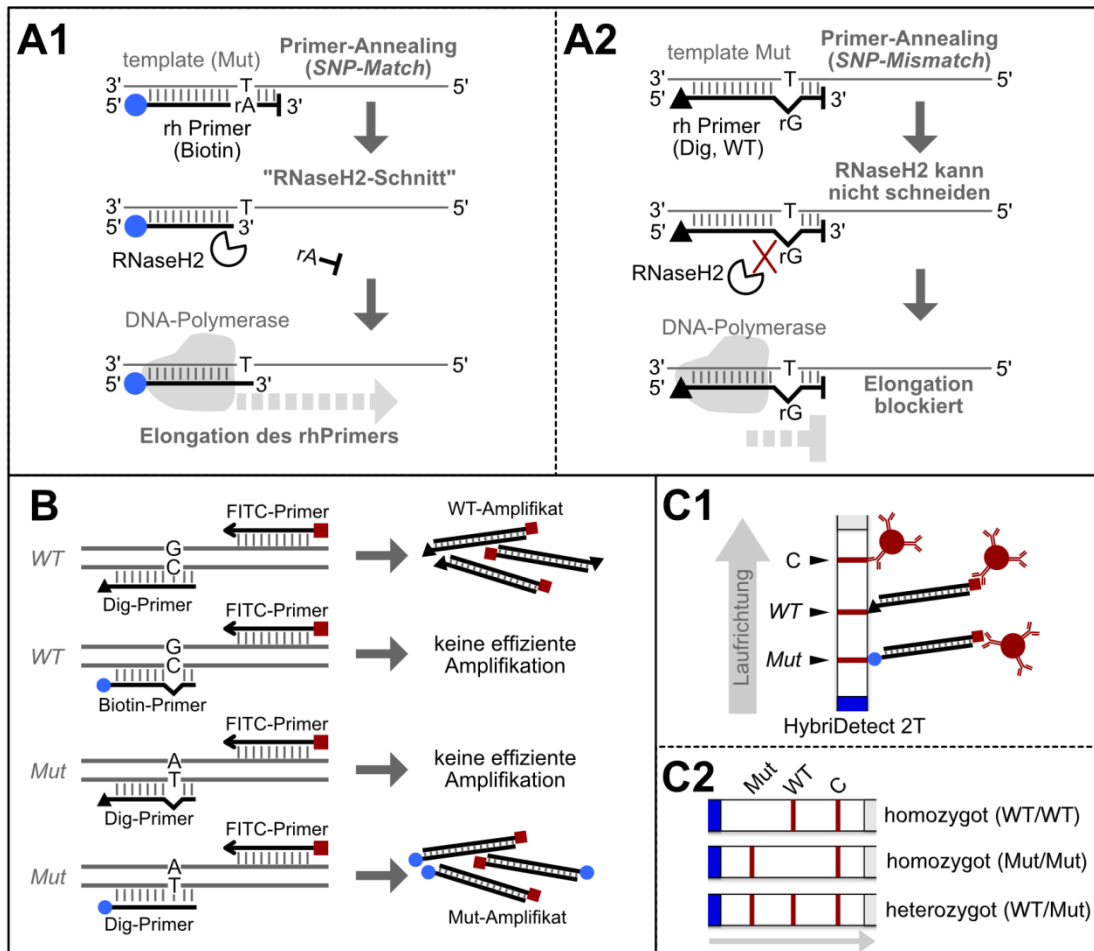


Abbildung 44 - Nachweismechanismus der rhPCR-LFA: (A1) RNase H2-abhängige Aktivierung eines rhPrimers. Annealing des Primers und Ausbildung des RNA-DNA-Hybrides führt zum „Schneiden“ des Primers, wodurch ein elongierbares 3'-Ende entsteht. (A2) Kann an SNP-Position RNA-DNA-Hybrid nicht ausgebildet werden, bleibt im Idealfall der RNase H2-abhängige „Schnitt“ des Primers aus. Das 3'-Ende des rhPrimers ist wegen des Elongationsblocks durch die DNA-Polymerase nicht elongierbar. (B) Der universelle FITC-Primer bindet sowohl im WT-Allel, als auch im Mut-Allel (FVL-Mutation). Biotin- und Dig-Primer hingegen sollen SNP-spezifisch die effiziente Amplifikation initiieren. Folglich entstehen SNP-spezifische Amplifikate, wobei das WT-Amplifikat DIG- und FITC-markiert ist. Das Mut-Amplifikat ist Biotin- und FITC-markiert. (C1) Dementsprechend kann das Mut-PCR-Produkt auf der T1-Linie und das WT-PCR-Produkt auf der T2-Linie visualisiert werden. (C2) Das hat zur Folge, dass alle 3 möglichen FVL-assoziierten Genotypen darstellbar sind.

Dabei sollen die exakte Einstellung von Annealing und die Nutzung der RNase H2 dazu beitragen spezifisch SNPs nachzuweisen. Ziel dieser methodischen Herangehensweise ist es, in einer Analyse alle möglichen FVL-assoziierten Genotypen darstellen zu können (Abbildung 44 C2). Um die Funktionalität zu überprüfen, wurde die rhPCR zunächst als *singleplex* Reaktion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation beider genetischer Varianten mit den jeweiligen Primerkombinationen gelingt (Abbildung 45). Die Amplifikate lassen sich wie erwartet durch AGE nicht unterscheiden, da sie identische Größen aufweisen. Die spezifischen Markierungen der Amplifikate ermöglichen jedoch eine grundsätzliche Diskriminierung durch LFA (Abbildung 44, Abbildung 45 A). Im Rahmen einer Gradienten-PCR-Analyse wurden die *singleplex* PCRs hinsichtlich ihrer Spezifität in Abhängigkeit zur verwendeten Annealingtemperatur untersucht (Abbildung 45 B). Dabei zeigte sich, dass eine grundsätzliche Diskriminierbarkeit zwischen den SNP-Varianten möglich ist (Abbildung 45 B, C). Der Nachweis der WT-Variante zeigt nur bei 66°C

Annealing eine spezifische Nachweisreaktion, wohingegen der Nachweis der FVL-Mutation im *singleplex* Ansatz zwischen 61-64°C spezifisch funktioniert (Abbildung 45 B).

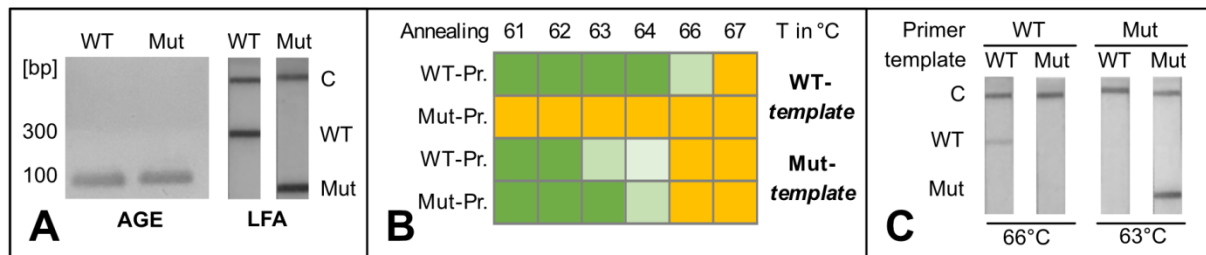


Abbildung 45 - rhPCR-LFA im *singleplex* Format: (A) Das WT-Amplifikat und das Mut-Amplifikat wurden via AGE und LFA analysiert. (B) Die *singleplex* PCRs wurden mit beiden möglichen templates im Rahmen einer Gradienten-Analyse untersucht. Variiert wurde die Annealingtemperatur. Die orange-farbenen Felder symbolisieren ausbleibende Signale auf dem LFD, wohingegen ein grünes Feld für eine erkennbare Test-Linie steht. Je heller das grün, desto schwächer das erkennbare Signal. (C) Spezifische Erkennung der von WT- und Mut-Genotyp via *singleplex* rhPCR-LFA.

Einen funktionellen und robusten *multiplex* FVL-Nachweis zu etablieren, stellte sich als äußerst herausfordernd heraus. Sobald der Mut-spezifische Primer zusammen mit dem WT-spezifischen Primer in einer Reaktion genutzt wurde, traten Unspezifitäten in beide „Richtungen“ auf. Analysen zum Einfluss der *template* Menge auf die Spezifität der Nachweisreaktion verdeutlichen das Problem sehr anschaulich (Abbildung 46). Höhere *template* Konzentrationen von WT- und Mut-*template* führten zu einer starken Amplifikation und folglich viel PCR-Produkt. Diese Schlussfolgerung lässt sich durch intensive Färbung der Test-Linien auf dem LFD ableiten (Abbildung 46 A). Wird wenig *template* genutzt, sodass die Signale auf dem Teststreifen gerade noch erkennbar sind, scheint die *multiplex* rhPCR-LFA spezifisch zu funktionieren (Abbildung 46 A; 0,1 ng *template*). Dieser Beobachtung erwies sich als experimentell reproduzierbar, was ein starker Hinweis darauf ist, dass die Spezifität der Reaktion stark mit der *template* Menge bzw. Zyklenzahl korrelieren könnte. Zahlreiche Optimierungsversuche trugen in keinem Fall zu einer Verbesserung der Spezifität bei, sobald viel PCR-Produkt akkumuliert wurde (Daten nicht gezeigt). In der Summe gelang es nicht, eine funktionelle und robuste *multiplex* rhPCR-LFA zu etablieren.

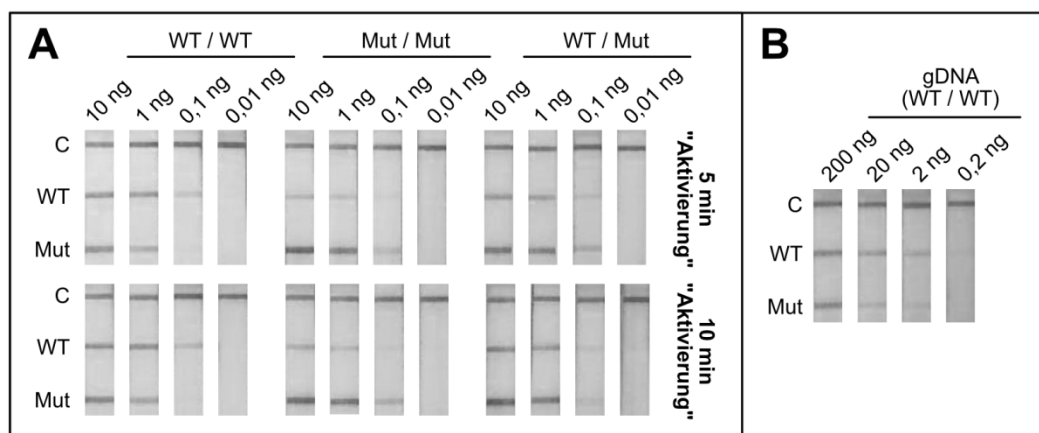


Abbildung 46 - rhPCR-LFA im *multiplex* Format: (A) Einfluss der *template*-Menge auf die Spezifität der *multiplex* rhPCR-LFA. Als *template* wurden PCR-Fragmente (ca. 700 bp) eingesetzt. Variiert wurde zusätzlich die initiale Aktivierung der RNase H2 (5 und 10 min). (B) *multiplex*-rhPCR an humaner gDNA (Genotyp: homozygot WT, Promega).

Der experimentelle Ansatz und die umgesetzte Nachweisstrategie erlaubten keine klare Diskriminierung zwischen den FVL-assoziierten Genotypen mittels rhPCR-LFA. Die Analyse an humaner gDNA verdeutlicht dieses Ergebnis (Abbildung 46 B). In keiner getesteten DNA-Konzentration gelang die korrekte Identifizierung des WT-Genotyps, weil in jedem Versuch ebenfalls Mut-Amplifikat erzeugt wurde. Aus diesem Grund wurden methodische Alternativen für den Nachweis der FVL-Punktmutation untersucht.

4.7.2. Nachweis der FVL-Mutation via *Amplification-refractory mutation system-PCR (ARMS-PCR)*

Die ARMS-PCR, oder Allel-spezifische PCR ist eine recht alte PCR-Variante, die vor allem durch ihre Einfachheit besticht (Ye *et al.*, 2001). Häufig wird die Auswertung der ARMS-PCR über eine Agarosegelelektrophorese vorgenommen (Nanfack *et al.*, 2015 / Bhanothu und Venkatesan, 2019). Diese Nachweismethode beruht auf einem speziellen *Primerdesign*. Dabei wird der SNP in der letzten Base des Primers, also am 3'-Ende, adressiert. Zusätzlich wird im 3' – Bereich des Primers bewusst ein Fehlpaarung zum *template*, durch Einbau einer *mismatch* DNA-Base, forciert (Ye *et al.*, 2001). Dadurch kann in der Praxis die Nachweisgenauigkeit gesteigert werden. Durch den Einbau des zusätzlichen *mismatch*-Nukleotids wird das 3'-Ende destabilisiert. Das kann wiederum dazu führen, dass an der SNP-Position ein korrektes Annealing erforderlich ist, damit die Elongation durch DNA-Polymerase stattfinden kann (Abbildung 47 A). Kommt es zur Fehlpaarung an der SNP-Position wird die Elongation im Optimalfall unterbunden (Abbildung 47 B).

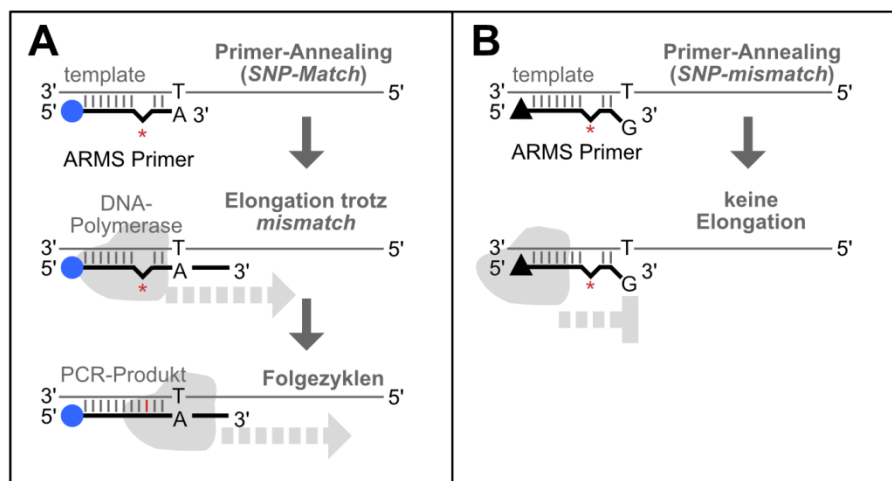


Abbildung 47 - Mechanismus der ARMS-PCR. **(A)** ARMS-Primer zeichnen sich durch terminale Markierung (5' Ende) für LFA, die SNP-Position liegt genau am zu elongierenden 3' Ende des Primers und zusätzlich wird im Bereich des 3' Endes ein zusätzlicher *mismatch* implementiert. Der ARMS-*mismatch* behindert nicht die Elongation, sofern die SNP-Position korrekt hybridisiert. Der ARMS-*mismatch* wird in das Amplifikat implementiert, sodass die Vervielfältigung in Folgezyklen sehr effizient von statten geht. **(B)** Die zusätzliche ARMS-*mismatch* Position trägt dazu bei, dass die Elongation im Falle ein *mismatches* an SNP-Position unterbunden wird. Das 3'-Ende des Primers in einem Maße destabilisiert, dass die DNA-Polymerase den Primer nicht elongieren kann. Eine effiziente Amplifikation bleibt aus.

Ziel dieser methodischen Herangehensweise ist es, in einer Analyse alle möglichen FVL-assoziierten Genotypen darstellen zu können. Dabei wird die identische *labeling* Strategie wie bei der *multiplex* rhPCR verfolgt (Abbildung 44).

Um den Einfluss der ARMS-Position innerhalb eines der Nachweisprimer beurteilen zu können, wurden für die Assay-Etablierung Primer ohne zusätzliche *mismatch*-Position analysiert. In einer Gradienten-Analyse mit beiden Allel-Varianten konnte nun der Einfluss der Annealingtemperatur auf die Spezifität des Nachweises beurteilt werden. Dabei zeigte sich, dass im gewählten Testsystem eine Diskriminierung der SNPs grundsätzlich gelingt, jedoch in einem sehr engen Temperaturbereich (Tabelle 17). Die eindeutige Erkennung des FVL-SNPs gelingt zudem etwas klarer als es für den WT-SNP der Fall ist. Das Einfügen des ARMS-*mismatch* in den Primer zur Erkennung des FVL-Allels führt, wie erwartet, zu einer Absenkung der Annealingtemperatur. Tatsächlich gelingt eine klarere Diskriminierung des SNPs in einem Bereich von ca. 63-65°C Annealing, wobei Unspezifitäten mit dem WT-*template* ausblieben (Tabelle 17). Für den FVL-Nachweis konnte eine robust funktionierende Primersequenz gefunden werden. Deshalb wurde versucht, über das Einfügen eines ARMS-*mismatch* in die WT-Primersequenz die Nachweisbarkeit und Diskriminierbarkeit zu verbessern, was als Grundlage für das geplante *multiplexing* war. Editiert wurde im Falle des WT-Primers die benachbarte Base zur SNP-Position am 3'-Ende. Unter den getesteten Oligonukleotiden bewirkte die Änderung C → G an benannter Position einen spezifischen Nachweis des WT-Allels bei einer *Annealing*-Temperatur von 64,7°C.

Tabelle 17 - Einfluss der Primersequenz auf die *singleplex* Diskriminierbarkeit zwischen FVL-assoziierten SNP-Varianten. [++] stark positiv, [+] positiv, [(+)] schwach positiv, [-] negativ. Die Farben dienen der Unterscheidbarkeit von erwarteten und unerwarteten Ergebnissen: einer grüner Hintergrund symbolisiert ein erwartetes Ergebnis, wohin gelber, bzw. orange-farbener Abweichungen vom erwarteten Ergebnis anzeigen.

Name Primer	Primersequenz (5' → 3')	reverse Primer	template	Annealingtemperatur in °C							
				62,0	62,3	63,3	64,7	66,3	67,7	68,7	69,0
WT for (-ARMS)	agatccctggacaggc G	rev2-FITC	WT	++	++	++	++	++	+	(+)	(+)
			Mut	++	++	+	+	(+)	-	-	-
WT for 1t	gcagatccctggacagg TG	rev2-FITC	WT	++	++	++	++	+	(+)	-	-
			Mut	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
WT for 1g	gcagatccctggacagg GG	rev2-FITC	WT	++	++	++	++	+	(+)	-	-
			Mut	+	+	(+)	-	-	-	-	-
WT for 1a	gcagatccctggacagg AG	rev2-FITC+	WT	++	++	++	+	(+)	-	-	-
			Mut	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
Mut for (-ARMS)	cagatccctggacaggc A	rev2-FITC	WT	+	+	+	(+)	-	-	-	-
			Mut	++	++	++	++	++	+	-	-
Mut for 2t	gcagatccctggacag TcA	rev2-FITC / rev2-FITC+	WT	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
			Mut	++	++	++	++	(+)	-	-	-
EX-WT for1a	<u>ctagtttgcagatccctggacagg</u> AG	EX-rev2- FITC	WT	++	++	++	+	(+)	-	-	-
			Mut	+	+	(+)	-	-	-	-	-
EX-Mut for 2t	<u>aactcaagcagatccctggacag</u> TcA	EX-rev2- FITC	WT	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
			Mut	++	++	++	++	+	(+)	-	-

Die bisher beschriebenen Versuche zum Einfluss der ARMS-Primer wurden mit einem künstlichen *template* durchgeführt. Hierfür wurden PCR-Fragmente mit einer Größe von 603 bp amplifiziert, gereinigt, auf eine definierte Konzentration eingestellt und anschließend als *template* für die Analysen genutzt. Da verhältnismäßig viele Kopien des Gens in die Reaktion eingebracht wurden, konnte mit einer vergleichsweise geringen Zyklenzahl von 25 Zyklen je PCR gearbeitet werden. Innerhalb dieses Systems gelang es, einen funktionierenden *multiplex*-Nachweis zu erarbeiten. Problematisch blieben jedoch die gelegentlichen Unspezifitäten, insbesondere verursacht durch den WT-Primer. Gerade wenn FVL-spezifisches Produkt effizient amplifiziert wird, stieg die Wahrscheinlichkeit für falschpositive Signale auf der 2. Testlinie des LFDs, analog zu den Versuchen mit der rhPCR (Abbildung 48). Beim Einsatz von humaner genomischer DNA standen weniger Kopien des *templates* zur Verfügung, sodass das PCR-Protokoll adaptiert werden musste. Folglich wurde die Zyklenzahl erhöht, um die Nachweisempfindlichkeit zu steigern. Das wiederum hatte zur Folge, dass plötzlich *carryover* Kontaminationen zum Problem wurden (Abbildung 48 B). Diese traten trotz diverser Vorsichtsmaßnahmen auf. Die Herstellung des Mastermix, die *template*-Zugabe, und die Lateral Flow Analyse wurde von Beginn an räumlich strikt getrennt. Zudem wurde das Einbahnstraßensystem eingehalten, bei dem die genannten Bereiche nur 1x täglich in exakt dieser Reihenfolge durchlaufen werden dürfen. Arbeitswerkzeuge wie Pipetten und Verbrauchsmaterialien wurden nie entgegen der Einbahnstraße bewegt (siehe Abschnitt 3.2.6).

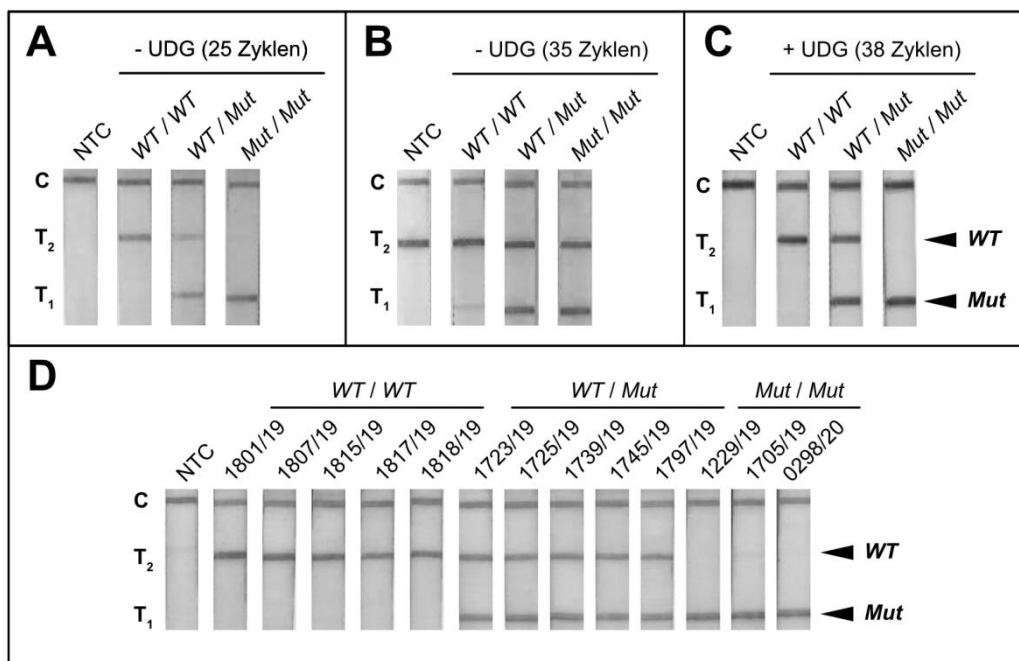


Abbildung 48 - Erarbeitung einer funktionellen ARMS-PCR zum Nachweis des FVL. **(A)** *multiplex*-ARMS-PCR an künstlichem *template* (gereinigten PCR-Fragment, 603 bp, ca. 10 je Reaktion, Primer: WT-for1g DIG, Mut-for2t BIO, Rev2-FITC), **(B)** *multiplex*-ARMS-PCR an genomischer DNA (ca. 20 ng je Reaktion, Primer: WT-for1g DIG, Mut-for2t BIO, Rev2-FITC), **(C)** singleplex ARMS-PCR an genomischer DNA (ca. 20 ng je Reaktion, Primerpaar 1: WT-for1g DIG und Rev2-FITC; Primerpaar 2: Mut-for2t BIO und Rev2-FITC). **(D)** Beide *singleplex* PCR's wurden hier über ein LFD analysiert. Je PCR an einem *template* wurden 2 µL Produkt einen MGH2 Streifen gegeben.

Über längeres Pausieren der Versuche, Reinigen des Equipments und vor allem über die Implementierung von dUTP's und der UDG in das Nachweissystem (Abschnitt 4.5.3.4.), konnte das

Kontaminationsproblem über die Zeit gelöst werden. Nichts desto trotz gelang es im Rahmen der Versuche nicht, einen robust funktionierenden *multiplex*-Nachweis zu etablieren. Sobald größere Mengen an Amplifikat in der Reaktion entstanden, tendierte insbesondere der verwendete WT-ARMS-Primer zu Unspezifitäten. Aus diesem Grund wurden zwei *singleplex* ARMS-PCRs zum separierten Nachweis des WT-Allels und des FVL-Allels durchgeführt. Die Produkte der beiden Amplifikationsreaktionen wurden gemischt und via Lateral Flow visualisiert. Aus der Abbildung 48 D geht hervor, dass dieser methodisch vereinfachte Ansatz sehr gut funktionierte. So konnten 13 Proben humaner genomischer DNA korrekt identifiziert werden (Abbildung 48 D). Aber auch hier kann man bei genauem Hinschauen schwache unspezifische Signale erahnen. Das fällt z.B. in der Probe 1705/19 (homozygot FVL-Mutation) auf Hohe des WT-Signals (T2-Linie) besonders auf. Nichts desto trotz ist die Intensität der resultierenden Signale so stark, sodass eine intuitive, schnelle und einfache Interpretation durchgehend gelingt.

4.7.3. Der Nachweis der FVL-Mutation mittels universeller PCR und *multiplex* post PCR-Hybridisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine einfache und schnelle post Amplifikations-Hybridisierungsstrategie erarbeitet, optimiert und die Anwendbarkeit gezeigt (Abschnitt 4.4.). Das FVL-Testsystem ist somit ein geeigneter Gradmesser, um die Spezifität dieser Methodik beurteilen zu können. Die Nachweisidee ist dabei sehr einfach. Mit einem unmarkierten *forward* Primer und einem FITC-markierten *reverse* Primer wird ein SNP-unabhängiges Amplifikat erzeugt (Abbildung 49 A). In der darauffolgenden Hybridisierungsreaktion werden zwei unterschiedlich markierte Sonden mit dem Amplifikat co-inkubiert. Dabei unterscheiden sich die Sonden ausschließlich in ihrer 5'-Markierung und der SNP-Position.

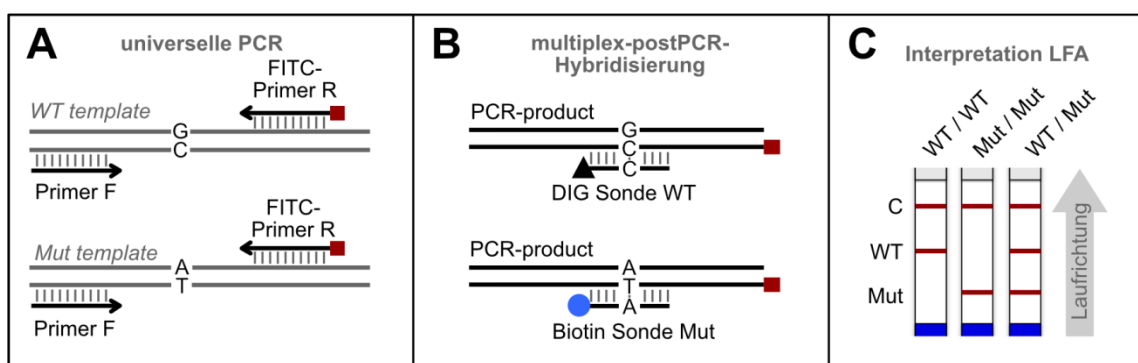


Abbildung 49 - Nachweis-Strategie der *multiplex* post PCR-Hybridisierung **(A)** Universelle PCR: ein universeller, unmarkierter forward Primer (Primer F) und ein FITC-markierter reverse Primer (FITC-Primer R) amplifizieren. **(B)** Im Anschluss an die Amplifikation wird eine *multiplex* post PCR-Hybridisierung durchgeführt. Dabei sind Digoxygenin- und Biotin-markierte Sonden in einem Hybridisierungscocktail enthalten. Der FVL-SNP definiert die Hybridisierung mit der jeweiligen Sonde. **(C)** Die Hybridisierungsprodukte sind via LFA detektierbar. Es kann zwischen den drei möglichen FVL-assozierten Genotypen unterschieden werden.

Die Digoxygenin markierte Sonde adressiert die WT-Variante und die Biotin-markierte Sonde adressiert die FVL-Mutation (Abbildung 49 B). Im Optimalfall lassen sich SNP-spezifische Hybridisierungsprodukte nun über den HybriDetect 2T Lateral Flow Teststreifen nachweisen

(Abbildung 49 C). Dabei kann zwischen allen möglichen FVL-assoziierten Genotypen unterschieden werden. Der Einbau einer zusätzlichen Kontrolle ist nicht erforderlich, da mindestens ein Signal zwingend erscheinen muss.

4.7.3.1. Spezifisch durch Anwesenheit beider Sonden

In einem Vorversuch wurde die grundlegende Funktionalität dieses einfachen methodischen Ansatzes überprüft. Dabei wurde, gemäß der bisher gesammelten Erkenntnisse, der Einfluss von Helfer-Oligonukleotiden beleuchtet. Auch in diesem Nachweis-Kontext scheinen Helfer eine entscheidende Rolle zu spielen. Ohne Faltungshelfer sind Hybridisierungsprodukte bei 50°C schwach erkennbar, bei gesteigerten Temperaturen verschwinden diese völlig (Abbildung 50). Unter Zugabe der Faltungshelfer sind eindeutig interpretierbare und starke Signale auch bei höheren Temperaturen auf dem Teststreifen zu sehen (Abbildung 50). Der Einfluss der Helfer wurde auch hier quantifiziert und die Signale um etwa das sechsfache verstärkt (Anhang, Abbildung 89). In diesem Versuch wurde ausschließlich mit WT-Amplifikat getestet. Dabei konnte recht deutlich gezeigt werden, dass in Anwesenheit von nur einer Allel-spezifischen Sonde ein Signal unabhängig vom Genotyp erzeugt wurde (Abbildung 50). In Anwesenheit beider SNP-spezifischer Sonden wurde das unspezifische Signal (Mut) drastisch reduziert, sodass ein spezifischer Nachweis des WT-Amplifikats gelang (Abbildung 50).

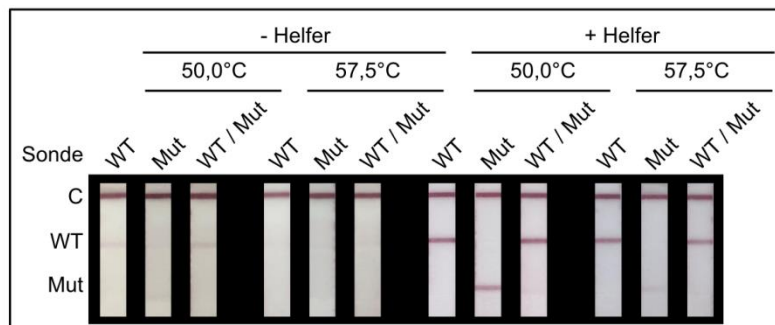


Abbildung 50 - Einfluss von Hybridisierungstemperatur, Helfer-Oligonukleotiden und Sonden-Pooling: Untersucht wurde die *multiplex* post PCR-Hybridisierung. Verwendet wurden gereinigte WT-Amplifikate in einer Konzentration von 2 ng je Hybridisierung.

Diese repräsentativen Ergebnisse der Voruntersuchungen erlaubten die schnelle Etablierung eines Hybridisierungsprotokolls, mit dem die eindeutige Genotypisierung in einem Reaktionsgefäß und mit einem LFD, auch unter Verwendung humaner gDNA gelingt. Deshalb wurde im Folgenden das klinische Praxisprobenset, bestehend aus 13 Proben humaner gDNA, untersucht. Diese Proben waren bereits klinisch via qRT-PCR voranalysiert und charakterisiert. Aus der Abbildung 51 geht hervor, dass der Test sehr gut und in vollständiger Übereinstimmung zu den Voranalysen funktionierte. Alle 13 Praxisproben wurden korrekt hinsichtlich des FVL-SNPs charakterisiert.

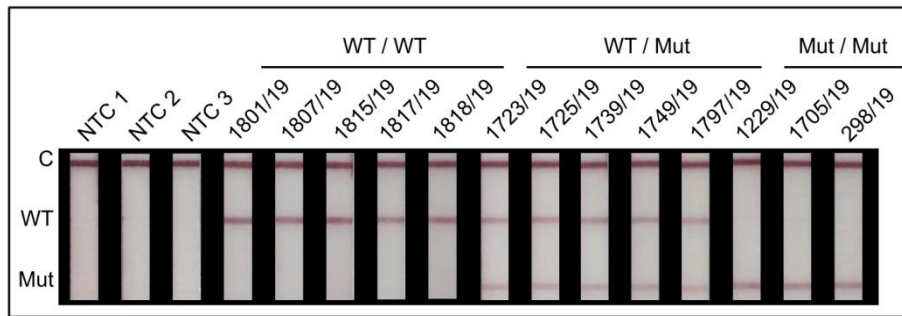


Abbildung 51 - Untersuchung des Praxisprobensets mit PCR und post PCR-Hybridisierung. Mitgeführt wurden drei Negativkontrollen (NTC – *no template control*), sowie 13 Praxisprobe mit den drei möglichen FVL-assoziierten Genotypen.

4.7.4. Der Nachweis der FVL-Mutation mittels Rep-rhAMP-LFA

In der vorliegenden Arbeit nimmt die Entwicklung Reporter-basierter, Lateral-Flow-kompatibler Amplifikationsnachweise einen wichtigen Teil ein (Abschnitt 4.6.). Bisher konnte die grundsätzliche Funktionalität der Rep-rhPCR-LFA im Kontext einer Identifikation einer bakteriellen Spezies gezeigt werden. Das Testsystem zur Erkennung der FVL-Mutation eignete sich in besonderem Maße, um die Spezifität dieser Nachweismethodik auf die Probe zu stellen.

4.7.4.1. Rep-rhPCR-LFA

Unmarkierte Primer stellten die Grundlage für eine SNP-unabhängige Amplifikation dar (Abbildung 52 A1). Die Reportersonde wurde so gestaltet, dass die RNA-Base den FVL-spezifischen SNP adressiert (Abbildung 52 A1). Kommt es zur korrekten Hybridisierung der SNP-Position, wird der Reporter im Optimalfall durch die RNase H2 geschnitten. Kommt es zu Fehlpaarung, sollte der Schnitt ausbleiben (Abbildung 52 A2). Diese Methode ermöglicht lediglich den Nachweis der WT-Variante oder Mut-Variante in einer Reaktion (Abbildung 52 C). Ein *multiplexing* war nicht möglich, da kein passendes Universal-LFD zur Auswertung zur Verfügung stand.

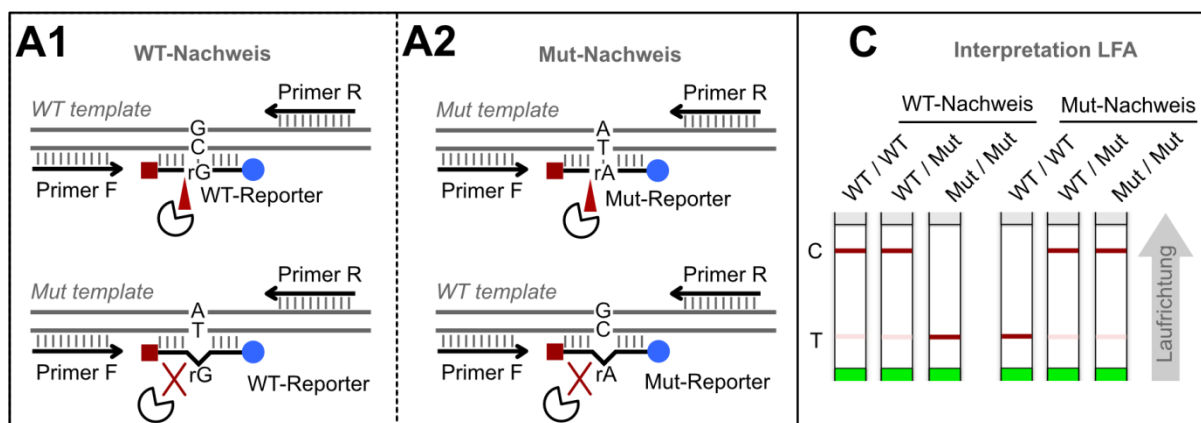


Abbildung 52 - Nachweis-Strategie der Rep-rhPCR-LFA zur Erkennung der FVL-Mutation. Der Nachweis erfolgt im *singleplex* Ansatz. (A1, A2) In jeweils einer Nachweisreaktion werden SNP-spezifische Reportersonden genutzt. Folglich gibt es eine WT-spezifische Nachweisreaktion und eine Mut-spezifische Nachweisreaktion. Im Optimalfall wird der SNP-spezifische Reporter nur dann durch die RNase H2 degradiert, wenn es zur Bindung zwischen RNA-Base (Reporter) und DNA-Base (*template* / PCR-Produkt) kommt. (B) Das Reaktionsprodukt wird über den HybriDetect ausgewertet. Verstärkte Signale auf der C-Linie und abgeschwächte Signale auf der T-Linie gehen mit einem für den jeweiligen Nachweis positiven Ergebnis einher.

Die Reaktionsprodukte wurden mithilfe des MGHD Teststreifens nachgewiesen. Zur vollständigen Beurteilung des FVL-SNPs sind zwei Amplifikationsreaktionen unter Verwendung der WT- und der Mut-Sonde, sowie die separierte Auswertung dieser beiden Reaktionen via LFA erforderlich. Ein positives Testergebnis ist durch eine verstärkte C-Linien-Intensität und u.U. eine Abschwächung der T-Linie gekennzeichnet. Im Umkehrschluss zeichnet sich ein negatives Ergebnis durch ausbleibende (oder sehr schwache) C-Linie und im Vergleich zur negativen Kontrolle unverändert starke T-Linie aus (Abbildung 52 C). Die Abbildung 53 zeigt das Ergebnis der Amplifikationsreaktion bei einer *Annealing*-Temperatur von 65°C unter Zuhilfenahme der WT-Reportersonde. Untersucht wurden die drei möglichen FVL-assoziierten Genotypen inklusive einer Negativkontrolle. Dabei wurde das WT-Allel sowohl in der Variante: WT-homozygot und WT-heterozygot erfolgreich und spezifisch erkannt.

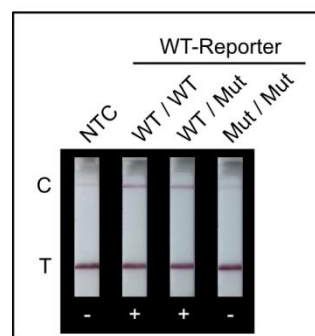


Abbildung 53 - Funktionalität der Rep-rhPCR-LFA. Verwendet wurde ausschließlich die Wildtyp-Reporter-Sonde für die Analyse der drei FVL-assoziierten Genotypen (gDNA, ca. 20 ng je PCR).

In Optimierungsversuchen konnte belegt werden, dass die Spezifität dieser Reaktion in erheblichem Maße von der Feineinstellung der *Annealing*-Temperatur abzuhängen scheint (Abbildung 54). Dabei gelang ein spezifischer Nachweis des WT-Allels > 62,3°C *Annealing* (Abbildung 54 A). Die Untersuchung der PCR-Produkte der Gradienten-PCR im Agarosegel bestätigte die Funktionalität der PCR bis 67,3°C *Annealing*, wobei die Amplifikatmenge bei einer Temperatur über 64,7°C abzunehmen scheint (Abbildung 54 B). Das spiegelte sich in gewissem Maße auch in der Reporterdegradierung wider. Bei 67,3°C wurde deutlich weniger Produkt generiert und auch das Maß der Reporterdegradierung war sichtbar reduziert (Abbildung 54 A).

Bei 65°C *Annealing* wurden Folgeanalysen durchgeführt. Um die Spezifität der Analyse potentiell weiter zu verbessern wurden sogenannte Block-Sonden in das Nachweissystem implementiert. Hierbei handelt es sich um einfache DNA-Sonden, die elongationsblockiert sind, damit sie in der Nachweisreaktion nicht als zusätzlicher Primer fungieren können. Beim Nachweis des WT-Genotypen wird eine Mut-spezifische Block-Sonde implementiert und beim Nachweis des Mut-Genotyps eine WT-spezifische Block-Sonde. Die Idee zu diesem Ansatz leitet sich anhand vorher präsentierter Ergebnisse ab. Beim Nachweis der FVL-Mutation über universelle PCR und anschließende post PCR-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit beider Allel-spezifischer Sonden einen deutlich positiven Einfluss auf die Nachweisgenauigkeit nimmt (Abschnitt 4.7.3.1.)

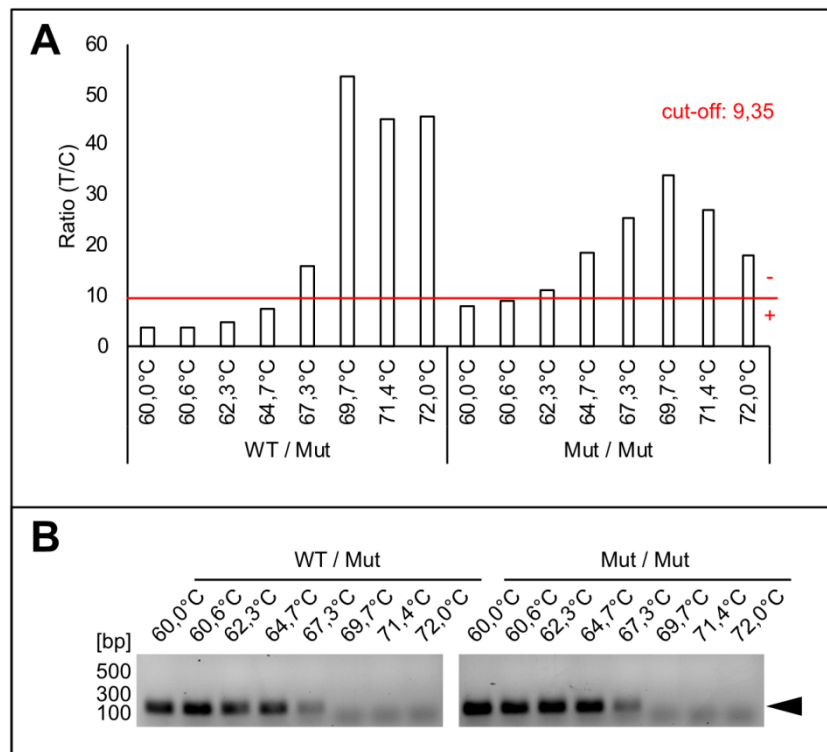


Abbildung 54 - Einfluss der *Annealing*-Temperatur auf die Spezifität der Reporterdegradierung. **(A)** Das Säulendiagramm verdeutlicht die Resultate der Rep-rhPCR-LFA. Untersucht wurden der heterozygote FVL-Genotyp, sowie homozygote Variante der FVL-Mutation bei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen zwischen 60 und 72°C. Die rote Linie repräsentiert den errechneten *cut-off*. Oberhalb der Linie sind die errechneten Ratios (T/C) negativ zu bewerten. Wenn dieser Wert den *cut-off* unterschreitet ist der Test positiv zu werten. **(B)** Zusätzlich wurden die PCR-Produkte im Agarosegel analysiert. Das zu erwartende Fragment hat eine Größe von 140 bp (schwarze Dreieck).

.Bei der Identifikation relevanter Bierschädiger mittels PCR und post-PCR Hybridisierung konnten unerwünschte Hybridisierungsprodukte durch Spezifitätshelfer eliminiert werden (Abschnitt 4.4.3.) Aus diesen Gründen wurde der Einfluss von Block-Sonden im Kontext der Rep-rhPCR-LFA genauer beleuchtet, in der Hoffnung eine spezifische und robuste Nachweisführung ermöglichen zu können (Abbildung 55).

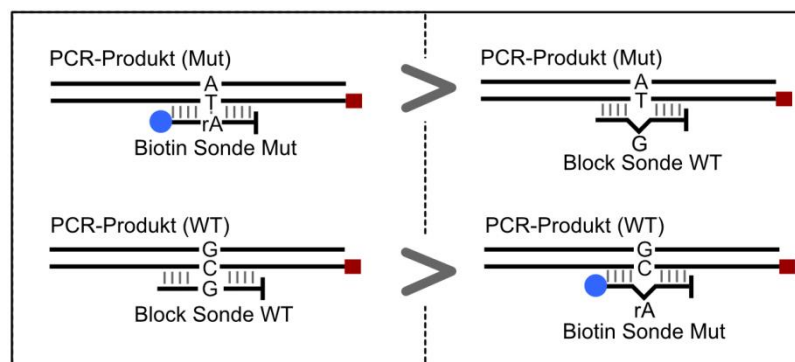


Abbildung 55 - Rep-rhPCR unter Verwendung von nicht degradierbaren Block-Sonden. Verbildlicht am Beispiel des Nachweises der FVL-Mutation. Zusätzlich zur biotinylierten FVL-Mut-Reporter-Sonde wird eine elongationsblockierte WT-Sonde ohne RNA-Base in den PCR-Mix gegeben. Die Anwesenheit der Block-Sonde soll die Nachweisgenauigkeit erhöhen und vor Fehlhybridisierung schützen.

Es wurden vier verschiedene Reaktionsmische mit unterschiedlichen Reporter-Sonden-Kombinationen hergestellt und anschließend mit gDNA-Proben (homozygot WT, homozygot Mut, heterozygot) und

einer NTC in Mehrfachbestimmung getestet. Diese Reaktionsmische beinhalteten die Allel-spezifischen Reporter-Sonden, sowie die beschriebenen Block-Sonden. Auf diese Art und Weise sollte der Einfluss der Block-Sonden genauer untersucht werden (Abbildung 56).

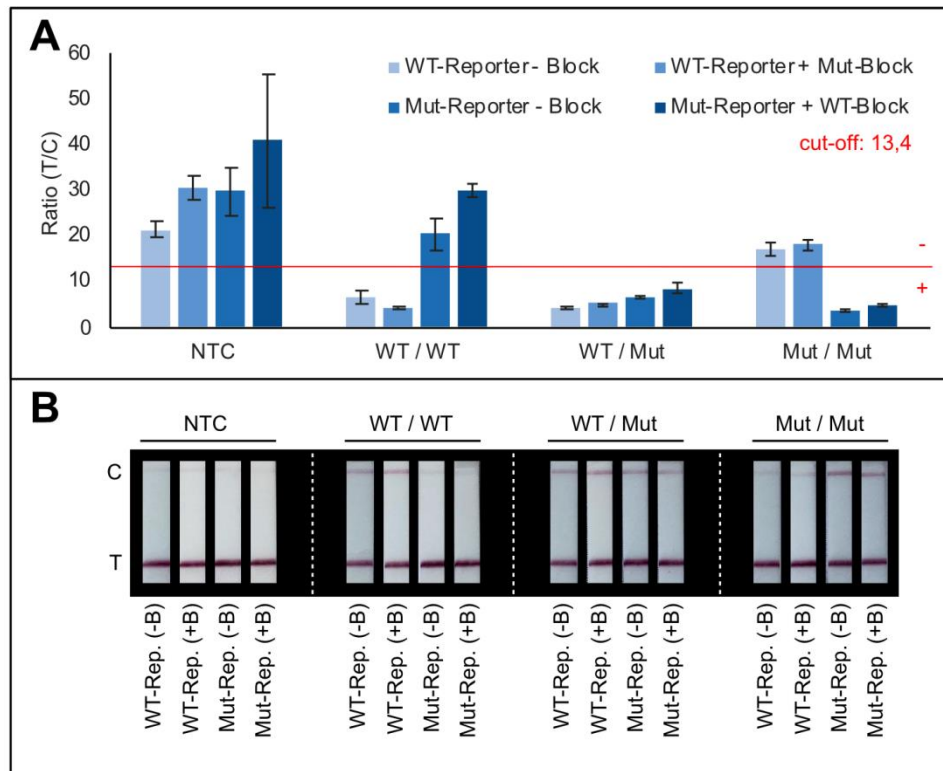


Abbildung 56 - Spezifitätsuntersuchung und Einfluss von Block-Sonden. **(A)** Rep-rhPCR-LFA zur Bestimmung der FVL-Mutation mit verschiedenen Reporter-Sonden-Kombinationen (WT-Rep., WT-Rep mit Mut-Block, Mut-Rep., Mut-Rep mit WT-Block) in Dreifachbestimmung. Überprüft wurden die *templates*: Negativkontrollen (NTC), homozygoter Wildtyp (WT / WT), heterozygot (WT / Mut) und homozygot FVL-Mutation (Mut / Mut). Dargestellt sind Mittelwerte der errechneten Ratios (T/C) in Form eines Säulendiagramms. Der errechnete *cut-off* wird durch die rote Linie angezeigt. Oberhalb des *cut-off* (Werte > 13,4) sind als negativ zu werten und Werte <13,4 sind positiv zu werten. **(B)** Repräsentative Teststreifen aus der in (A) beschriebenen Analyse. Ohne Block-Sonde ist durch „-B“ gekennzeichnet und mit Block-Sonde durch „+B“.

Dabei wurde gezeigt, dass der Allel-spezifische Nachweis in allen Konstellationen grundsätzlich gelang. Die Block-Sonden hatten im gewählten Testansatz weder einen positiven, noch einen negativen Einfluss auf die Nachweisbarkeit. Da die Funktionalität der *singleplex* Nachweise gezeigt werden konnte, wurde auch hier das klinische Praxisprobenset für eine abschließende Analyse herangezogen (Abbildung 57). Untersucht wurden 14 Proben, eine kommerziell humane gDNA (Promega, FVL: WT / WT) sowie eine NTC in Doppelbestimmung. Dabei wurden 28 von 30 Proben korrekt genotypisiert. In der Probe 14 (1229.2/19; Mut/Mut) wurde in einer von zwei Bestimmungen fälschlicherweise WT-DNA nachgewiesen. Diese Probe wurde z.B. in ARMS und post PCR-Hybridisierungsansatz nicht mitgeführt, weil immer wieder falsch positive Ergebnisse generiert wurden. Der Verdacht einer Kontamination mit WT-DNA lag nahe. Weiterhin wurde in der Probe 12 (1723/19, WT/Mut) in einer von zwei Bestimmungen fälschlicherweise homozygot WT nachgewiesen.

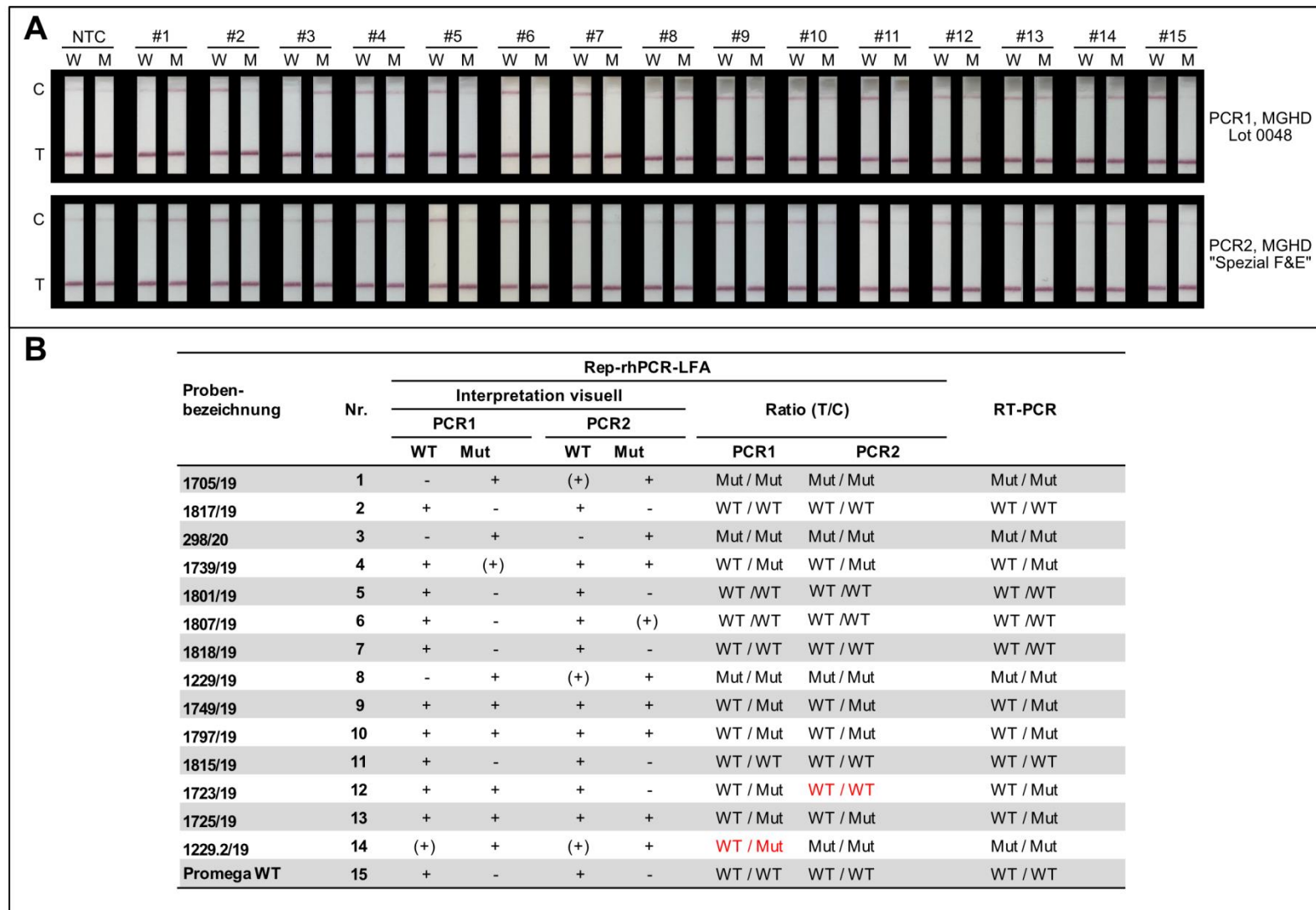


Abbildung 57 - Rep-rhPCR-LFA zum Nachweis der FVL-Mutation – Analyse eines Praxisprobensets. **(A)** Analysiert wurden 15 bereits charakterisierte humane gDNA-templates inklusive der *no template control* (NTC). Dabei wurde die Proben in Doppelbestimmung analysiert und mit unterschiedlichen Teststreifen Chargen ausgewertet. Verwendet wurden je template zwei unterschiedliche PCR-Mixe, die sich nur durch die Sondenzusammensetzung unterschieden (W – WT-Reporter-Sonde inkl. Mut-Block-Sonde, M – Mut-Reporter-Sonde inkl. WT-Block-Sonde). **(B)** Übersichtstabelle zur Ergebnisinterpretation der Streifen aus (A). Unterschieden wird dabei zwischen der Auswertung mit bloßem Auge und quantitativer Analyse (Ratio: T/C). „-“ symbolisiert ein negatives Ergebnis, „+“ symbolisiert ein positives Resultat und „(+)" symbolisiert ein schwach positives Resultat.

4.7.4.2. Isothermale Amplifikation und Reporter-basierter Nachweis (Rep-rhLAMP-LFA)

Da mittels Rep-rhPCR-LFA eine grundsätzliche SNP-Diskriminierung gelang, wurde im Folgenden die Kompatibilität der Reporterdegradierung durch RNase H2 mit einer isothermalen Amplifikationsmethode, der *Loop mediated isothermal Amplication* (LAMP) kombiniert (Abbildung 58). Der Vorteil einer LAMP ist unter anderem, dass sich diese Methode besser als die PCR für echte *Point-of-Need*-Anwendungen eignet (Abschnitt 1.3.3.1.). Die Amplifikation erfolgt bei einer konstanten Temperatur von etwa 65°C, wodurch zyklisches Heizen und Kühlen der Reaktion entfällt und den Einsatz einfacher Heizblöcke oder Wasserbäder ermöglicht (Notomi *et al.*, 2000). Die RNase H2 ist laut Hersteller zwischen 50-75°C funktionell, was für die Kompatibilität während der LAMP spricht.

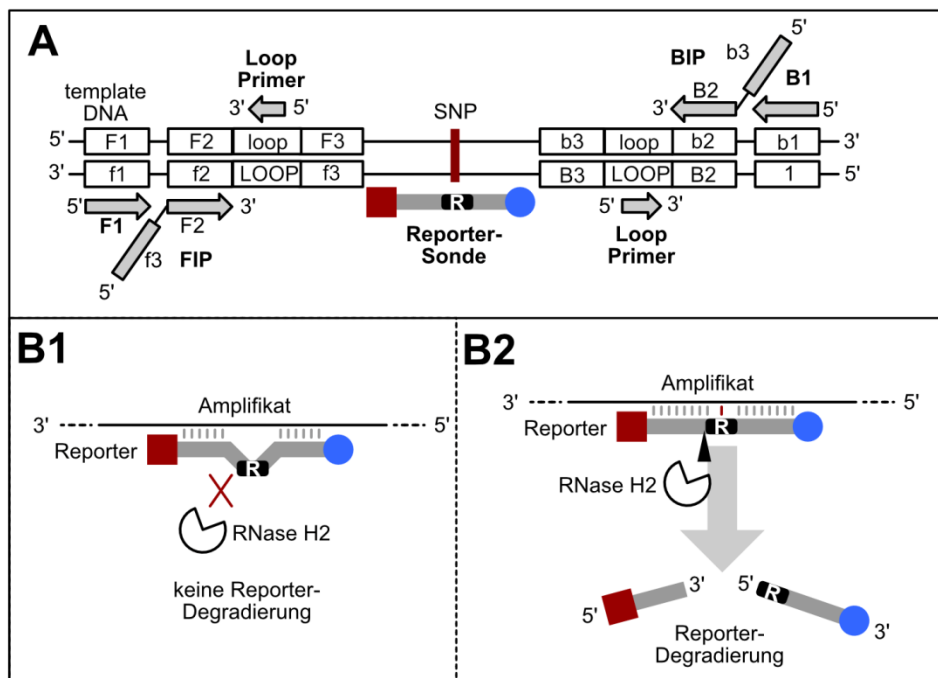


Abbildung 58 - Funktionsprinzip der Rep-rhLAMP (A) Für die LAMP wurden sechs unmarkierte Primer (graue Pfeile) und jeweils eine Reportersonde (WT und FVL-Mut.) genutzt. Kommt es im Zuge der Amplifikationsreaktion zur Bindung der Reportersonde und zur Ausbildung des RNA-DNA-Hybrids wird die Sonde durch die RNase H2 degradiert (B2). Bleibt die SNP-spezifische Hybridisierung aus kann der Reporter nicht „geschnitten“ werden (B1).

Die Positionierung der Primer wurde so gewählt, dass der SNP im zu amplifizierenden Bereich liegt und für eine Hybridisierung der Reportersonde während der Amplifikationsreaktion zur Verfügung steht (Abbildung 58 A). In Ermangelung eines adäquaten LFDs handelt es sich auch hier um einen *singleplex* Nachweis, über den entweder das WT-Allel oder Mut-Allel erkannt werden kann. Für eine vollständige Genotypisierung dieses SNPs durch LAMP-LFA werden also zwei unabhängige Nachweisreaktionen benötigt (Abbildung 52 C). In einem ersten Schritt wurde die grundsätzliche Funktionalität der LAMP untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass in Anwesenheit humaner gDNA eine Amplifikation stattfindet und die Größe des kleinsten Amplifikats schätzungsweise der erwarteten Größe von 221 bp entspricht (Abbildung 59, AGE). Unter Zugabe der WT-Reportersonde und der

RNase H2 wurde zusätzlich eine Reporterdegradierung bestätigt (Abbildung 59, LFA). Das grundlegende Nachweisprinzip erwies sich folglich als funktionell. Leider konnte keine Diskriminierung zwischen WT- und Mut-Allel unter den gewählten Testbedingungen erreicht werden. Unter Nutzung der WT-Sonde wurden alle drei möglichen FVL-assoziierten Genotypen erkannt. In jedem Fall kam es zur Degradierung der Reportersonde. Weitere Optimierungsversuche hinsichtlich Inkubationstemperatur, Anwesenheit zusätzlicher Block-Sonden (Abschnitt 4.7.4.1.) oder ReaktionsAdditive führten zu keiner Verbesserung der Nachweis-Spezifität. Trotzdem wird dieses Resultat gerade aus methodischer Sicht als bedeutsam erachtet, da die grundlegende Kompatibilität der RNase H2 basierten Reporterdegradierung auch im Kontext einer isothermalen DNA-Amplifikationsmethode gezeigt werden konnte.

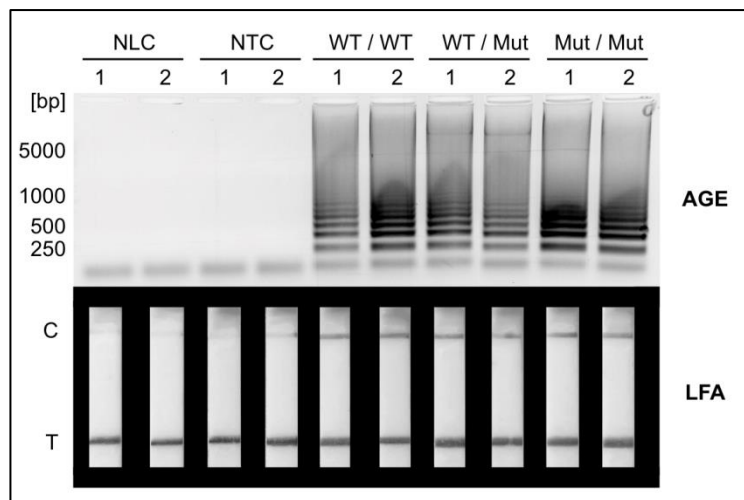


Abbildung 59 – Nachweis der Faktor V Leiden Mutation mit der Rep-rhLAMP-LFA. Auswertung der LAMP-Produkte via AGE und LFA. (NLC: *No LAMP control* – keine Amplifikation; NTC: *No template control*; WT / WT: homozygot Wildtyp; WT / Mut: heterozygot; Mut / Mut: homozygot Mutante; Analysen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt: 1 bzw 2).

5. Diskussion

Der innovative Kern und fachliche Schwerpunkt dieser Arbeit liegt vornehmlich auf der Seite der zugrunde liegenden Methodik, die für die Etablierung verschiedenster Nachweissysteme genutzt wurde. Nachfolgend werden die Ergebnisse unter den Themenschwerpunkten: Funktionalität / Praxisrelevanz, methodische Limitationen und damit einhergehende Innovationen, sowie Reporter-basierte Nachweismethoden für NALFIAs diskutiert und abschließend zusammengefasst.

5.1. Teil I - Die Entwicklung verschiedener NALFIAs: Funktionalität und Praxisrelevanz

5.1.1. Der Nachweis bierschädigender Bakterien

Bier ist ein sehr altes Lebensmittel, das sich weltweit großer Beliebtheit erfreut (Yao *et al.*, 2018). Die Abteilung der Qualitätskontrolle nimmt heutzutage i.d.R. eine sehr wichtige Stellung innerhalb der Brauerei ein. Die Aufrechterhaltung qualitativer Ansprüche an das Produkt ist der Antrieb umfangreicher, kontinuierlicher Analysen, bei denen mikrobiologische Prüfungen einen wesentlichen Teil der Arbeit ausmachen (Turvey *et al.*, 2017).

Grundsätzlich ist Bier als schwer zu besiedelnder Lebensraum für Mikroorganismen charakterisiert (Vriesekoop *et al.*, 2012). In der Literatur werden insbesondere der niedrige pH-Wert, die Abwesenheit von Sauerstoff, der Alkoholgehalt, Nährstoffarmut und die Anwesenheit antimikrobieller Hopfenbitterstoffe als relevante Wachstumsbarrieren für Mikroorganismen beschrieben (Simpson *et al.*, 1992 / Hayaschi *et al.*, 2001 / Behr und Vogel *et al.*, 2010 / Schurr *et al.*, 2015 / Feyereisen *et al.*, 2020). Trotzdem existieren einige stark spezialisierte bierschädigende Bakterien (BSB), die nicht nur in der Lage sind im Bier zu wachsen, sondern auch das Produkt nachhaltig zu schädigen (Vriesekoop *et al.*, 2012 / Kajala *et al.*, 2017). Hierzu zählen vorrangig Organismen der Ordnung *Lactobacillales* (Milchsäurebakterien), zu denen obligate Bierschädiger wie *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus backi*, *Lactobacillus linderni*, *Lactobacillus (para-)collinoides* oder *Pediococcus damnosus* zählen (Jespersen und Jakobsen, 1996 / Schneiderbanger *et al.*, 2018). Neben diesen grampositiven Milchsäurebakterien existieren auch obligat anaerobe gramnegative Schädiger, die hauptsächlich den Gattungen *Pectinatus* oder *Megasphaera* angehören (Paradh *et al.*, 2014 / Bergsveinson *et al.*, 2017 / Rodríguez-Saavedra *et al.*, 2021). Bakterielle Kontaminationen können mit massiven Produktschädigungen einhergehen. Hierzu zählen Beeinträchtigungen der Fermentations-*Performance*, des Geschmacks, des Geruchs und der Textur. Aber auch Eintrübung und Sedimentierung sind charakteristische Schadbilder, die durch BSB verursacht werden (Vriesekoop *et al.*, 2012 / Turvey *et al.*, 2017). Schwerwiegende mikrobiologische „Schwierigkeiten“ können im schlimmsten Fall fatale Folgen für eine Brauerei haben. So können

Reklamationen, Schädigung der Markenidentität und erforderliche Gegenmaßnahmen zu signifikanten wirtschaftlichen Schäden führen.

BSB schnell, sicher und empfindlich nachweisen zu können, ist ein wichtiger Schlüssel für eine effiziente mikrobiologische Stufenkontrolle in der Brauerei. Die selektive Kultivierung ist dabei die am weitesten verbreitete Methode zur Erkennung von Eintragungen dieser Schädiger (Turvey *et al.*, 2017). Alternative Nachweismethoden, wie die PCR, Microarrays, MALDI-TOF oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen wurden dabei in den letzten 15 Jahren mit zunehmender Häufigkeit präsentiert und rückten zusehend in Fokus großer und mittelgroßer Brauereibetriebe (Weber *et al.*, 2008 / Asano *et al.*, 2009 / Behr *et al.*, 2016 / Kern *et al.*, 2014 / Asano *et al.*, 2019). Die klassische Kultivierung kann u.U. zeitaufwändig sein. Dabei ist der Zeitfaktor in modernen Großbrauereien sehr häufig eine limitierende Komponente im wirtschaftlichen Gesamtgefüge des Unternehmens. Dieser Umstand erklärt das steigende Interesse an sensitiven und schnellen molekularbiologischen Methoden, die nicht nur einfach, sondern auch zuverlässig funktionieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Nachweise bierschädigender Bakterien erarbeitet. Im Folgenden werden die Funktionalität, Test-*Performance*, sowie die potentielle Nutzbarkeit in der Praxis diskutiert.

5.1.1.1. Nachweis historisch neuer Bierschädiger – *L. rossiae* und *L. cerevisiae*

Ziel war es zwei historisch „neue“ bierschädigende Bakterien aus der Gruppe der Milchsäurebakterien zu identifizieren. Bei einem dieser beiden Organismen handelt es sich um *L. cerevisiae*, welcher 2017 erstmalig durch Koob *et al.* beschrieben wurde. Isoliert wurde *L. cerevisiae* aus kontaminiertem Bier und zunächst fälschlicherweise der Spezies *Lactobacillus parabrevis* zugeordnet. Das Produktschädigende Potenzial ist vergleichbar zu *Lactobacillus brevis*, dem häufigsten obligaten bakteriellen Produktschädiger der Brauindustrie (Schneiderbanger *et al.*, 2018). *Lactobacillus rossiae*, die zweite zu identifizierende Spezies, ist in der Literatur als phänotypisch und genotypisch variabler Organismus beschrieben, der 2005 erstmalig aus Sauerteig isoliert wurde (Corsetti *et al.*, 2005). *L. rossiae* wurde erst später als potenziell bierschädigender Organismus klassifiziert und bereits mehrfach als Produktschädiger in der Praxis isoliert und beschrieben (Schneiderbanger *et al.*, 2018 / Schneiderbanger *et al.*, 2019). Beide Vertreter der Gattung *Lactobacillus* sind historisch vergleichsweise neu und auch wenn kommerzielle Tests diese Organismen z.T. mit erfassen, so existieren bislang keine einfachen qualitativen Methoden zur schnellen Identifikation.

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein verhältnismäßig einfacher Identifikationsnachweis für die beiden Bierschädiger *Lactobacillus cerevisiae* und *Lactobacillus rossiae* präsentiert werden. Ohne DNA-Extraktion gelang die Identifikation aus einer Vorkultivierung (Zellzahl von mind. $1 \cdot 10^3$ bis $1 \cdot 10^4$ cfu / mL) oder direkt an Zellmaterial einer Kolonie vom Festmedium. Unter den gewählten Testbedingungen erwiesen sich beide Nachweise als spezifisch und robust. Das Spektrum potentiell relevanter Organismen kann insbesondere in Abhängigkeit zur Selektivität der

gewählten Vorkultivierungsmethode sehr umfangreich sein, was die Bedeutung einer weiterführenden, umfassenderen Spezifitätsanalyse unterstreicht. Sowohl Geräte-, Reagenzienaufwand, sowie die Komplexität der Handhabung und die Einfachheit der Interpretation heben sich positiv von alternativen Nachweistechiken wie MALDI-TOF-MS, RT-PCR oder FISH ab und sind einem Brauerei-mikrobiologischen Labor aus eigener Erfahrung durchaus zuzutrauen. Aufgrund der Robustheit, Geschwindigkeit, sowie Anwesenheit einer echten Amplifikationskontrolle könnten die hier präsentierten NALFIAS einen spürbaren Mehrwert zu den eingangs beschriebenen Standard Methoden der Brauerei-Mikrobiologie beitragen.

5.1.1.2. Eine alternative NALFIA-Methode zur Identifikation von *L. lindneri*

Für diesen Test wurde eine RNase H2-abhängige PCR unter Verwendung einer speziell konzipierten Reportersonde mit einem LFA kombiniert (Abschnitt 4.6.1.). Der Nachweis von *L. lindneri* wurde primär genutzt, um die zugrundeliegende Methodik besser zu verstehen, zu optimieren und diese auf Funktionalität zu prüfen. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass diese Nachweistechnik grundsätzlich sicher und reproduzierbar funktioniert (Abschnitt 4.6.1.1.). Dabei gelingt ein spezifischer und sensitiver Nachweis, mit dem 2 bis 20 KBE je Reaktion zu einem positiven Testresultat führen können (Abschnitt 4.6.1.2.). Jedoch mangelte es diesen Ergebnissen an Reproduzierbarkeit, was auf das genutzte LFD zurückzuführen war (Abbildung 43). Dieses scheint nicht auf die Reporter-basierte Nachweismethodik zugeschnitten zu sein und wird deshalb an späterer Stelle, im Kontext NALFIA-spezifischer Limitationen, genauer diskutiert. Das Nachweissystem beinhaltet keine Amplifikationskontrolle und wurde hinsichtlich der Kompatibilität für eine etwaige *direkt* PCR nicht genauer charakterisiert. Obwohl *L. lindneri* zu den wichtigsten und häufigsten obligat bierschädigenden Organismen zählt, so ist diesem einfachen und ggf. schnellen Identifikationsnachweis trotzdem wenig Praxisrelevanz anzurechnen (Back *et al.*, 1996 / Sakamoto *et al.*, 2003 / Schneiderbanger *et al.*, 2018). Ferner kann die zugrundeliegende Methodik zukünftig ein interessanter und wichtiger Baustein für einfache und praxistaugliche Nachweisformate sein, die auch in der Brauereimikrobiologie Relevanz haben könnten.

5.1.1.3. Identifizierung verschiedener Bierschädiger – eine PCR, sieben Resultate

Nach Besuchen von über 30 mikrobiologischen Laboren deutscher Brauereien lässt sich aus persönlicher Erfahrung bestätigen, dass die selektive Kultivierung und anschließende mikroskopische Analyse mikrobiologischer Anreicherungen, die am weitesten verbreiteten *in house* Methoden zur mikrobiologischen Begutachtung darstellen. Aus zahlreichen Gesprächen mit Mitarbeitern der Qualitätskontrolle ließ sich entnehmen, dass gerade die Mikroskopie für viele ein Unsicherheitsfaktor darstellt. Viel „Hintergrund“ (Hefen, Proteinaggregate, bakterielle Begleitflora) erschwert die ohnehin diffizile Identifikation von Bierschädigern aus Anreicherungen. Aus diesem Grund bewerteten viele Labormitarbeiter weiterführende, einfache und sichere Identifikationsmethoden als Bereicherung für

die interne Analytik. Deshalb schien die Entwicklung eines NALFIAs zur Identifikation der wichtigsten bzw. häufigsten bierschädigenden Bakterien sinnvoll.

Methodisch sollte dabei eine einfache PCR zur Amplifikation eines Gruppen-spezifischen Amplifikats mit verschiedenen spezies-spezifischen post PCR-Hybridisierungsreaktionen kombiniert werden (Abschnitt 4.4.1., Abbildung 26). Adressiert wurden die Schädiger *L. brevis*, *L. backi*, *L. lindneri*, *L. (para-)collinoides*, *L. (para-)casei*, *L. rossiae* und *P. damnosus*. Analog zum Identifikationsnachweis von *L. lindneri* mittels Rep-rhPCR-LFA stand auch hier, trotz Praxisrelevanz, die methodische Komponente in der Nachweisentwicklung im Vordergrund. Die Funktionalität und Nutzbarkeit der optimierten post PCR-Hybridisierung sollte genauer überprüft werden. Unter Verwendung von sogenannten Helfer-Oligonukleotiden gelang die Identifikation der genannten Organismen mit einigen Einschränkungen (Abbildung 31). In einem abschließenden Test offenbarten sich Spezifitätsprobleme, die sich wahrscheinlich durch Optimierung beheben ließen (Anhang, Tabelle 29). Grundsätzlich eignet sich diese Methode für eine direkte Analytik ohne vorherige DNA-Extraktion. Die Implementierung einer Amplifikationskontrolle bzw. Hybridisierungskontrolle, sowie umfangreichere Tests hinsichtlich Nachweissensitivität und Spezifität sind sicherlich wichtige Punkte, um die tatsächliche Praxistauglichkeit dieses Nachweissystems beurteilen zu können. Erarbeitete methodische Fortschritte hinsichtlich einer einfachen, schnellen und universellen Hybridisierungstechnik werden im Kontext dieser Arbeit als wichtige Bausteine für die Entwicklung zukünftiger Assays verstanden, die dann auch in der Brauereimikrobiologie zum Tragen kommen können. *Multiplexing* der Amplifikationsreaktionen, nachgeschaltete Hybridisierungen, sowie die Darstellung auf einem (universellen) LFD sind in diesem Kontext besonders relevante Aspekte zukünftiger Arbeiten. Die folgende Tabelle liefert einen abschließenden Überblick über die erarbeiteten Nachweissysteme für BSB mit unterschiedlichster praktischer Relevanz.

Tabelle 18 - Übersicht zu den Nachweissystemen bierschädigender Bakterien

Organismus	<i>L. rossiae</i>	<i>L. cerevisiae</i>	<i>L. lindneri</i>	LBPC-Ident ⁵
Nachweisstrategie	duplex PCR, endständig markierte Primer	duplex PCR, endständig markierte Primer	Reporter basierte RNase H2-abhängige PCR	singleplex PCR mit post PCR-Hybridisierung
genetisches Ziel	16S rRNA	rpoB	23S rRNA	23S rRNA
Setup bei RT	ja	ja	nein	ja
Kompatibilität NBB-B®	ja	ja	?	ja
DNA-Extraktion	nein	nein	(ja)	nein
Verwendetes LFD	MGHD2	MGHD2	MGHD	MGHD / MGHD2
IAC	ja	ja	nein	nein
untere Nachweisgrenze	ca. 2 bis 20 KBE	ca. 20 KBE	ca. 2 bis 20 KBE	ca. 2 bis 20 KBE
Spezifität	+++	+++	(+++)	(++)
Analysedauer	ca. 1h	ca. 1h	ca. 1h / 0,5h	ca. 1h / 0,5h

⁵ „LBPC-Ident“ umfasst die Identifikation von *L. brevis*, *L. backi*, *L. lindneri*, *L. (para-)collinoides*, *L. (para-)casei*, *L. rossiae* und *P. damnosus*.

5.1.1.4. Der Nutzen von NALFIAs– eine orientierende Einschätzung am Beispiel der Brauereimikrobiologie

Wie bereits beschrieben, werden in den meisten deutschen, mikrobiologischen Laboren mittelgroßer bis großer Brauereien präferiert selektive Kultivierungsmethoden mit mikroskopischen Bestätigungstechniken zur Erkennung mikrobiologischer Beanstandungen kombiniert (Turvey *et al.*, 2017). Insbesondere für diese Zielgruppe können stark vereinfachte NALFIA-Technologien einen spürbaren Beitrag für eine verbesserte *in house* Analytik leisten. Im Vergleich zu kommerziell bestehenden RT-PCR-Systemen, die durchaus national und insbesondere international an größeren Brauereistandorten zu finden sind, hebt sich die hier beschriebene Technik durch methodische Vereinfachung ab. Die Minimierung des *liquid handlings* (Abschnitt 3.2.2.2.1), der Verzicht aufwändiger DNA-Extraktionsschritte (Abschnitt 4.1.3), sowie die schnelle und intuitive Auswertung (Abschnitt 4.1) sind wichtige Facetten, die dazu beitragen, dass auch molekularbiologisch unerfahrenes Personal mit diesem Nachweissystem sicher umgehen kann. Die finanzielle Hürde für die Einführung einer solchen Methode ist trotz der Erfordernis eines Thermocyclers, der aktuell mit deutlich weniger als 4000€ zu Buche schlagen kann (Bsp.: Sensoquest Labcycler 48s), im Vergleich zu RT-PCR oder gar MALDI-TOF-MS i.d.R. vergleichsweise niedrig. Die in Brauereien ebenfalls anzutreffende Fluoreszenzmikroskopie, die auf der Technik der *fluorescence in situ hybridization* (FISH) beruht, hebt sich bspw. mit einer etwas geringeren Nachweisempfindlichkeit von den hier präsentierten NALFIA-Methoden ab (Asano *et al.*, 2009,). Limitiert werden diese in der Praxis insbesondere durch das eingeschränkte Multiplexing, sowie der Gefahr von *handling*-Fehlern und *carryover* Kontamination. Auf diese Punkte wird in den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.3 detailliert eingegangen. Diese grundlegende Einordnung der NALFIA-Technologie am Beispiel der Brauereimikrobiologie lässt sich mit ähnlicher Tendenz auf andere Fragestellungen (präferiert in der Lebensmittelindustrie) übertragen. Die folgende Tabelle liefert einen orientierenden Vergleich der in diesem Kapitel aufgegriffenen Techniken.

Tabelle 19 – Vergleich von NALFIAs mit den alternativen Nachweismethoden qRT-PCR, MALDI-TOF-MS und FISH

Nachweis-Eigenschaften	NALFIA	RT-qPCR	MALDI-TOF-MS	FISH
Empfindlichkeit	++	+++	+	+
Spezifität	+++	+++	+++	+++
Analysegeschwindigkeit	++ / +++	++	+++	+++
Multiplexing	+	+++	-	+
Analytik aus Mischkulturen	+++	+++	-	++
Kosten (Gerätefaktor)	+	++	+++	+
Kosten (Verbrauchsmaterial)	++	++	+	++
<i>carryover</i> Kontamination	(+++)	(+)	-	-
Komplexität Abarbeitung	+	+++	+	++
Komplexität Ergebnisinterpretation	+	+++	+	++

5.1.2. Ein alternativer Homo-/ Heteroplasmie-Schnelltest

Chlamydomonas reinhardtii ist eine einzellige Grünalge, die sich vom Modellorganismus für Fotosynthese und Chloroplasten-Biogenese zu einem biotechnologisch relevanten Organismus entwickelt hat (Harris, 2001 / Scaife *et al.*, 2015). Die Transformierbarkeit von Zellkern, Plastom und Mitochondrium ist eine wichtige Voraussetzung für biotechnologische Anwendungen (Kindle *et al.*, 1989 / Boynton und Gillham, 1996 / Boynton *et al.*, 1998). Im Jahr 2015 präsentierten Bertalan und Kollegen eine einfache, Marker-freie Plattform zur gezielten Herstellung von stabilen Chloroplasten-Transformanten (Bertalan *et al.*, 2015). Eine essentielle Analyse zur Beurteilung von Chloroplasten-Transformanten ist der Grad der Homo- bzw. Heteroplasmie des Plastoms der Grünlage. Hierüber definiert sich nicht nur die genetische Stabilität, sondern auch die Bedingungen, unter denen die Transformanten kultiviert bzw. charakterisiert werden können (Bateman und Purton *et al.*, 2000 / Fischer *et al.*, 1996). Eine sehr häufig verwendete Methode zur Beurteilung der Homo- / Heteroplasmie ist die Southern Blot Analyse (Sambrook *et al.*, 1989). Diese Methode ist zeit- und materialaufwändig. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine einfache PCR-LFA Methode entwickelt, mit der Transformanten (nach Bertalan *et al.*, 2015) hinsichtlich Homo-/ Heteroplasmie beurteilt werden können. In weniger als zwei Stunden kann 1 Kopie des Rezipientenplastoms unter 1.000 bis 10.000 Kopien des Transformantenplastoms detektiert werden (Abbildung 22 C). Somit funktioniert das Testsystem um den Faktor 10-100 empfindlicher als die parallel getestete Southern Blot Analyse (Abbildung 23). Dieser Nachweis beruht auf der Anwesenheit des komplementierten *psbA*-Gens, sodass keine Aussagen zur Vollständigkeit der Insertion getroffen werden können (Abbildung 21). Somit ersetzt der entwickelte Test die Southern Blot Analyse nicht vollständig, kann aber eine Bereicherung im Sinne eines kontinuierlichen Monitorings von Transformanten und Kulturen sein. Der alternative Homo-/ Heteroplasmie-Schnelltest ist einfach abzuarbeiten, beinhaltet eine Art interne Amplifikationskontrolle und spart Zeit und Ressourcen. Der Test bedient eine sehr kleine, biotechnologisch relevante Nische, was die tatsächliche Praxisrelevanz schmälert. Im übergeordneten Kontext sind diese Ergebnisse jedoch ein Fingerzeig auf die Überarbeitung oder Ergänzung komplexer, sperriger Labormethoden im Analysealltag. NALFIAs können hierzu als vielseitiges Analyse-Werkzeug einen wertvollen Beitrag leisten.

5.1.3. Der Nachweis viraler Karpfenpathogene

Die Fischzucht in Aquakulturen gehört zu den am schnellsten wachsenden Sektoren der Nahrungsmittelproduktion. So wurden allein im Jahr 2016 über 80 Mio. Tonnen Speisefisch mit einem Wert von über 230 Mrd. US Dollar produziert, wobei der Karpfen (*Cyprinus carpio carpio*) eine wichtige Position einnimmt⁶. Doch nicht nur als Speisefisch, sondern auch als Zierfisch und Luxustier

⁶ FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018—Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [Zitiert im Dezember 2020]. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>

ist die ornamentale Zuchtform des Karpfen (*Cyprinus carpio* var. *koi*) von hohem Wert (Sun *et al.*, 2019). Zu den bedeutendsten Bedrohungen dieser Tiere zählen u.a. virale Pathogene, wie das Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) oder das Carp Edema Virus (CEV).

Die durch CyHV-3 verursachte Krankheit KHVD (*Koi Herpesvirus Disease*) ist u.a. durch Kiemennekrosen, Schleimhautläsionen und Schleimhautablösungen, Atemnot und Apathie charakterisiert (Walster, 1999). Die Exposition mit CyHV-3 kann auch zu latenten Infektionen von Fischen (auch *Carrier*-Fische) führen, die später durch verschiedene Stressfaktoren, wie bspw. erhöhte Wassertemperaturen von 22-26°C, zum Ausbruch von KHVD führen können (Perelberg *et al.*, 2003 / Gilad *et al.*, 2002 / Gilad *et al.*, 2003). Diese Ausbrüche sind durch hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten gekennzeichnet, weshalb die Krankheit in Deutschland und international durch die OIE (*World Organization for Animal Health*) als meldepflichtig^{7,8} eingestuft ist (Baumer *et al.*, 2013 / Perelberg *et al.*, 2003). Eine sehr ähnliche Symptomatik, Mortalitäts- und Morbiditätsraten sind mit der durch das Carp Edema Virus verursachten Koi-Schlafkrankheit (KSD) verknüpft (Jung-Schroers *et al.*, 2015 / Way *et al.*, 2017 / Adamek *et al.*, 2017). Die schwierige klinische Unterscheidbarkeit beider Krankheiten, sowie die sich häufenden Berichte von CEV-Ausbrüchen und KHV-CEV Co-Infektionen machen eine *Point-of-Care* kompatible Differenzialdiagnostik beider Viren besonders interessant (Padhi *et al.*, 2019 / Kim *et al.*, 2020 / Toffan *et al.*, 2020 / Soliman *et al.*, 2018). Sowohl CEV als auch CyHV-3 sind doppelsträngige DNA-Viren (Waltzek *et al.*, 2005 / Matras *et al.*, 2017). In der Literatur wird der Nachweis von KHV und CEV zumeist über die Erkennung der Virus-spezifischen DNA über PCR-basierte Nachweistechiken erbracht (Matras *et al.*, 2017 / Gilad *et al.*, 2004 / Gaede *et al.*, 2017). Die Bedeutung einer schnellen, einfachen, nicht invasiven „Analytik am Teich“ zum Nachweis dieser viralen Karpfenpathogene wurde in der Literatur mehrfach betont, wobei bislang Methoden wie die RPA oder die LAMP im Fokus standen (Soliman *et al.*, 2014 / Prescott *et al.*, 2016 / Soliman *et al.*, 2017).

Im Kontext dieser Arbeit ist es gelungen, eine Methodik zu erarbeiten, die eine ausreichend spezifische und empfindliche Nachweisführung für KHV und CyHV-3 erlaubt. Insbesondere der Nachweis des Erregers von KHVD erwies sich als besonders vielversprechend. Hierbei wurde ein etabliertes qPCR-Nachweissystem (Gilad *et al.*, 2004 / Gaede *et al.*, 2017) genutzt und für eine POC-taugliche Nachweistechnik adaptiert (Abbildung 34). In einer *duplex* PCR mit anschließender post PCR-Hybridisierung gelang der spezifische Nachweis von etwa 9 Genkopien je µL, was das Testsystem für die Erkennung von latent infizierten Karpfen qualifizieren könnte (Loose und Breitbach *et al.*, 2020 / Prescott *et al.*, 2016). In einer umfangreichen Vergleichsanalyse

⁷ Anonymous. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen. 2011. [Zitiert Dezember 2020]. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierseuchanzv/TierSeuchAnzV.pdf>

⁸ OIE World Organization for Animal Health. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. [Zitiert Dezember 2020]. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020>

wurden 114 von 120 analysierten Proben korrekt positiv erkannt. Die Abweichungen zur Referenzmethode (qPCR) zeigten sich ausschließlich in Proben mit weniger als 10 Genkopien je μL . Über eine Mehrfachbestimmung gelang letztlich auch der positive Nachweis dieser Proben via PCR-LFA (Abschnitt 4.5.2.2). Der beschriebene KHV-Nachweis ist wegen des einfachen Nachweisregimes und der post PCR-Hybridisierung leicht für die Nutzung POC-tauglichen Equipments adaptierbar. Eine grundlegende Kompatibilität mit einer einfachen Aufarbeitungsmethode von Kiemenabstrichen unterstreicht darüber hinaus die Robustheit der PCR-LFA-Methode und somit auch die praktische Relevanz (Loose und Breitbach *et al.*, 2020).

Carryover Kontaminationen limitierten jedoch die tatsächliche Nutzbarkeit des Testsystems massiv. Dieses Problem wurde im Zuge der Entwicklung des CEV-Nachweises aufgegriffen (Abschnitt 4.5.3.4). Durch die Implementierung der UDG gelang es, *carryover* Kontamination vollständig zu unterbinden. Methodische Fortschritte sind vor allem durch die Kombination einer asymmetrischen *duplex* PCR mit einer schnellen post PCR-Hybridisierung charakterisiert. Dadurch gelang die Etablierung eines sensitiveren Nachweises von etwa 6 Kopien je μL . Der Versuch eine *triplex* PCR (KHV, CEV und IAC) zu etablieren, scheiterte aufgrund zahlreicher Rückschläge während der CEV-Nachweisentwicklung. Dabei wurde die verwendete IAC gemäß Gilad *et al.* (2004) als wichtige Schwachstelle identifiziert (Abschnitt 4.3.5.5).

Letztlich ist es nicht gelungen einen 100% funktionellen CEV-Nachweis zu etablieren. Die methodischen Weiterentwicklungen sind im Gesamtkontext der Arbeit trotzdem als wichtige Bausteine hin zu einem sehr sensitiven POC-tauglichen Nachweissystem zu verstehen. Für eine tatsächliche Praxisanwendung am Teich wurden wichtige Limitationen identifiziert und Lösungsstrategien erarbeitet, auf die insbesondere im zweiten Diskussionsteil genauer eingegangen wird.

5.1.4. Detektion von SNPs – Nachweis der Faktor V Leiden Mutation

In der Literatur ist die Anzahl verwendeter Methoden zum Nachweis von Punktmutationen über NALFIAs vergleichsweise überschaubar. Verwendung finden hier vor allem PCR-Methoden. Hierzu zählen die *singleplex* und *multiplex* ARMS PCR (Hui *et al.*, 2016 / Lian *et al.*, 2016 / Li *et al.*, 2017 / Xuhong *et al.*, 2019 / Zhang *et al.*, 2020). Eine weitere Methode, die sogenannte (*single*) *Primer Extension* PCR (PEXT-PCR), wurde ebenfalls mehrfach für die Erkennung von Punktmutationen genutzt (Litos *et al.*, 2007 / Litos *et al.*, 2009 / Konstantou *et al.*, 2009 / Moers *et al.*, 2015 / Lin *et al.*, 2018). Isothermale Amplifikationsmethoden eignen sich grundsätzlich ebenfalls für SNP-Analysen, was Abwandlungen wie die PNA-LNA *mediated* LAMP, die *probe enhanced* LAMP oder *allele specific* LAMP beweisen (Itonaga *et al.*, 2016 / Ding *et al.*, 2019 / Badolo *et al.*, 2012). Es finden sich jedoch nur sehr wenige Veröffentlichungen, die isothermale Amplifikation und Lateral Flow für die Erkennung von SNPs kombinieren. Hierzu zählen eine LAMP-Variante, die ein spezielles Primerdesign nutzt, sowie die *Circular Strand Displacement Amplification* in Kombination

mit einem SNP-spezifischen Ligase-Assay (Yongkiettrakul *et al.*, 2017 / Yongkiettrakul *et al.*, 2020 / Xiao *et al.*, 2012 / Zeng *et al.*, 2017). Die Reporter-basierten CRISPR-Cas-abhängigen Nachweistechiken (Einleitung 1.3.4) sind ebenfalls grundsätzlich geeignet, SNPs zu erkennen (Myhrvold *et al.*, 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit galt es verschiedene NALFIA-Techniken zu etablieren, zu testen und zu vergleichen, die einen einfachen, schnellen Nachweis von SNPs grundsätzlich erlauben. Als Testsystem wurde das sogenannte humane Faktor V Leiden (FVL) ausgewählt. Hierbei handelt es sich um eine Gerinnungsstörung des Blutes, die auf eine vererbte Punktmutation zurückzuführen ist (Van Cott *et al.*, 2016).

In der menschlichen Blutgerinnung fungiert das aktivierte Protein C (APC) mit dem Kofaktor Protein S als natürliches Antikoagulationssystem (Griffin *et al.*, 2007). Dieser wichtige Komplex ist in der Lage, den aktivierten Faktor Va und Faktor VIIIa (FVa, FVIIIa) zu deaktivieren (Griffin *et al.*, 2007 / Van Cott *et al.*, 2016). Die Punktmutation G1691A im *Faktor V - Gen* führt zu einem Aminosäureaustausch (R506Q) im Faktor V Protein, der die APC-vermittelte Deaktivierung von FVa deutlich verlangsamt (Bertina *et al.*, 1994 / Greengard *et al.*, 1994 / Zöller *et al.*, 1994). Diese sogenannte FVL-assoziierte APC-Resistenz kann in heterozygoten Individuen das Risiko einer venösen Thrombose um den Faktor 3 bis 7 und in homozygoten Individuen sogar um den Faktor 20 bis 80 erhöhen (Ridker *et al.*, 1995 / Rosendaal *et al.*, 2005). Andere Faktoren wie Schwangerschaft, Hyperhomocysteinämie oder steigendes Alter können in Kombination mit dem FVL das Thromboserisiko zusätzlich steigern (Ridker [1] *et al.*, 1997 / Dizon-Townson *et al.*, 1997 / Ridker [2] *et al.*, 1997). Zudem ist diese genetische Veränderung kein selten vorkommendes Phänomen, da 2-5 % der kaukasischen Bevölkerung diese Punktmutation besitzen. In einzelnen Regionen, wie Schweden oder Griechenland tragen sogar 11 bzw. 15% der Bevölkerung diese genetische Veränderung (Kujovich *et al.*, 2011 / Albagoush *et al.*, 2020). Somit lässt sich schlussfolgern, dass mit der Detektion der FVL-Mutation ein absolut praxisnahes und diagnostisch relevantes Testsystem zur Beurteilung von SNP-Erkennungsstrategien gewählt wurde.

5.1.4.1. RNase H2-abhängige PCR

Die Nutzung der RNase H2 in der PCR (rhPCR) wurde erstmalig von Dobosy *et al.* (2011) als Methode zur verbesserten Erkennung von SNPs beschrieben. Dabei wurde die, aus dem Organismus *Pyrococcus abyssi* stammende, thermostabile RNase H2 in der PCR zur „Aktivierung“ elongationsblockierter Primer verwendet und in den folgenden Jahren mehrfach erfolgreich für die Detektion von SNPs genutzt (Dobosy *et al.*, 2011 / Broccanello *et al.*, 2018 / Nakauchi *et al.*, 2020). Die Kombination aus rhPCR und LFA wurde nach meinem Kenntnisstand bislang nicht beschrieben.

In dieser Arbeit wurde folglich erstmalig gezeigt, dass durch die verwendete Primer-Markierungsstrategie die rhPCR sehr gut via LFA ausgewertet werden kann (Abschnitt 4.7.1).

Darüber hinaus erwies auch die *duplex* rhPCR als grundlegend funktionell (Abbildung 45). Der damit einhergehende Einfluss zur Verminderung von unspezifischen Amplifikationen ist im NALFIA-basierten Kontext besonders hervorzuheben. Im Fokus dieser Analysen stand jedoch die Entwicklung einer robusten, Allel-spezifischen *duplex* PCR zum parallelen Nachweis der beiden FVL-assoziierten Genvarianten. Die Etablierung der *singleplex* rhPCRs zum Nachweis der FVL-Mutation und des WT-Allels gelangen grundsätzlich, wobei die sehr gute Diskriminierbarkeit der FVL-Mutation hervorgehoben werden kann. Die *duplex* rhPCR hingegen konnte nicht erfolgreich entwickelt werden. Durch Akkumulation von amplifizierbarem *template* während der Reaktion, tendierte der *duplex* Nachweis in „beide Richtungen“ immer wieder zu Unspezifitäten (Abbildung 46).

Diese Ergebnisse deckten sich letztlich recht gut mit bestehenden Erkenntnissen zur rhPCR. So wurde im *singleplex* Ansatz gezeigt, dass die Positionierung der RNA-Base im Primer, die Sequenz, sowie die Positionierung der *Mismatch*-Position im Primer erheblichen Einfluss auf ΔC_t und somit auf die Spezifität nimmt (Dobosy *et al.*, 2011 / Crissman *et al.*, 2020). Ein Nachteil der verwendeten rhPCR-Strategie ist die kostenintensive Entwicklung hin zu einer spezifischen und robusten Primerkombination. So schlug bspw. ein Standard-rhPrimer (5'Biotin, 3' Spacer C3, interne RNA-Base) mit einem Kostenfaktor von etwa 100 € zu Buche. Ein Assay-Redesign in Kombination mit der Testung multipler Primerkombinationen und anschließender Optimierung trieb die Entwicklungskosten rasch unverhältnismäßig in die Höhe, sodass umfangreichere Optimierungsarbeiten gestoppt wurden.

Letztlich lässt sich festhalten, dass die rhPCR ein geeignetes Werkzeug für eine schnelle und einfache Erkennung von SNPs zu sein scheint und gleichzeitig absolut kompatibel mit einer Lateral Flow basierten Analyse ist. Die Entwicklung einer *duplex* rhPCR zur vollständigen Genotypisierung stellte sich als schwierig heraus. Alternative, universelle und somit kostengünstigere rhPCR-basierte Nachweistechiken, wie von Beltz *et al.* (2018) präsentiert, könnten nicht nur kostengünstige Analysen ermöglichen, sondern auch die Entwicklung vereinfachen und beschleunigen.

5.1.4.2. ARMS-PCR

Die *amplification refractory mutation system* (ARMS) - PCR definiert sich durch das Einfügen zusätzlicher Fehlpaarungen in den zu verlängernden 3'-Bereich eines Primers (Ye *et al.*, 2001). In der Literatur wird diese Technik als einfache, günstige und vor allem *multiplex* fähige Methode beschrieben, um einen oder mehrere SNPs zu detektieren (Zhang *et al.*, 2020 / Gupta *et al.*, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik analog zur rhPCR genutzt, um die FVL-Mutation zu erkennen und eine entsprechende Genotypisierung in einer *duplex* ARMS-PCR mit anschließender LFA vorzunehmen (Abschnitt 4.7.2). Dabei konnten spezifische und robuste *singleplex* PCRs erarbeitet werden (Abbildung 48 D). Auch nach zahlreichen Optimierungen gelang es jedoch nicht, eine wirklich sicher funktionierende *duplex* PCR für die Erkennung beider FVL-assoziiierter Allele zu erarbeiten. Die zugrunde liegende Problematik gestaltete sich als vergleichbar zu den Versuchen mit

der rhPCR. Dieser Umstand verdeutlicht die Wichtigkeit des grundlegenden Überarbeitens des Assaydesigns. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch eine aktuelle Veröffentlichung, die erstmalig einen funktionierenden *one-pot* SNP-Nachweis beider Allele in einer Tetra-ARMS-PCR mit anschließender Lateral Flow Analyse beschreibt (Zhang *et al.*, 2020). In vorherigen Publikationen wurde die ARMS-PCR in Kombination mit einer LFA bereits erfolgreich für die SNP-Erkennung genutzt (Hui *et al.*, 2016 / Lian *et al.*, 2016 / Li *et al.*, 2017 / Xuhong *et al.*, 2019). Allen Arbeiten ist gemein, dass *singleplex* ARMS-PCRs für die SNP-Analyse herangezogen wurden, was die Komplexität der Etablierung einer funktionellen und robusten *duplex* ARMS-PCR unterstreicht. Im Kontext dieser Arbeit gelang es mit Hilfe zweier *singleplex* ARMS-PCRs, beide FVL-assoziierten Allele korrekt zu charakterisieren. Die Implementierung der UDG als Schutz vor *carryover* Kontaminationen ist dabei als besondere Nachweiseigenschaft zusätzlich hervorzuheben.

5.1.4.3. Sonden-basierte NALFIAs

In den PCR-basierten NALFIAs zur Erkennung von SNPs wird die Spezifität der Nachweisreaktion insbesondere durch speziell gestaltete Primer, sowie deren Elongierbarkeit definiert (ARMS-PCR, PEXT-PCR, rhPCR). In dieser Arbeit wurde eine weitere verhältnismäßig einfache methodische Herangehensweise geprüft. Die post PCR-Hybridisierung mit unterschiedlich markierten SNP-spezifischen Sonden wurde für den Nachweis der Faktor V Leiden Mutation erfolgreich entwickelt (Abschnitt 4.7.3). Hierüber gelang die vollständige und korrekte Genotypisierung von 13 klinischen DNA-Proben. Verglichen mit der 2020 beschriebenen Tetra ARMS-PCR von Zhang *et al.*, hat die hier präsentierte Methode den wichtigen Vorteil, dass das Potenzial hinsichtlich Nachweisgeschwindigkeit und *mutlplexing* bei Weitem nicht ausgeschöpft zu sein scheint. Weiterhin hat diese einfache Hybridisierungstechnik durchaus das Potenzial mit anderen (isothermalen) Amplifikationsmethoden kombiniert zu werden. Nachteil der hier präsentierten Methoden ist, dass die Hybridisierung nach Amplifikation einen zusätzlichen Arbeitsschritt erfordert. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine weitere Nachweisteknik für die Erkennung der FVL-Mutation getestet.

Die Reporter-basierte, RNase H2-abhängige PCR erwies sich in diesem Zusammenhang ohne besondere Optimierung als schnelle und funktionierende *one-pot* Methode für die Erkennung der FVL-assoziierten Genotypen (Abschnitt 4.7.4.1). Über 93% aller getesteten klinischen Proben wurden korrekt genotypisiert. Der Versuch eine analoge LAMP-basierte Methodik zu erarbeiten, scheiterte (Abschnitt 4.7.4.2). Die nötige Spezifität für eine genaue SNP-Diskriminierung wurde nicht erreicht. Die Nutzung von Reporter-basierten NALFIAs hat offensichtlich großes Potenzial, ist jedoch derzeit auf Ebene der Lateral Flow basierten Auswertung limitiert, worauf an späterer Stelle genauer eingegangen wird.

5.1.4.4. SNP-Nachweis via NALFIA: ein Zwischenfazit

Bereits 1996 wurde eine ARMS-PCRs zur Erkennung der FVL-Mutation aus Blut genutzt und die Methode anschließend veröffentlicht (Scobie *et al.*, 1996). 24 Jahre später haben Weiterentwicklungen und Optimierungen des identischen Nachweis-Systems immer noch Relevanz, da bestimmte Aspekte wie der Zeitfaktor, Arbeitsaufwand, Komplexität, sowie die Verwendung gesundheitsgefährdender Auswerteformate immer wieder kritisch beleuchtet werden (Chang *et al.*, 2015 / Yu *et al.*, 2020). Die stetige Entwicklung alternativer SNP-Nachweistekniken, wie PCR-RFLP, RT-PCR aber auch *Next Generation Sequencing* zeigen den Trend hin zu einem verstärkten *multiplexing* (Lucotte *et al.*, 2003 / Koksall *et al.*, 2007 / Gorski *et al.*, 2018). Die rh- und ARMS-PCR erwiesen sich in dieser Arbeit als sehr gute Werkzeuge zur schnellen Entwicklung von *singleplex* SNP-Nachweisen im Lateral Flow-Format. Gerade das *multiplexing* wurde als wesentliche Hürde für diese Methoden herausgearbeitet.

Die universelle und schnelle post PCR-Hybridisierung „erkannte“ nicht nur den FVL-SNP spezifisch, sondern ermöglichte auch ein *multiplexing*, wodurch die vollständige Genotypisierung mit dieser methodischen Herangehensweise gelang. Die Entwicklung von Lateral Flow-kompatiblen, Reporter-basierten Nachweismethoden, wie der Rep-rhPCR bestätigen, dass sich PCR- und Sonden-basierte Nachweisformate für einen spezifischen SNP-Nachweis besonders zu eignen scheinen. So gelingt innerhalb einer Stunde der *one-pot* SNP-Nachweis der FVL-Mutation ohne besonderen Geräteaufwand mittels Reporter-basierter RNase H2-abhängiger PCR. Die isothermale Version dieser Methodik (LAMP) samt LFA konnte den SNP nicht korrekt identifizieren, versteht sich jedoch als Fingerzeit auf das Potenzial einer sehr schnellen POC-tauglichen Diagnostik, bei der die Vorteile der Reporter-basierten Analytik zum Tragen kommen.

Letztlich ist es gelungen, die FVL-assoziierten Genotypen in einer Reaktion mit einem LFD darzustellen und dabei die methodische Vielfalt für den Nachweis von Punktmutationen zu beleuchten. Die gesammelten Erkenntnisse, Rückschlüsse, wie Teilerfolge können in der Summe einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung zukünftiger, einfacher und schneller POC-tauglicher *multiplex* SNP-Nachweise darstellen.

5.1.5. Validierung eines kommerziellen NALFIAs – Nachweis von TAB

Alicyclobacillus spp. (ACB) sind ubiquitär vorkommende, aerob wachsende, nicht-pathogene Bakterien, die häufig im Boden oder auf Früchten zu finden sind (Wisotzkey *et al.*, 1992 / Walls und Chuyate, 2000 / Groenewald *et al.*, 2008). ACB werden häufig sehr treffend als TAB bezeichnet, was für thermophile, acidophile Bazillen steht (Uchino und Doi, 1967). Aufgrund dieser Eigenschaften gelten ACB als bedeutende Schadorganismen in der Fruchtsaftproduktion, wobei *Alicyclobacillus actidoterrestris* (AAT) als der am häufigsten vorkommende Schädiger der Gattung ACB beschrieben ist (Pettipher *et al.*, 1997). Das ACB-assoziierte Schadbild ist durch Eintrübung,

Sedimentierung, aber vor allem durch die Bildung erheblicher Fehlgerüche, die häufig als medizinisch oder antiseptisch beschrieben werden, charakterisiert (Pettipher *et al.*, 1997 / Gocmen *et al.*, 2005). Die durch *ACB* produzierten relevanten *off-flavour* verursachenden Phenolderivate sind 2-Methoxyphenol (Guaiacol) und die beiden Halophenole: 2,6-Dibromophenol (2,6-DBP) und 2,6-Dichlorophenol (2,6-DCP) (Yamazaki *et al.*, 1996 / Siegmund und Pöllinger-Zierler, 2006 / Borlinghaus und Engels, 1997). Es gilt als generell akzeptiert, dass insbesondere Guaiacol die wichtigste Fehlgeruch-verursachende Komponente in kontaminierten Fruchtsäften darstellt. Die Fähigkeit Guaiacol zu bilden, ist als Spezies-spezifisch beschrieben und kann durch Faktoren wie Sauerstoffgehalt, Zelldichte und Temperatur beeinflusst werden (Chang *et al.*, 2015 / Pettipher *et al.*, 1997 / Eiroa *et al.*, 1999 / Bahçeci *et al.*, 2007 / Witthuhn *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *ACB* in der Lage sind, Biofilmbildung zu initiieren, was eine schlüssige Erklärung sein könnte, warum diese Organismen in verschiedensten Stufen der Fruchtsaftproduktion zu finden sind (dos Anjos *et al.*, 2013 / do Prado *et al.*, 2019). Das Vorkommen auf Böden, Wänden, im Spülwasser und in Abfüllanlagen selbst unterstreicht die Gefahr von Sekundär- und Rekontamination im Produktionsprozess (Groenewald *et al.*, 2009 / de Cássia Martins Salomão *et al.*, 2013). *ACB*-assoziierte Schädigung von Fruchtsäften ist kein seltenes Phänomen, was die Bedeutung einer sensitiven, empfindlichen und validen *ACB*-Diagnostik verstärkt (Howard, 2006 / Oteiza *et al.*, 2011). Eine der wichtigsten Richtlinien für den Nachweis von *ACB* entstammt der *International Federation of Fruit Juice Producers (IFU)* und trägt den Namen *IFU method No. 12* (kurz: *IFU No. 12*). Seit der ersten Veröffentlichung im Jahr 2003 wurde diese Richtlinie stetig adaptiert und optimiert. Bei der *IFU No. 12* handelt es sich um eine mehrstufige selektive Kultivierungsvorschrift, bei der im Extremfall zwei Wochen bis zu einem validen Ergebnis vergehen können (Cai *et al.*, 2015 / Grasso *et al.*, 2009 / Wang *et al.*, 2014). Der Wunsch nach einer beschleunigten Analytik verdeutlicht, warum in den letzten 15 Jahren zahlreiche alternative immunologische und molekularbiologische Nachweisverfahren publiziert wurden. Hierzu zählen: RT-PCR, Endpunkt-PCR, PCR-RFLP, isothermale Amplifikationen, sowie Aptamer- oder Antikörper-basierte Anreicherungs- und Detektionsstrategien (Cai *et al.*, 2015 / Sourri *et al.*, 2019 / Yamazaki *et al.*, 1996 / Connor *et al.*, 2005 / Luo *et al.*, 2004 / Shayanfar *et al.*, 2015 / Hünninger *et al.*, 2015 / Wang *et al.*, 2014 / Mast *et al.*, 2016). Trotz dieser innovativen Ansätze zur beschleunigten Erkennung von *ACB* mangelt es häufig an umfangreichen Validierungsstudien zur realistischen und praxisnahen Beurteilung alternativer Nachweiskonzepte. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein kommerziell verfügbares NALFIA-basiertes Nachweiskit für Validierungsanalysen verwendet, in dessen Zentrum eine Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140 stand. Die zentrale Fragestellung, die im Kontext dieses Kapitels beantwortet werden sollte ist, welches Potenzial NALFIAs in einem absolut praxisnahen und –relevanten Kontext entfalten können.

Das beschriebene *ACB*-Nachweissystem lässt sich von der Komplexität her am ehesten als eine stark vereinfachte Labormethode beschreiben, die etwas Erfahrung hinsichtlich *liquid handling* erfordert.

Somit richtet sich die Technik an mittlere und größere Fruchtsafthersteller oder Analyselabore mit entsprechenden personellen und räumlichen Möglichkeiten. In unter 90 Minuten gelingt ein Nachweis auf *ACB*. Die Analysedauer verlängert sich um etwa eine Stunde bei nachgeschalteter Testung auf *AAT* bzw. Guaiacol-produzierende *ACB*. In umfangreichen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Tests mit einer unteren Nachweisgrenze von etwa $1 \cdot 10^3$ cfu / mL funktionieren, wobei die Matrix einen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit nehmen kann (Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2). Der *ACB*-Nachweis-Kit erwies sich als ausreichend spezifisch, da alle untersuchten Spezies korrekt identifiziert wurden. Lediglich wenige schwache, nicht reproduzierbare Unspezifitäten traten auf, die eine Indikation für eine NALFIA-charakteristische Schwachstelle, die *carryover* Kontamination, sein könnte (Abbildung 73). Die sehr aufwändig gestaltete Vergleichsuntersuchung offenbarte, dass der NALFIA-Kit nach fünftägiger Anreicherung eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit der Kultur-basierten Referenzmethode zeigte (Cohen's kappa [acb]: 0,93; [aat] 1,0; [gp] 0,96). Auch die Direktanalyse repräsentativer Einzelkolonien auf BAT-Agar nach 7 bis 8 Tagen zeigte eine perfekte Übereinstimmung mit entsprechenden Referenzmethoden (Kulturbestätigung/ 16S-Sequenzierung / MALDI-TOF-MS). Interessanterweise können im Einzelfall Analysen aus 2- bzw. 3-tägiger Anreicherung unter Zeitdruck absolut sinnvoll sein, denn es werden 90% bzw. 95% aller Guaiacol-bildenden *ACB* korrekt erkannt. Die Abbildung 60 fasst die vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten des *ACB*-Nachweissystems zusammen.

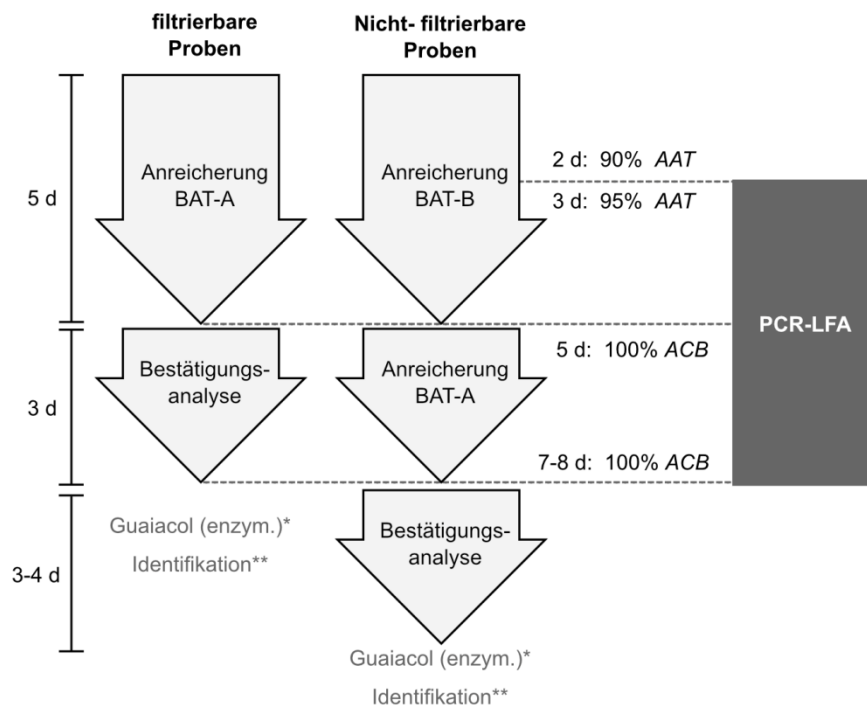


Abbildung 60 - Mögliche PCR-LFA Kontrollpunkte für die *ACB*-Diagnostik

Negative Aspekte, die im Rahmen der Validierungsstudie herausgearbeitet wurden, sind vor allem die Falschpositivrate des *ACB*-Screeningsystems (4-8%), die Gefahr von *carryover Kontaminationen*, sowie die mangelnde *multiplex*-Fähigkeit, was sich direkt auf Analyseumfang und -dauer auswirkt. Ansonsten beweisen diese Ergebnisse, dass NALFIAs auch in einem hochgradig praxisnahen und – relevanten Zusammenhang mit einer sehr guten *Performance* und Nutzbarkeit zu überzeugen wissen. In diesem konkreten Beispiel wurde gezeigt, dass eine verhältnismäßig einfache, vielseitig nutzbare und trotzdem sehr gut funktionierende NALFIA-Methode zum Nachweis von Schadorganismen in einem extrem heterogenen Lebensmittel gelingt. Die methodische Vereinfachung auf allen Ebenen (Probenvorbereitung, *liquid handling*, Auswertung und Interpretation) scheint essentiell, um komplexe Methoden in verschiedenste Bereiche des Alltags zu überführen, die letztlich spürbar davon profitieren. Die hier präsentierten Arbeiten belegen, dass NALFIAs hierzu einen wesentlichen Beitrag leisten können.

Abschließend für den ersten Diskussionsteil wird mit der Tabelle 20 eine Übersicht der in der Arbeit etablierten Nachweissysteme inklusive deren Charakteristika präsentiert.

Tabelle 20 - Übersicht der erarbeiteten NALFIAs

Nachweis von	Bereich / Sektor	Amplifikations-methode	LFD	Analyse-dauer	Eigenschaften / Besonderheiten	Nachweisempfindlichkeit
<i>Lactobacillus cerevisiae</i>	Mikrobiologische Qualitätskontrolle Lebensmittelindustrie	<i>duplex</i> PCR	MGHD2	ca. 1 h	IAC vorhanden, direkt PCR, kompatibel mit NBB-B®	ca. 20 cfu je Reaktion
<i>Lactobacillus rossiae</i>	Mikrobiologische Qualitätskontrolle Lebensmittelindustrie	<i>duplex</i> PCR	MGHD2	ca. 1 h	IAC vorhanden, direkt PCR, kompatibel mit NBB-B®	ca. 2-20 cfu je Reaktion
Homo-/ Heteroplasmie-Test von <i>C. reinhardtii</i> Chloroplasten-Mutanten	Biotechnologie	<i>duplex</i> PCR	MGHD2	ca. 2 h	(IAC) / direkt PCR & <i>quick and dirty</i> DNA-Extraktion	1 Kopie Rezipienten-Plastom unter 1.000-10.000 Transformanten-Plastomkopien
Identifikation relevanter Bier-schädigender Bakterien	Mikrobiologische Qualitätskontrolle Lebensmittelindustrie	<i>singleplex</i> PCR mit post PCR-Hybridisierung	MGHD	0,5 – 1 h	schnelle Spezies-Identifikation, ohne IPK, direkt PCR-kompatibel	> 20 cfu je Reaktion
Cyprinid Herpes Virus 3 (CyHV-3, KHV)	Veterinärmedizinische Diagnostik	<i>duplex</i> PCR + post PCR-Hybridisierung	MGHD2	ca. 1,5 h	Amplifikationskontrolle / direkt PCR, <i>quick and dirty</i> Extraktion	9 Kopien / µL
Carp Edema Virus (CEV)	Veterinärmedizinische Diagnostik	<i>duplex</i> PCR + post PCR-Hybridisierung	MGHD2	ca. 2 h	Amplifikationskontrolle / direkt PCR, <i>quick and dirty</i> DNA-Extraktion/ Prävention <i>carry over</i> - Kontamination	6 Kopien / µL
<i>Lactobacillus lindneri</i>	Mikrobiologische Qualitätskontrolle Lebensmittelindustrie	Rep-rhPCR	MGHD	ca. 1 h	keine IAC, innovatives Nachweismethodik, Reporter-basiert	2-200 cfu / Reaktion (abhängig von MGHD-Lot)
Faktor V Leiden Mutation	Humanmedizinische Diagnostik	rhPCR (<i>singleplex</i>)	MGHD/ MGHD2	ca. 1 h	2 Nachweisreaktionen zur vollständigen Genotypisierung erforderlich, keine IAC	SNP-Detektion möglich (20 ng humane gDNA, ca. 1000 Kopien / Reaktion)
Faktor V Leiden Mutation	Humanmedizinische Diagnostik	ARMS-PCR (<i>singleplex</i>)	MGHD/ MGHD2	ca. 1 h	+ UDG (Schutz vor <i>carry over</i> Kontamination), ohne IAC, <i>multiplex</i> u.U. möglich	SNP-Detektion möglich (20 ng humane gDNA, ca. 1000 Kopien / Reaktion)
Faktor V Leiden Mutation	Humanmedizinische Diagnostik	Rep-rhPCR (<i>singleplex</i>)	MGHD/ MGHD2	ca. 1 h	Ohne UDG, IAC enthalten, <i>one pot</i> Reaktion	SNP-Detektion möglich (20 ng humane gDNA, ca. 1000 Kopien / Reaktion)
Faktor V Leiden Mutation	Humanmedizinische Diagnostik	<i>singleplex</i> Standard PCR + post PCR-Hybridisierung	MGHD2	ca. 1 h	mit IPK, mit UDG, <i>multiplex</i> kompatibel zur vollständigen Genotypisierung,	SNP-Detektion möglich (20 ng humane gDNA, ca. 1000 Kopien / Reaktion)

5.2. Teil II - Limitationen von NALFIAs und praktisch nutzbare Lösungsstrategien

In dieser Arbeit wurden zahlreiche methodische Konzepte erarbeitet und genutzt, um praxisrelevante NALFIAs in verschiedensten Themenbereichen etablieren zu können. Doch unabhängig von der jeweiligen Fragestellung limitierten universelle, z.T. NALFIA-spezifische Probleme die initiierten Entwicklungsprozesse. In den folgenden Abschnitten werden diese Limitationen kapitelübergreifend benannt und diskutiert. Der Umgang mit diesen Limitation, die kritische Auseinandersetzung mit aktuellen Literaturstellen und die Erarbeitung spezifischer Lösungswege bilden das Grundgerüst dieses Diskussionsteils.

5.2.1. *Multiplexing*

Eine offensichtliche Limitation von NALFIAs ist Anzahl der möglichen Ergebnisse, die einem Universalteststreifen zu entnehmen sind. Die in dieser Arbeit genutzten LFDs verfügen über eine bzw. zwei Testlinien, sowie je eine Kontrolllinie, die zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen werden (Abschnitt 1.2.6). Nach meinem aktuellen Wissensstand existieren derzeit nur sehr wenige kommerziell verfügbare Universalteststreifen, die mehr als zwei Testlinien besitzen. Nukleinsäure-basierte Amplifikationsmethoden, wie die PCR, erlauben teilweise sehr starkes *multiplexing*, bei dem durchaus weit mehr als 50 Primerpaare je Reaktion zum Einsatz kommen können (Palka-Santini *et al.*, 2009 / Ziegler *et al.*, 2015). Mögliche post-Amplifikations-Hybridisierungen können den Grad des *multiplexings* zusätzlich verstärken. Dieses wichtige Charakteristikum von Amplifikationsmethoden illustriert sehr deutlich die Diskrepanz zwischen der *multiplex*-Fähigkeit auf Ebene der Amplifikation und den Darstellungsmöglichkeiten in der Lateral Flow Analyse.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass gerade in der *Point-of-Care* Analytik verschiedene Fragestellungen mit den zur Verfügung stehenden Teststreifen durchaus beantwortet werden können. Es hat sich häufig sogar bewiesen, dass sich die Beschränkung auf die wesentlichen ein bis zwei Informationen je Nachweis als vorteilhaft für die *Performance* und die Einfachheit der Gesamtanalyse auswirkte. Durch die Nutzung nacheinander geschalteter NALFIAs (Abschnitt 4.3, *Alicyclobacillus*-Nachweise) oder durch die Verwendung multipler Hybridisierungen nach Amplifikation konnte trotzdem in gewisser Art und Weise ein *multiplexing* betrieben werden (Abschnitt 4.4.1).

In der Literatur werden verschiedene Arten des Lateral Flow-assozierten *multiplexings* aufgeführt, die sich für eine universelle Nutzung eignen. Dazu zählt bspw. die Verwendung verschiedener LFA-kompatibler Fluoreszenzfarbstoffe in Kombination mit einem Fluoreszenz-basierten *readout* oder dem Immobilisieren zahlreicher verschiedener Fänger-Antikörper auf der analytischen Membran eines LFDs (Xu *et al.*, 2014 / Li *et al.*, 2019). NALFIAs bieten grundsätzlich die Möglichkeit, dass Hybridisierungen gewinnbringend genutzt werden können (Abschnitt 4.4 und 4.7.3). Von daher ist es

naheliegend, analog zu existierenden Microarray-Formaten, spezifische LFDs zu nutzen. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass NALFIAs mit immobilisierten Sonden zu einem verstärkten *multiplexing* beitragen können (Tian *et al.*, 2014 / Gomez-Martinez *et al.*, 2018 / Zhang *et al.*, 2019). Bei entsprechender Miniaturisierung können je LFA tatsächlich deutlich mehr als 30 Testpunkte genutzt werden (Taranova *et al.*, 2013). Die Herstellung entsprechender LFDs ist grundsätzlich möglich, jedoch absolut spezifisch für den jeweiligen Nachweis und kaum mit bloßem Auge interpretierbar, sodass im Sinne eines LFD-Herstellers die Wirtschaftlichkeit einer solchen Plattform kritisch zu hinterfragen sein dürfte. Trotzdem bieten LFDs die Möglichkeit ein beachtliches *multiplexing* zu betreiben. Weiterentwicklungen wie die post PCR-Hybridisierung oder die Nutzung von Helfern könnten künftig wichtige Bausteine für ein verbessertes *multiplexing* von NALFIA-Formaten darstellen.

5.2.2. Der high dose hook effect

Der *high dose hook effect* ist ein charakteristisches Immunoassay-assoziiertes Phänomen, das in gängigen Nachweisformaten wie ELISAs oder eben Lateral Flow Immunoassays zum Tragen kommen kann (Chen *et al.*, 2018 / Lourens *et al.*, 2014). Dabei wird dieses Phänomen in *Sandwich*-Immunoassay-Formaten beobachtet, bei denen alle Reaktionspartner gleichzeitig in einem Reaktionsraum zu einander finden. Der Effekt setzt ein, sobald die Menge des Analyten die Anzahl zur Verfügung stehender Bindestellen im Nachweissystem überschreitet. Durch den Analyt-Überschuss können Bindestellen der mobilen und / oder stationären Phase des LFD „blockiert“ werden, sodass weniger Signal-gebende Komplexe gebildet werden können. Sowohl bei qualitativen, semi-quantitativen als auch bei quantitativen Analyseformaten können sehr hohe Analyt-Konzentrationen wegen des *hook effects* zu schwach positiven oder im Extremfall zu falsch negativen Ergebnissen führen (O’Farrell, 2008). In kompetitiven oder sequenziell arrangierten Testformaten kommt dieser Effekt nicht zum Tragen. Der *high dose hook effect* ist eine wichtige praxisrelevante Limitierung von Immunoassays (Hoofnagle *et al.*, 2009 / Petakov *et al.*, 1998). Als praktisches Beispiel lässt sich der vielleicht bekannteste Lateral Flow basierte Nachweis anführen, der humane Schwangerschaftstest. Hier kann bspw. ein massiv erhöhter hCG-Spiegel aufgrund einer sogenannten molaren Schwangerschaft zu falsch negativen Resultaten führen, was im schlimmsten Fall erhebliche Konsequenzen für die Nutzerin eines solchen Testsystems haben kann (Winder *et al.*, 2017).

Grundsätzlich unterliegen NALFIAs identischen Limitationen. Jedoch kann durch die vorgeschaltete Nukleinsäure-basierte Amplifikationstechnik und eine standardisierte Lateral Flow Analyse die Anzahl der in das Immunoassay eingebrachten *Label* strikt limitiert werden, sodass der *high dose hook effect* vollständig vermieden werden kann. Das macht im Einzelfall NALFIAs zu einer sinnvollen Alternative zu Antigen-basierten Immunoassays (Ma *et al.*, 2019). Der in der Arbeit genutzte Universalteststreifen ist ein in der Fachliteratur häufig genutztes Werkzeug für die Entwicklung innovativer NALFIAs (Abschnitt 1.2.6). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig die mit dem *high dose hook effect* verbundenen Grenzen dieser beiden universellen Teststreifen konkret ermittelt und in den

Entwicklungen weitestgehend berücksichtigt (Anhang, Abbildung 90). Diese Analysen stellen folglich einen wichtigen Beitrag für künftige NALFIA-Entwicklungen dar. Mit Hilfe dieser Informationen und dem Wissen um den *high dose hook effect* kann man diese Limitation letztlich vollständig vermeiden.

5.2.3. **Carryover Kontaminationen**

Die Lateral Flow-basierte Auswertung von Amplifikaten bietet wichtige Vorteile gegenüber anderen Auswerteplattformen. Diese Vorteile gehen aber trotzdem mit einer sehr wichtigen Limitation einher. Nach Amplifikation wird das Reaktionsgefäß zwingend geöffnet, damit das Amplifikationsprodukt auf das LFD gelangt. Dieser Umstand ist sehr gefährlich für sich wiederholende Nachweissysteme, da das Öffnen der Reaktionsgefäße eine Quelle für *carryover* Kontamination darstellt (Longo *et al.*, 1990 / Xuhong *et al.*, 2019). Gerade hoch positive Proben bergen die Gefahr, dass nach dem Öffnen Amplifikate in Aerosolform freigesetzt werden (Wang *et al.*, 2019). Selbst bei sehr sauberem Arbeiten kann eine Kontaminationslast am Ort der Auswertung und darüber hinaus entstehen, dass insbesondere bei sensibler Nachweisführung gehäuft falsch positive Ergebnisse generiert werden (Abschnitt 4.3; 4.5; 4.7). Die Gefahr von *carryover* Kontaminationen ist charakteristisch für NALFIAs, aber trotzdem kein NALFIA-spezifisches Problem. Auch andere Methoden zur Beurteilung von Amplifikaten, wie Microarrays oder Elektrophoretische Auftrennung (AGE, Kapillargelelektrophorese), unterliegen einem vergleichbaren Risiko hinsichtlich *carryover* Kontaminationen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist dieses Phänomen tatsächlich gehäuft vorgekommen. Insbesondere bei den sensiblen Nachweissystemen für die Karpfenviren CyHV-3 und CEV traten massive Probleme mit falsch-positiven Ergebnissen auf, die das Arbeiten zeitweise unmöglich machten. Die Implementierung der Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) in das Nachweissystem erwies sich als wirksam und effizient (Abschnitt 4.3.5.4). Die Funktionalität der UDG wurde auch im Zusammenhang mit anderen NALFIA-assoziierten Amplifikationstechniken als wirksame Maßnahme zur Vermeidung von *carryover* Kontaminationen beschrieben, darunter die PCR, LAMP und MCDA (Xuhong *et al.*, 2019 / Kil *et al.*, 2015 / Wang *et al.*, 2018). Alternative Maßnahmen zur Vermeidung dieser Kontaminationen sind bspw. die Nutzung geschlossener LFDs, die beschriebene räumliche Trennung der Abarbeitung oder speziellere Techniken, wie bspw. der Primer-induzierte Endonuklease-Verdau (Roskos *et al.*, 2013 / Yan *et al.*, 2015 / Wang *et al.*, 2019 / Lalremruata *et al.*, 2020). Bei weniger sensibler Nachweisführung spielte das Thema der *carryover* Kontamination eine vergleichsweise untergeordnete Rolle, sofern der generelle *workflow* zur Vermeidung von Kontaminationen eingehalten wurde (Material und Methoden, Abschnitt 3.2.6). Räumliche Trennung von Arbeitsschritten, mehrere Pipettensets, Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere sind dabei wirksame Maßnahmen, die jedoch bei extrem sensiblen Nachweisen auf Dauer nicht ausreichen. Gerade für *Point-of-Need* Anwendungen stellen *carryover* Kontaminationen ein erhebliches Risiko dar, was bereits bei der Nachweisentwicklung zwingend beachtet werden sollte. Erstaunlicherweise ist dieses Phänomen

trotzdem ein vergleichsweise selten diskutiertes Problem in der Fachliteratur, das durchaus mehr Beachtung verdient (Arizti-Sanz *et al.*, 2020).

5.2.4. Cross Primer Dimere (CPDs)

Ein typisches Phänomen, das in NALFIAs immer wieder auftaucht, ist das Problem der Dimerisierung freier unterschiedlich markierter Primer bzw. Sonden. Amplifikate werden meistens bei Raum- bzw. Umgebungstemperatur durch LFA ausgewertet. Gerade bei niederen Temperaturen tendieren Nukleinsäuren erfahrungsgemäß zur Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen und unspezifischen Interaktionen (Dong *et al.*, 2001). Im Falle eines einfachen PCR-LFAs können bspw. Primer-Heterodimere amplifikationsunabhängige Signale auf dem LFD verursachen. Das kann einen Nachweis nicht interpretierbar und somit gänzlich unbrauchbar machen. In einem solchen Fall ist es nicht möglich, zwischen negativen und positiven Resultaten zu differenzieren (Abschnitt 4.2.2 und 4.5.3.3).

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde dieses Problem beschrieben und zumeist recht umständlich gelöst. Die Heterodimerisierung markierter Oligonukleotide wurde durch Änderung der verwendeten Primer- bzw. Sondensequenzen vermieden (Wang *et al.*, 2020). Auch die Änderung der Nachweisstrategie und teils aufwändige punktuelle Modifikation verwendeter Oligonukleotide führte zur Vermeidung der Primer- / Sonden - Dimerisierung (Wu *et al.*, 2020). Das *Redesign* eines Assays sollte nicht die erste Option sein, wenn es darum geht, unerwünschte Primerinteraktionen in NALFIAs zu unterbinden. Diese methodische Herangehensweise geht mit einem hohen Entwicklungs- und Zeitaufwand einher und limitiert folglich die bestmögliche Nutzung bestehender Amplifikationsmethoden. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung von Techniken zur zielgerichteten Eliminierung von CPDs aus methodischer Sicht ein thematisch wichtiger Eckpfeiler dieser Arbeit.

5.2.4.1. Spezifische Strategien zur Eliminierung von Cross Primer Dimeren

Nicht-markierte Oligonukleotide (Helfer) sind für den Teststreifen „unsichtbar“, da sie keine für die Detektion erforderlichen Markierungen tragen. Dieses Charakteristikum ist die Grundlage für die entwickelte Strategie zur spezifischen Eliminierung von CPDs. Dabei wird ein Helfer genutzt, der vollständig komplementär zu einem CPD - verursachenden Primer ist. Durch Zugabe dieses Helfers wird eine Interaktion zwischen dem CPD-verursachenden Primer und des nicht-markierten Helfers bewusst forciert. Es wird also die Bildung eines weiteren Heterodimers provoziert, welches jedoch kein Signal auf dem LFD verursachen kann und gleichzeitig die Bildung des ursprünglichen CPDs unterbindet. Durch die Komplementarität und die hohe Konzentration des Helfers ist die vollständige Auslöschung von CPDs in dieser Arbeit mehrfach gelungen. Die Abbildung 61 verbildlicht die in dieser Arbeit entwickelte Helfer-basierte CPD-Eliminierungs-Strategie.

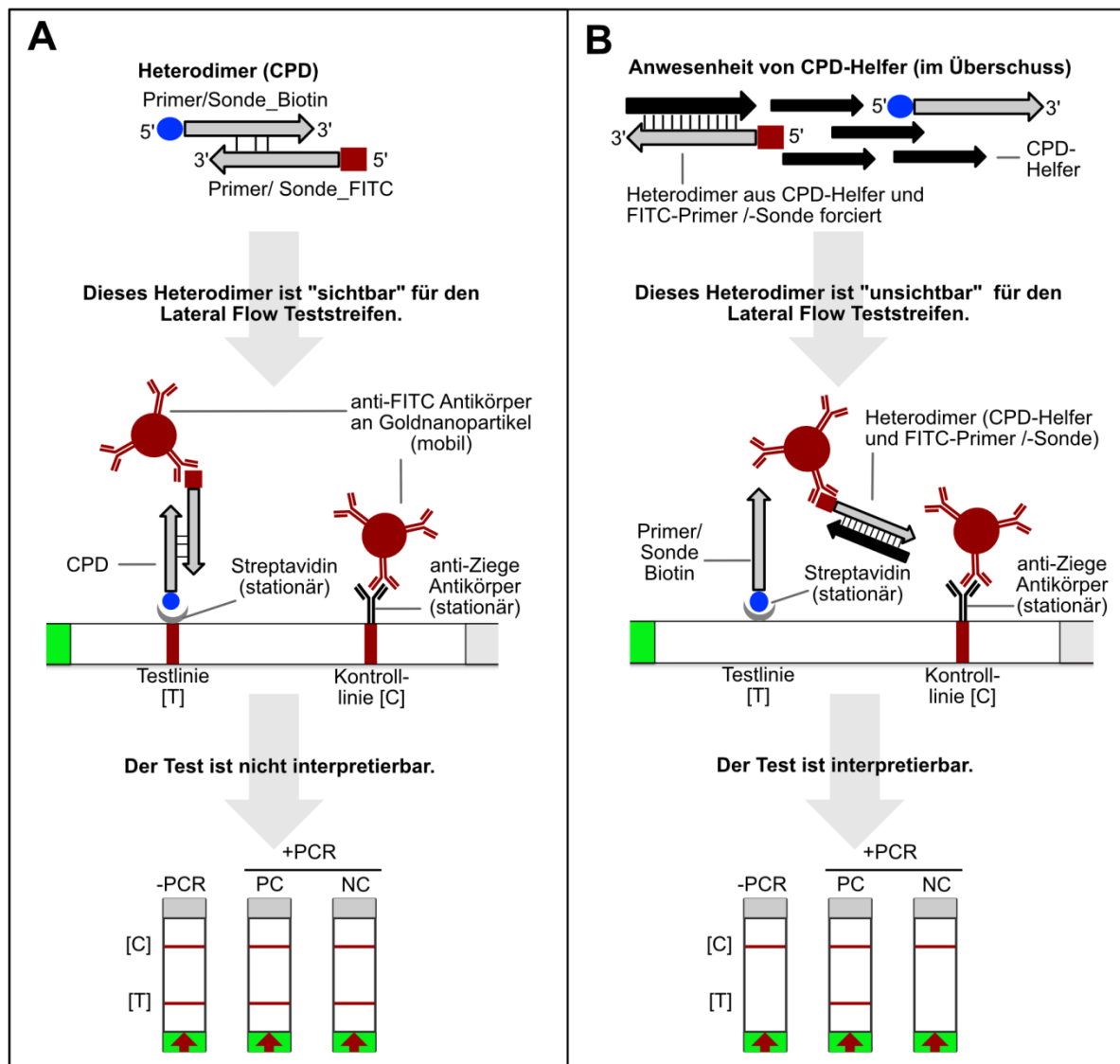


Abbildung 61 - Funktionsprinzip der CPD-Helfer. **(A)** Ein unerwünschtes Heterodimer aus Biotin- und FITC/FAM-markierten Oligonukleotiden kann über das verwendete LFD auf der Testlinie gestoppt und durch das Goldkonjugat gebunden werden. Das führt zu einem deutlichen amplifikationsunabhängigen Signal auf der Testlinie. Die Analyse des Amplifikats via LFA ist nicht interpretierbar, da Negativkontrollen Signale auf T aufweisen. **(B)** In Anwesenheit von CPD-Helfern im Überschuss wird ein Heterodimer aus FITC/FAM-Primer/Sonde forciert, das die stationäre Phase der Testlinie überströmt. Die Zugabe von CPD-Helfern ermöglicht die Auswertung des Amplifikats via LFA. Der Test ist interpretierbar. [-PCR] Negativkontrolle ohne PCR; [+PCR] Reaktionen durchlaufen PCR; [NC] Negativkontrolle; [PC] Positivkontrolle.

Die Funktionalität dieses Assay-spezifischen Werkzeugs wurde mehrfach im Rahmen dieser Arbeit belegt. CPDs traten bei der Entwicklung verschiedener Nachweise immer wieder unabhängig voneinander auf, was die Häufigkeit dieses Phänomens unterstreicht. Durch die Nutzung der sogenannten CPD-Helfer gelang in allen Fällen die vollständige Eliminierung der falsch-positiven Signale auf dem LFD. Die Abbildung 62 verdeutlicht die Effektivität dieses einfachen, methodischen Werkzeugs. Bei der Entwicklung des CEV-Nachweises wurde ein partieller Helfer verwendet, der nur einen Teil des CPD-verursachenden Primers adressierte. Dieser kurze partielle Helfer zeigte, im Vergleich zum Volllängen-Helfer eine gesteigerte Fähigkeit die CPD-Bildung der markierten Primer zu unterbinden (Abschnitt 4.5.3.3; Abbildung 37).

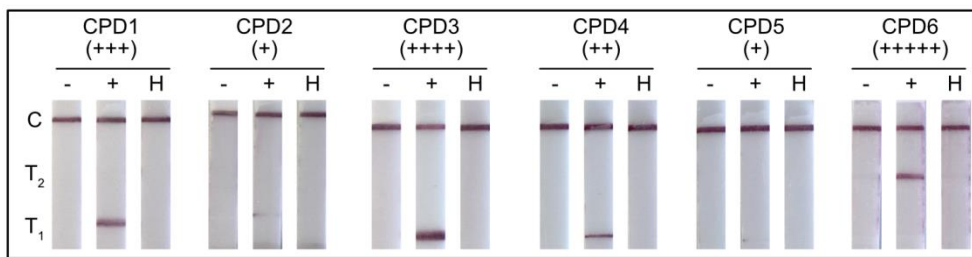


Abbildung 62 - Eliminierung sechs verschiedener Cross Primer Dimere durch CPD-Helfer (Repräsentative Abbildung). Im Laufe der Arbeiten lieferten zahlreiche Primerkombinationen unerwünschte CPDs. Unabhängig von der Ausprägung der Signalstärke („+“ bis „++++“) gelang in jedem Fall die Auslöschung der falsch-positiven Signale durch CPD-Helfer. [-] ohne CPD-verursachende Primer; [+] mit CPD-verursachenden Primern; [H] mit CPD-verursachenden Primern und spezifischem CPD-Helfer.

Es konnte gezeigt werden, dass Volllängen-Helfer dem Lateral Flow Laufpuffer oder dem Reaktionsprodukt selbst zugesetzt werden können. Partielle Helfer können darüber hinaus, sofern sie kurz genug sind und im Optimalfall über einen Elongationsblock verfügen, direkt in den Amplifikationsmix gegeben werden, ohne die Amplifikationsreaktion maßgeblich zu beeinflussen (Abbildung 37 C). Auch diese methodische Herangehensweise erwies sich als sehr praktisch, weil die abschließende Lateral Flow Analyse absolut einheitlich abzuarbeiten war. Folglich lässt sich die vielseitige Nutzbarkeit dieses einfachen, preisgünstigen und gleichzeitig effizienten NALFIA-Werkzeugs hervorheben.

5.2.4.2. Universelle Strategien zur Eliminierung von Cross Primer Dimeren

Der Helfer-basierte Lösungsansatz zur Unterdrückung von Heterodimeren funktioniert wie beschrieben sehr zuverlässig, ist jedoch nicht universell einsetzbar und somit als Assay-spezifische Problemlösung einzuordnen. Im Sinne einer einfachen und somit einheitlichen Lateral Flow Analyse ist die Entwicklung eines oder mehrerer universeller Werkzeuge zur Eliminierung von CPDs im Bedarfsfall erstrebenswert.

Bei verhältnismäßig schwachen Dimeren kann die Verwendung von Wärme bei der Auswertung von Amplifikaten genügen, um CPDs vollständig zu unterdrücken. So wurde bspw. die Lateral Flow Analyse bei 37°C durchgeführt, um eine Primer-Dimerisierung vollständig zu unterbinden (Abschnitt 4.2). Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Universalteststreifen erstaunlich robust gegenüber Wärme sind, sodass die LFA mit den hier verwendeten LFDs bei einer Temperatur bis zu 65°C erfolgen kann (Anhang, Abbildung 93). Die Verdünnung des Amplifikations-Produktes und / oder die Zugabe von DMSO in den Laufpuffer konnte ebenfalls dazu beitragen, dass CPDs sichtbar abgeschwächt wurden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden neben OligodT-Primern und *random* Hexamer-Primern zusätzlich verschiedene Einzelstrangbindepoteine (SSBP) hinsichtlich der Fähigkeit der CPD-Unterdrückung untersucht. Während OligodT- und Random Hexamer Primer auch in hohen Konzentrationen keinen positiven Effekt zeigten (Daten nicht gezeigt), konnte ein SSBP identifiziert werden, welches in der Lage war, einen Großteil der getesteten CPDs erfolgreich zu

unterdrücken (Anhang, Abbildung 91). Dieser universelle Ansatz ist sehr interessant, hat aber gegenüber den CPD-Helfern deutliche Nachteile. Das genutzte SSBP ist nicht thermostabil und kann dementsprechend nicht in Amplifikationstechniken, die höhere Temperaturen nutzen (PCR, LAMP, usw.) „eingebaut“ werden. Weiterhin ist der Einsatz erheblicher Mengen des SSBP's erforderlich, sodass die Nutzung im wissenschaftlichen Kontext denkbar, in kommerziellen Nachweisen aber sehr wahrscheinlich unverhältnismäßig teuer sein dürfte.

5.2.4.3. Zwischenfazit - Die Eliminierung von Cross Primer Dimeren

Die unerwünschte Interaktion zwischen markierten Primern oder Sonden wurde als LFA-charakteristische Limitation herausgearbeitet und durch Literaturstellen belegt. In dieser Arbeit wird eine neue, preisgünstige, vielseitige und effiziente Methode zur Auslöschung der Signal-verursachenden Heterodimere präsentiert. Durch die Verwendung spezifischer CPD-Helfer konnte jedes in der Arbeit entstandene Heterodimer effizient eliminiert werden. Dabei können diese Helfer vor oder nach Amplifikation in das Nachweissystem implementiert werden. Weiterhin wurden höhere Temperaturen, DMSO, einfaches Verdünnen und der Einsatz von Einzelstrangbindeproteinen als weitere unterstützende universelle Werkzeuge für die CPD-Eliminierung identifiziert.

5.2.5. Das Zusammenspiel von Genauigkeit und Empfindlichkeit

Quantitative Real-Time PCR-Analysen profitieren unter anderem von der Nutzung verschiedenster Sonden-basierter Nachweistechiken. Diese Nachweis-Charakteristika tragen maßgeblich dazu bei, dass Real-Time PCR-basierte Tests extrem sensitiv und gleichzeitig sehr spezifisch funktionieren können (Mackay, 2004 / Navarro *et al.*, 2015).

Wird eine DNA-Amplifikationsmethode mit einem LFA kombiniert, so unterliegt auch diese Kombination letztlich vergleichbaren Limitationen wie andere PCR-Techniken. Das endständige Markieren zweier Primer in einer Amplifikationsreaktion ist Teil einer bekannten und verhältnismäßig einfachen NALFIA-Strategie (Pecchia *et al.* 2018 / Janz *et al.*, 2018 / Li *et al.*, 2019), die auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde. Ein exakt adaptiertes Temperaturprotokoll kann eine sensitive und spezifische Nachweisführung ermöglichen (Abschnitt 4.1). Jedoch offenbart diese Methodik Schwächen, wenn es darum geht, sehr sensitive Nachweise zu etablieren. Über den Teststreifen werden alle Reaktionsprodukte erkannt, die relevante Markierungen beinhalten. Unspezifische Amplifikate sind dementsprechend nicht von Spezifischen unterscheidbar. Gerade bei gesteigerter Zyklenzahl (>35) kann sich das Risiko unspezifischer Amplifikation erhöhen (Abschnitt 4.5, CEV-Nachweis). In diesem Beispiel limitiert die Art der Markierung, die Empfindlichkeit des gesamten NALFIA-Systems. Bei der Auswertung von Amplifikaten im Agarosegel ist die Beurteilung der Größe ein Charakteristikum, welches im Lateral Flow Format nicht genutzt werden kann. Bei der Fluoreszenz-basierten Auswertung im Real-Time Thermocycler sind Schmelzkurvenanalysen und fluoreszierende Sonden wichtige Werkzeuge, die eine sehr spezifische und zugleich empfindliche Analytik erlauben. Die Nutzung einer

Hybridisierung des Amplifikats durch eine spezifische Sonde stellt folglich eine Möglichkeit dar, diese beschriebene Limitation - mangelnde Spezifität bei hoher Sensitivität - zu umgehen.

5.2.5.1. „Sensitiver nachweisen“ - Eine schnelle und einfache Hybridisierungsmethode

Im Kontext dieser Arbeit wurde eine sehr einfache, schnelle und sensitive Hybridisierungsstrategie erarbeitet, die an die Amplifikation anschließt. Damit gelingt die Hybridisierung eines Amplifikats binnen einer Minute (Abbildung 29). Der Nachweis des Hybridisierungsproduktes erfolgte via LFA unter hybridisierenden Bedingungen (Hybridisierungspuffer, 50 - 65°C). Hinsichtlich der Hybridisierungseffizienz wurden überraschenderweise klassische Hybridisierungsparameter wie Salzkonzentration, Temperatur oder Sondenkonzentration als weniger ausschlaggebend eingestuft, wenn es darum ging, die Nachweisbarkeit des Hybridisierungsproduktes maßgeblich zu verbessern (Abbildung 28). Einen deutlichen Einfluss nahmen hingegen erneut unmarkierte Oligonukleotide (Helfer). Diese sind komplementär zu bestimmten Bereichen des zu hybridisierenden Stranges, konkurrieren aber nicht mit der Sonde um die Sondenbindestelle (Abbildung 31). Anhand der erarbeiteten Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass diese Faltungshelfer einen wesentlichen Anteil daran haben, z.T. komplexe Sekundärstrukturen einzelsträngiger Nukleinsäuren (hier ssDNA) zu modifizieren. Die Abbildung 63 verdeutlicht den hypothetischen Einfluss von Faltungshelfern in einer Hybridisierungsreaktion.

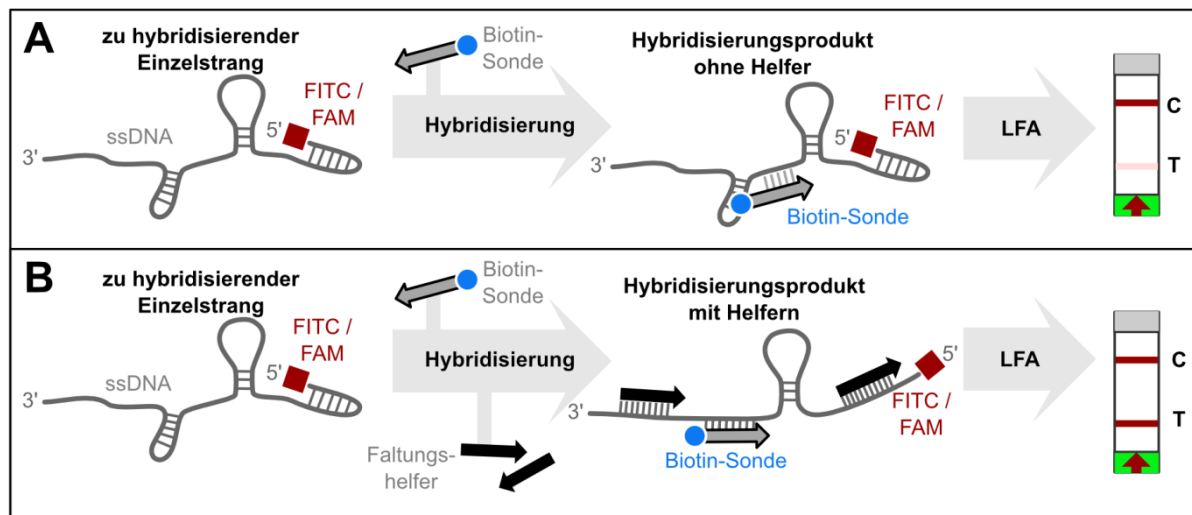


Abbildung 63 - Hypothetisches Funktionsprinzip der Faltungshelfer während der Hybridisierung einer Sonde an DNA-Einzelstrang. **(A)** In Abwesenheit von Helfern kann die Hybridisierung der Biotin-Sonde durch etwaige Sekundärstrukturen behindert werden. **(B)** Die Anwesenheit von Faltungshelfern kann zu verbesserter Zugänglichkeit der Sondenbindestelle und zu besserer Präsentation der für die LFA relevanten Markierungen beitragen.

Tatsächlich kann anhand der Ergebnisse postuliert werden, dass Faltungshelfer auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Nachweisbarkeit des Hybridisierungsproduktes nehmen können. Zum einen können Faltungshelfer die Zugänglichkeit der Sondenbindestelle modifizieren, was sich in der Darstellbarkeit des Hybridisierungsproduktes auf dem LFD äußert. Neben der Zugänglichkeit der Sondenbindestelle und der damit verbundenen Hybridisierungseffizienz scheint die Zugänglichkeit des

terminalen FITC Labels am 5'Ende der ssDNA (PCR-Produkt) ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Der erfolgreiche Nachweis eines Hybridisierungsproduktes im Lateral Flow System erfordert die Interaktion zwischen den Markierungen des Analyten (Biotin, Digoxigenin, FAM / FITC) und der mobilen und stationären Phase des LFD (Abschnitt 1.2.6). Komplexe Sekundärstrukturen von ssDNA können scheinbar Einfluss auf diese Interaktion nehmen, indem relevante *Label* partiell maskiert werden. Durch den Einsatz von Faltungshelfern könnte auch dieses Phänomen kompensiert worden sein. Das potentielle Auflösen terminaler Sekundärstrukturen durch Faltungshelfer führte in der Praxis tatsächlich häufig zu einer verbesserten Nachweisbarkeit des Hybridisierungsproduktes via LFA.

Tabelle 21 - Einfluss von Faltungshelfern in verschiedenen Nachweissystemen.

Nachweissystem	Größe Amplifikat [bp]	terminaler Helfer (FITC-Markierung)	"optimale" Helferkombination
<i>Lactobacillus brevis</i>	124	> (1,5 x)	> (2 x)
<i>Lactobacillus lindneri</i>	124	> (1,5 x)	> (1,8 x)
<i>Lactobacillus backi</i>	124	> (4 x)	> (8,5 x)
<i>Lactobacillus (para-)collinoides</i>	124	< (0,75 x)	> (2,5 x)
<i>Pediococcus damnosus</i>	124	< (0,7 x)	> (2,2 x)
<i>Lactobacillus rossiae</i>	124	=	> (1,3 x)
<i>Lactobacillus (para-) casei</i>	125	> (1,2 x)	> (1,6 x)
Koi Herpesvirus (KHV / CyHV-3)	78	> (2 x)	> (2 x)
Carp Edema Virus (CEV)	119	=	> (3 x)
Carp Edema Virus (CEV)	215	> (3 x)	> (5 x)
Faktor V Leiden - Mutation	140	=	> (5 x)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 11 verschiedene post PCR-Hybridisierungen etabliert. Im Einzelfall wurde die Nachweisbarkeit des Hybridisierungsproduktes um das Achtfache verbessert (*Lactobacillus backi*, Tabelle 21). In 6 dieser 11 Fälle hatte allein der Faltungshelfer, der das FITC-markierte 5'-Ende des einzelsträngigen Amplifikats hybridisiert, einen deutlich positiven Einfluss auf die Nachweisbarkeit des Hybridisierungsproduktes. In allen Testsystemen konnte mindestens eine Assay-spezifische Faltungshelfer-Kombination definiert werden, die zu einer deutlich verbesserten Nachweisbarkeit des Hybridisierungsproduktes auf dem LFD beitrug.

Die grundsätzliche Idee der Faltungshelfer ist nicht neu, wurde jedoch im Zusammenhang Nukleinsäure-basierter Lateral Flow Analytik bisher nicht genutzt. In Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) an ribosomaler RNA wurde der positive Effekt von Faltungshelfern bereits beschrieben (Fuchs *et al.*, 2000 / Pieplis *et al.*, 2002). Bei der Hybridisierung von rRNA im Microarray-Format wurde zudem der Einfluss der Länge der zu hybridisierenden RNA beleuchtet. Dabei ließ sich die Tendenz ableiten, dass kürze RNA-Fragmente effizienter zu hybridisieren scheinen (Liu *et al.*, 2007). Diese Beobachtung konnte tendenziell bestätigt werden, wobei die spezifische Amplikon-Sequenz und die damit verbundene Wahrscheinlichkeit für Sekundärstrukturen wichtiger zu sein scheint, als die bloße Länge (CEV-Nachweis, Abbildung 35). Helfer-Oligonukleotide ermöglichen eine weitestgehend Sekundärstruktur-unabhängige Ableitung und Nutzung markierter Sonden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Etablierung einer schnellen, einfachen, universellen und Helfer-vermittelten Hybridisierungsreaktion nach Amplifikation maßgeblich dazu beitrug, die Nachweisempfindlichkeit deutlich zu verbessern. So konnte für die Detektion des Cyprinid Herpesvirus-3 und des Carp Edema Virus eine Nachweisempfindlichkeit von 9 bzw. 6 Viruskopien je μL erreicht werden. Diese Sensitivität ist letztlich vergleichbar mit verwendeten Real-Time PCR Nachweisen, was den hier erreichten methodischen Teilerfolg unterstreicht (Adamek *et al.*, 2016 / Adamek *et al.*, 2017 / Gilad *et al.*, 2004 / Bercovier *et al.*, 2005).

5.2.5.2. Spezifisch, spezifischer, SNP-Detektion - Spezifitätshelfer

Unmarkierte Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit auf verschiedenen Wegen gewinnbringend genutzt. Sie können einen wesentlichen Beitrag zur Eliminierung von Cross Primer Dimeren leisten (Abschnitt 5.2.4) oder eine schnelle und effiziente Hybridisierungsreaktion ermöglichen (Abschnitt 5.2.5.1). Eine weitere wichtige Funktion dieses universellen NALFIA-Werkzeugs kann die Verbesserung der Nachweisspezifität sein (Abschnitt 4.4.3).

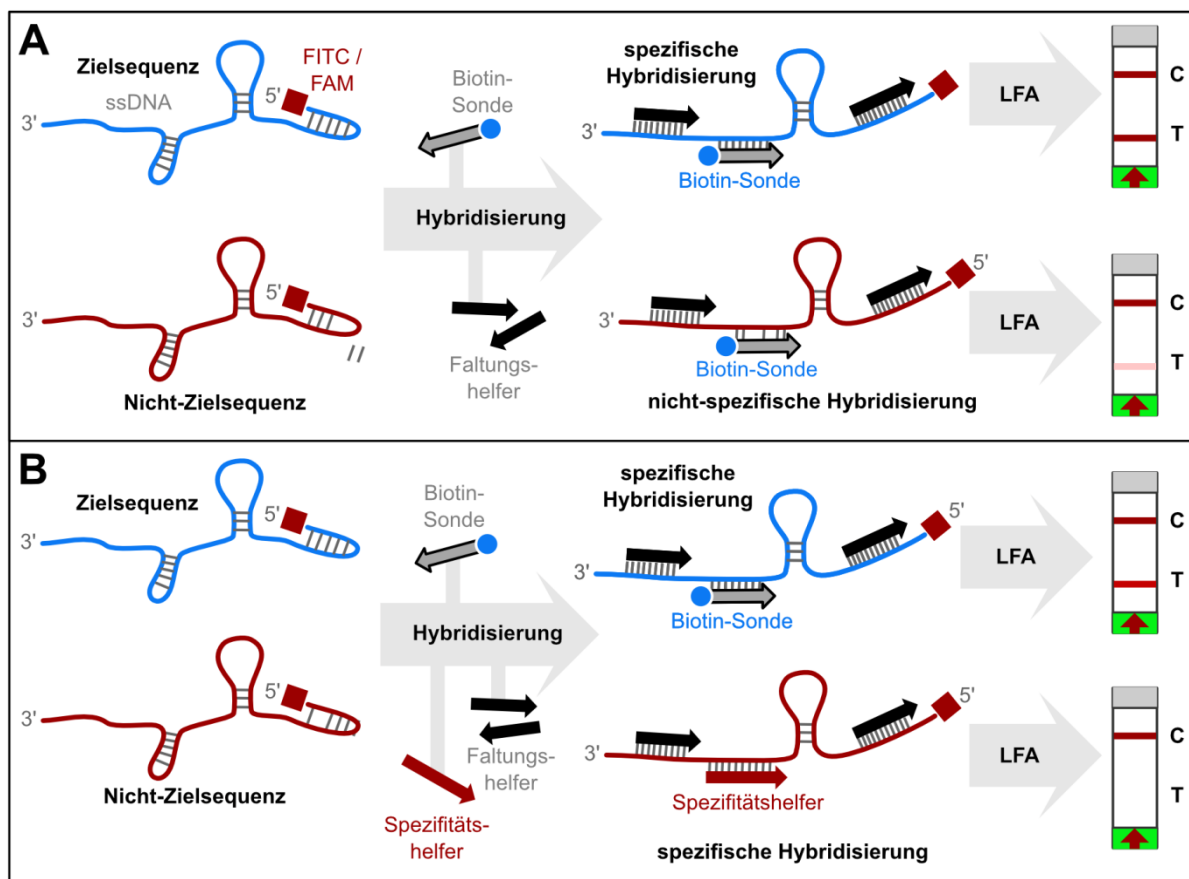


Abbildung 64 - Hypothetisches Funktionsprinzip der Spezifitätshelfer während der Hybridisierung einer Sonde an einen DNA-Einzelstrang. **(A)** Die Biotin-Sonde hybridisiert hier spezifisch an die Zielsequenz (blau), aber auch unspezifisch an die ähnliche Nicht-Zielsequenz (rot), was zu einem falschpositiven Signal auf T des LFD führt. **(B)** In Anwesenheit des Spezifitätshelfers konkurriert dieser mit der Biotin-Sonde um die Bindungsstelle in der Nicht-Zielsequenz. Der spezifisch gebundene Spezifitätshelfer blockiert die unerwünschte Interaktion zwischen Nicht-Zielsequenz und Biotin-Sonde, was im Optimalfall zu einem korrekt negativen Ergebnis (LFA) führt, ohne die spezifische Bindung der Biotin-Sonde an die Zielsequenz drastisch abzuschwächen.

In einigen Fällen tendierten bestimmte Hybridisierungsreaktionen zu Unspezifitäten. Das heißt, markierte Sonden hybridisierten unter den gewählten Bedingungen Amplifikate, die ein oder mehrere Fehlpaarungen zur Sondensequenz aufwiesen. Falsch-positive Ergebnisse waren die Folge. Mit Hilfe nicht-markierter Helfer ließen sich unerwünschte Sondenbindestellen maskieren. Die unspezifische Hybridisierung konnte auf diesem Weg nachweislich unterdrückt werden (Abbildung 31). Die Abbildung 64 verbildlicht die hypothetische Funktion der Spezifitätshelfer. Dieser grundlegende Mechanismus wurde bereits in verschiedenen Nachweistechiken, fernab von NALFIAs, genutzt. Insbesondere in qPCR-basierten SNP-Nachweisen werden sogenannte Block-Oligos verwendet, um bspw. unspezifisches Primer-Annealing zu reduzieren (Morlan *et al.*, 2009 / Wang *et al.*, 2013 / Liu *et al.*, 2019). In der Konsequenz lässt sich hierüber die Spezifität eines Nachweissystems deutlich verbessern. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass dieser bereits bekannte Mechanismus der Block-Oligos nicht nur für die Amplifikation von DNA, sondern auch für die Hybridisierung nach Amplifikation gewinnbringend genutzt werden kann. Die Spezifität dieser einfachen Hybridisierungstechnik kann u. U. ausreichen, dass sogar die Diskriminierung von SNPs sicher gelingt (Nachweis Faktor V Leiden, Abschnitt 4.7.3.1).

5.2.5.3. Zwischenfazit: Sonden-Hybridisierung nach Amplifikation

Die Hybridisierung einer markierten Sonde an einen DNA-Einzelstrang (Amplifikationsprodukt) ist eine verhältnismäßig einfache Technik, um die Spezifität eines NALFIAs, auch bei einer sehr sensitiven Nachweisführung, beizubehalten oder gar zu erhöhen. Leider lässt sich nicht jedes Amplifikat mit jeder beliebigen Sonde gleichwertig effizient hybridisieren und auf dem LFD darstellen (Fuchs *et al.*, 2000 / Pieplis *et al.*, 2002 / Liu *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine sehr schnelle (1 Minute) Hybridisierungstechnik erarbeitet werden. Interessanterweise wurde 2018 (nach Ablauf der praktischen Versuche zu diesem Teil der Arbeit) eine Publikation präsentiert, die trotz Nutzung eines anderen LFDs beinahe identische Hybridisierungsparameter nach Optimierung beschreibt. Auch hier konnte eine sehr schnelle Hybridisierung nach Amplifikation erarbeitet werden. Helfer-Oligonukleotide kamen jedoch nicht zum Einsatz (Wei *et al.*, 2018).

In dieser Arbeit wurden insbesondere Faltungs- und Spezifitätshelfer als essentielle Werkzeuge zur Optimierung bzw. Modifizierung der post-Amplifikations-Hybridisierung identifiziert. Die Nutzung dieser einfach zu adaptierenden Methodik kann auf verschiedenste Nachweistechiken übertragen werden und versteht sich als Aufwertung eines wichtigen Bausteins der NALFIA-*toolbox*.

5.2.6. PCR und Lateral Flow: *Point-of-Care* Kompatibilität

Die kontinuierliche Literaturrecherche ist ein wesentlicher Bestandteil des wissenschaftlichen Arbeitens. Beim Versuch die NALFIA-assozierte Literatur der vergangenen 10 bis 15 Jahre orientierend zu überblicken, fiel auf, dass isothermale Amplifikationstechniken häufiger genutzt werden, als die klassische PCR (Abschnitt 1.3.1). In nur etwa einer von zehn NALFIA-assozierten

Publikationen wurde die PCR als Amplifikationsmethode genutzt. Diese Diskrepanz lässt sich mit einer immer wiederkehrenden Argumentation erklären.

Die LFA ist ein Werkzeug, das es ermöglicht, molekularbiologische Nachweistechiken für *Point-of-Care* (POC) Anwendungen zu qualifizieren (Piepenburg *et al.*, 2006 / Gootenberg und Abudayyeh *et al.*, 2018). Diese POC-Kompatibilität wird gerade der Amplifikationstechnik PCR häufig abgesprochen. „Das Equipment sei sehr teuer“, „geschultes Personal für die Durchführung erforderlich“, „präzise Temperaturprotokolle nötig“ und „die PCR zu zeitintensiv“ sind die am häufigsten ins Feld geführten Argumente für die Nutzung alternativer Amplifikationsmethoden (Asiello *et al.*, 2011 / Kim und Easley *et al.*, 2011 / Wang *et al.*, 2017). In vergleichenden Analysen wird darüber hinaus die vorteilhafte *Performance* der isothermalen Amplifikation hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit und ggf. hinsichtlich der Spezifität gegenüber einer Standard PCR hervorgehoben (Moeini-Zanjani *et al.*, 2020). In dieser Arbeit wurde bewusst die PCR für die Etablierung von NALFIAs genutzt. Dieser Umstand erfordert die kritische Diskussion der tatsächlichen POC-Kompatibilität der PCR, vorrangig im Vergleich zu den häufigsten NALFIA-Amplifikationsmethoden, der RPA und der LAMP (Abschnitt 1.3.3.1 und 1.3.3.2).

5.2.6.1. Nachweisgeschwindigkeit

Die Nachweisgeschwindigkeit isothermaler Amplifikationen ist z.T. sehr beeindruckend. So können LAMP-basierte Nachweise mit weniger als 30 Minuten Amplifikationsdauer sensitive Resultate liefern (Zhang *et al.*, 2020 / Kumvongpion *et al.*, 2017 / Broughton *et al.*, 2020). Andere LFA-kompatible isothermale Amplifikationsmethoden wie die MCDA oder SDA können vergleichbar schnell funktionieren (Wang *et al.*, 2018 / Gong *et al.*, 2019). Als besonders rapide Methode ist die RPA charakterisiert. So können selbst sehr empfindliche RPA-basierte Tests in unter 10 Minuten ein zuverlässiges Resultat ausgeben (Euler *et al.*, 2013 / Kim *et al.*, 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die beschriebene Geschwindigkeit isothermaler Amplifikationstechniken bestätigt werden. Die Erzeugung des Amplikons zur Charakterisierung des Faktor V Leidens gelang ohne besondere Optimierung mit der Rep-rhLAMP in 35 Minuten. Die hier präsentierten PCR-basierten Tests dauerten tatsächlich etwas länger und benötigten eine Amplifikationsdauer von mindestens 50 Minuten. Es gibt aber einfache Stellschrauben, die es erlauben, eine weitere Beschleunigung der PCR zu erreichen, sodass Amplifikate in unter 30 Minuten mit einem Standard-Thermocycler erzeugt werden können (Bustin, 2017 / Mrotzek *et al.*, 2010). In zusätzlichen Versuchen konnte insbesondere die massive Erhöhung der Primerkonzentration und parallele Modifizierung des Temperaturprotokolls eine signifikante Verkürzung der Amplifikationsdauer um etwa 50% bewirken (Anhang, Abbildung 92). Weitere in der Arbeit modifizierte Parameter zur Beschleunigung der Reaktion sind bspw. die Limitierung der Amplikongröße, die Nutzung eines *two-step* Temperaturprotokolls, die Reduktion der Initialdenaturierungsdauer, Denaturierungszeit und –temperatur, sowie die Verwendung von PCR-Verstärkern wie DMSO, BSA oder PVP-40. Die Nutzung

dieser Stellschrauben erlaubte die Entwicklung eines intraoperativen NALFIA-Schnelltests zur Detektion von Bakterien aus Synovialflüssigkeit für die schnelle Diagnose einer *PJI* (*Periprosthetic Joint Infection*) in unter 25 Minuten (Daten nicht in der Arbeit gezeigt, publiziert in *Bone & Joint Research*: Janz *et al.*, 2018).

5.2.6.2. Der *Equipment*-Faktor

Die Limitierung der PCR-Geschwindigkeit ergibt sich unter anderem durch die Notwendigkeit des Heizens und Kühlens der Probe. Wie schnell das funktioniert, wird zu großen Teilen durch den verwendeten Thermocycler definiert. Standard Thermocycler, wie sie in fast allen molekularbiologisch oder diagnostisch arbeitenden Laboren verwendet werden, sind in der Regel sperrig, schwer und empfindlich für einen Transport. Das macht diese Geräte ungeeignet für die Feldanwendung und verdeutlicht die Bedeutung von Vereinfachung und Miniaturisierung.

Es existieren aber alternative PCR-Strategien wie die Laser-PCR, Plasmon-PCR oder die konvektive PCR. Diese Abwandlungen der PCR definieren sich durch die Nutzung alternativer Heiz- und Kühl-Strategien, was sich in einer massiven Beschleunigung der Amplifikation widerspiegeln kann (Roche *et al.*, 2017 / Kim *et al.*, 2009 / Qiu *et al.*, 2019 / Krishnan *et al.*, 2002 / Muddu *et al.*, 2011). Dabei werden Amplifikate in unter 10 Minuten erzeugt (Wheeler *et al.*, 2011 / Roche *et al.*, 2019). Geräte, die eine konvektive PCR ermöglichen sind im Sinne einer POC-Anwendung besonders erwähnenswert, weil sie zusehend optimiert und für *Point-of-Care* Anwendungen immer zugänglicher gemacht werden (Zhang *et al.*, 2019 / Rajendran *et al.*, 2019). Aber auch günstige, kleine und robuste Standard-PCR Cycler werden für spezielle POC-Anwendungen entwickelt und haben sich bereits in der Feldanwendung bewährt (Guevara *et al.*, 2018 / González-González *et al.*, 2019 und 2020).



Abbildung 65 – Übersicht verschiedener (*Point-of-Care* kompatibler) PCR-Geräte. **(A)** Sensquest® Labcycler 48s ist der in der Arbeit verwendete Standard PCR-Cycler, repräsentativ für Laborgerät. **(B)** mini16 thermal cycler (MiniPCR®) Preisgünstiges Gerät für Feldanwendungen und Lehrzwecke. **(C)** „TUB(e)-Cycler“ – in enger Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration IZM entwickelter Thermocycler für den Feldeinsatz. **(D)** Palm PCR™ (Ahran Biosciences) ist kein Thermocycler, sondern ein spezieller Inkubator der eine konvektive PCR ermöglicht.

Eine weitere Rolle hinsichtlich des Equipment-Faktors spielt neben der eigentlichen Nukleinsäureamplifikation, die Probenvorbereitung. Komplexe Nukleinsäure-Extraktionen gehen zumeist ebenfalls mit einem gewissen Geräteaufwand einher.

5.2.6.3. Komplexität der Abarbeitung und Reagenzien-Stabilität

In wissenschaftlichen Texten zur Entwicklung von NALFIAs wird häufig der Fokus auf die Amplifikationsmethodik, die Nachweisgeschwindigkeit und einfache, schnelle Auswertbarkeit gelegt. Dabei wird nicht selten ein Punkt vernachlässigt, der ebenfalls limitierend für die tatsächliche POC-Tauglichkeit sein kann. Die Rede ist von der Probenvorbereitung (Choudhary *et al.*, 2019). So werden bspw. Nukleinsäure-Extraktions-Kits, die für die Labornutzung vorgesehen sind, verwendet und dann mit einer POC-kompatiblen NALFIA-Methode kombiniert (Kusumawati *et al.*, 2015 / Zhang *et al.*, 2019). In der Summe wird diese methodische Kombination in Feldanwendungen schwer umzusetzen sein, da die Probenvorbereitung mit einem gewissen Geräteaufwand einhergeht.

In dieser Arbeit hat sich die PCR als vielseitige und vergleichsweise robuste Methode zur spezifischen und sensitiven Amplifikation von Nukleinsäuren bewährt. Insbesondere die Möglichkeit der Initialdenaturierung und die Wahl des Enzyms kann gewinnbringend für eine Direktanalytik ohne Extraktion genutzt werden (Janz *et al.*, 2018 / Abschnitt 4.1). Die zahlreichen methodischen Erfahrungen mit der PCR, die Vielzahl verfügbarer Enzym- und Puffersysteme ermöglichen oftmals eine extraktionsfreie Direktanalyse an verschiedensten Matrices, wie Blut, pflanzlichen und tierischen Geweben, bakteriellen Anreicherungen, etc. (Mercier *et al.*, 1990 / Chum *et al.*, 2012 / Mens *et al.*, 2012/ Kitpipit *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies mehrfach bestätigt werden. Die direkt PCR ohne vorherige DNA-Extraktion gelang an grampositiven Bakterien, an pflanzlichem Material (*C. reinhardtii*), an Virus-haltigem Eluat von Kiemenabstrichen, an humaner Synovialflüssigkeit (Janz *et al.*, 2018), sowie an Blut (Nachweis Faktor V Leiden mittels *singleplex* PCR und post PCR-Hybridisierung – Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer wesentlicher Punkt, der Nachweissysteme sehr häufig für die Nutzung unter *low resource settings* (LRS) disqualifiziert, ist die Reagenzienstabilität. Flüssige Nachweiskomponenten, die eine dauerhafte Kühlung benötigen, können den Transport und die Nutzung im Feld stark limitieren (Howson *et al.*, 2017). Gerade für die PCR existieren seit langer Zeit Strategien zur Lyophilisierung der Reagenzien, um diese bei Raumtemperatur lagern und transportieren zu können (Aziah *et al.*, 2007). Die Bedeutung für die Diagnostik unter LRS wird dabei besonders hervorgehoben (Kulkarni *et al.*, 2018). Auch LAMP- und RPA-Reagenzien konnten erfolgreich lyophilisiert werden (Rohrmann *et al.*, 2012 / Dhama *et al.*, 2014 / Escadafal *et al.*, 2014).

5.2.6.4. PCR und *Point-of-Care*: ein Zwischenfazit

In der Summe lässt sich schlussfolgern, dass die isothermalen NALFIA-Methoden extrem nützliche *tools* für eine Analytik unter LRS sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die klassische PCR dem in nichts nachstehen muss. Entgegen häufig ins Feld geführter Argumente kann sich die PCR durchaus für POC-Anwendungen eignen. Weiterentwicklungen auf der Reagenzien- und Geräteseite leisten einen wesentlichen Beitrag zur Vereinfachung und Beschleunigung der

Amplifikationsreaktion. Darüber hinaus erwies sich die PCR als äußerst robuste Methode, die in vielen Fällen eine Direktanalytik an verschiedensten Matrices ohne DNA-Extraktion erlaubte. Weitere charakteristische Eigenschaften wie das einfache Primer- / Sondendesign, die *multiplex*-Fähigkeit, sowie die zahlreichen bereits etablierten PCR-Abwandlungen sind wichtige Argumente, die die Bedeutung dieser Methodik im Kontext einer POC-Analytik zusätzlich verstärken. Der Hinweis auf die Tabelle 37 im Anhang beschließt den zweiten Teil der Diskussion und liefert bei Bedarf eine Übersicht NALFIA-charakteristischer Limitationen mit dazugehörigen Lösungsstrategien.

5.3. Teil III - Reporter-basierte Nachweismethoden für NALFIAs

Im Jahr 2015 präsentierten Zhang und Kollegen ein einfaches Lateral Flow-basiertes Nachweiskonzept für eine erhöhte DNase I-Aktivität im Zusammenhang mit Prostatakrebs. Dabei wurde ein dual markierter (Biotin und FITC) doppelsträngiger DNA-Reporter verwendet und via LFA dargestellt. Wurden diese Reportermoleküle „geschnitten“, kam es zu einer Abschwächung der Intensität der Testlinie auf dem LFD. Je schwächer sich die Testlinie darstellte, desto höher die DNase I-Aktivität in der untersuchten Probe postulierten die Autoren (Zhang *et al.*, 2015). Dieses grundsätzliche LFA-basierte Testprinzip wurde bei der Entwicklung neuer CRISPR-Cas-assoziiierter Nachweistechiken wieder aufgegriffen (Abschnitt 1.3.4; Gootenberg und Abudayyeh *et al.*, 2017 / Myhrvold *et al.*, 2018).

5.3.1. Auswertung Reporter-basierte Nachweise mittels MGHD

Interessanterweise wurde die Auswertung von Methoden, wie SHERLOCK oder DETECTR, über den HybriDetect-Teststreifen im Vergleich zu Zhang *et al.* (2015) modifiziert, was die Grundlage für weiterführende Versuche in dieser Arbeit darstellte (Abbildung 10). Für die Beurteilung des Testergebnisses wurde nicht nur die Intensität der T-Linie herangezogen, sondern insbesondere die Intensität der C-Linie. Dieser Umstand erlaubt eine Re-Definition von Test- und Kontrolllinie, was in Publikationen zu den CRISPR-Cas-basierten Nachweismethoden umgesetzt wurde (Kellner *et al.*, 2019 / Abudayyeh *et al.*, 2019). Der Einfachheit halber wurde im Rahmen dieser Arbeit die obere Linie durchgängig als Kontroll-Linie und die untere als Test-Linie definiert, unabhängig von der übergeordneten Nachweistechnik. Zur Beurteilung Reporter-basierter Nachweise wurde die Intensität der Test-Linie mit der Intensität der Kontroll-Linie in ein Verhältnis gesetzt, da beide Linien Informationen zum Reporterstatus beitragen können (Kaminsky *et al.*, 2020).

Der Reporter-basierte Nachweis via LFA war für die Entwickler von Methoden wie SHERLOCK oder DETECTR ein adäquates Mittel, um die Nukleaseaktivität ihrer CRISPR-Cas-Komplexe einfach und schnell zu bewerten (Myhrvold *et al.*, 2018 / Chen *et al.*, 2018). Durch die alternative Verwendung und Interpretation des Universalteststreifens gelang die Entwicklung verschiedenster CRISPR-Cas-basierter NALFIAs mit dem Fokus auf dem Nachweis humanpathogener Viren (Zikavirus, Denguevirus, SARS-CoV-2). Doch neben der Erweiterung ihrer eigenen Nachweistechnologie, ebneten die Autoren durch

die ungewöhnliche Verwendung des Universalteststreifens den Weg für die Adaptierung bzw. Erweiterung bestehender NALFIA-Strategien. Ein passendes Beispiel ist die Reporter-Sonden-Degradierung durch die Exonukleaseaktivität einer verwendeten DNA-Polymerase im Rahmen einer PCR. Hierüber gelang der spezifische Nachweis von *Cronobacter sakazakii* und *Cronobacter malonaticus* aus Säuglingsnahrung mittels abschließender LFA (Akineden *et al.*, 2020).

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war es, die methodische Bedeutung von Reporter-basierten Nachweistechiken herauszuarbeiten, sowie Vor- und Nachteile dieser NALFIA-Nachweistechik zu benennen.

5.3.2. Die RNase H2 als Werkzeug für Reporter-basierte NALFIAs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alternative NALFIA-Methoden entwickelt und getestet, um die Bedeutung Reporter-basierter Nachweise einschätzen zu können. Im Gegensatz zu CRISPR-Cas-basierten Nachweisstrategien, sollte ein spezifischer „Schnitt“ einer Reporter-Sonde während der Amplifikation die zentrale Rolle des zu etablierenden Nachweissystems einnehmen. Hierfür wurde eine spezielle RNase genutzt, die sich bereits als funktionell in der PCR erwiesen hat. Die verwendete RNase H2, eine wichtige Komponente der DNA-Reparatur-Maschinerie in Pro- und Eukaryoten, entstammt dem hyperthermophilen Organismus *Pyrococcus abyssi*, welcher zur Domäne der Archaeen zählt und ursprünglich in der Tiefsee isoliert wurde (Cerritelli *et al.*, 2020 / Wahba *et al.*, 2011 / Cohen *et al.*, 2003). Diese thermostabile RNase H2 erwies sich bereits als funktionelles Werkzeug für die Prozessierung von elongationsblockierten Primern während einer PCR (Dobosy *et al.*, 2011). Insbesondere der einfache Nachweis von SNPs gelingt durch Nutzung der sogenannten RNase H2-abhängigen PCR, kurz rhPCR (Broccanello *et al.*, 2018 / Nakauchi *et al.*, 2020).

In dieser Arbeit wurde das grundlegende Prinzip der RNase H2-abhängigen PCR genutzt und so adaptiert, dass eine Reporter-basierte Auswertung via Lateral Flow genutzt werden konnte. Durch die Verwendung einer speziell konzipierten Reporter-Sonde gelang die Entwicklung des Identifikationsnachweises von *Lactobacillus lindneri*, einem relevanten Schädiger in der Brauerei (Abschnitt 4.6). Dabei erwies sich dieses Testsystem als durchaus spezifisch, da keinerlei Kreuzreaktivitäten mit anderen bierschädigenden *Lactobacillus* spp. detektiert wurden (Abschnitt 4.6.1.2). Die entwickelte Rep-rhPCR-LFA eignete sich darüber hinaus für einen schnellen SNP-Nachweis. Dabei gelang es, ohne aufwändige Optimierungsarbeiten recht klar zwischen den Faktor V Leiden-assoziierten SNP-Varianten zu differenzieren. Über 93% der analysierten Praxisproben wurde korrekt genotypisiert (Abschnitt 4.7.4.1).

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Kompatibilität der RNase H2 mit der *Loop mediated isothermal amplification* (LAMP). In diesem Zusammenhang wurde eine Reporter-basierte LAMP mit Lateral Flow basierter Auswertung kombiniert und auf das Testsystem des FVL-Nachweises übertragen. Dabei gelang es, eine sensitive LAMP-Reaktion zu erarbeiten, die den FVL-SNP überspannt. Es konnte

gezeigt werden, dass während der LAMP die verwendete Reportersonde erfolgreich durch die RNase H2 degradiert werden konnte, jedoch mit unzureichender Spezifität (Abschnitt 4.7.4.2). Um die Funktionalität dieses SNP-Nachweises zu gewährleisten, sind weitere Optimierungen der Rep-rhLAMP-LFA unumgänglich (Sondendesign, Temperatur, Magnesiumkonzentration, LAMP-Additive, etc.). Die Nutzbarkeit der RNase H2 in einer LAMP Reaktion wurde in der Literatur mehrfach als Innovation dargestellt. So wurde im Oktober 2019 eine Methode präsentiert, bei der mit elongationsblockierten Primern eine sehr spezifische SNP-Detektion erreicht wurde (Du *et al.*, 2019). Ein Jahr später veröffentlichten Shen *et al.* (2020) eine Arbeit, in der eine ähnliche Methode samt RNase H2-abhängiger Degradierung einer Sonde, den Fluoreszenz-basierten Nachweis von SNPs erlaubte. Eine Optimierung eines solchen Fluoreszenz-basierten Nachweises durch die RNase H2 abhängige Sonden-basierte LAMP folgte im November 2020 (Ding *et al.*, 2020). Die Bedeutung dieser neuen Methoden inklusive der hier präsentierten Rep-rhLAMP relativiert sich, sofern man das 2017 veröffentlichte Patent von Dobosy und Kollegen mit dem Titel „*Cleavable Primers for Isothermal Amplification*“ genauer betrachtet. Denn in dieser Schrift wird die Nutzbarkeit der RNase H2 in der LAMP nicht nur beschrieben, sondern experimentell mehrfach bestätigt. Dabei werden nicht nur spaltbare Primer genutzt, sondern auch Sonden, die letztlich einen Fluoreszenz-basierten Nachweis erlauben (Dobosy, 2017). Dennoch kann prognostiziert werden, dass die Kombination aus Reporterdegradierung und isothermaler DNA-Amplifikation zukünftig eine wichtige Rolle in der NALFIA-Entwicklung spielen kann.

5.3.3. Vor- und Nachteile Reporter-basierter NALFIAs – Ein Zwischenfazit

Die Verwendung von Reporter-Sonden bringt wichtige Vorteile mit sich. So spielt der beschriebene *high dose hook effect* bei der Nutzung definierter Reportermengen keine Rolle. Dieser Aspekt wurde nach meinem Kenntnisstand bislang in der Literatur nicht als Vorteil herausgestellt. Die Ausprägung von Heterodimeren der Reporter-Fragmente ist grundsätzlich möglich, trat aber im Rahmen dieser Arbeit in keinem Fall auf und könnte theoretisch problemlos über CPD-Helfer gelöst werden (Abschnitt 5.2.4.1). Im Vorfeld wurde explizit auf die Bedeutung von Sonden in NALFIAs eingegangen. Die Verwendung von Sonden ermöglicht grundsätzlich die Entwicklung sehr sensibler Nachweise bei hoher Spezifität (CEV- und KHV-Nachweis, Abschnitt 4.5) Besonders reizvoll ist die spezifische Degradierung einer Reportersonde während der Amplifikationsreaktion, sodass eine einfache und schnelle Beurteilung eines Testresultats ohne zusätzliche Arbeitsschritte nach Amplifikation erfolgen kann.

Es ist gelungen verschiedene Reporter-basierte NALFIAs zu erarbeiten. Nach meinem Wissensstand wurde hier erstmalig eine Reporter-basierte, RNase H2-abhängige PCR mit einem Lateral Flow-basierten *readout* kombiniert. Unter Verwendung dieser neuen Methode gelang es, einen vielversprechenden Nachweis für die Erkennung des Faktor V Leidens zu erarbeiten, der über 93% aller getesteten Praxisproben korrekt genotypisieren konnte. Analog zur PCR konnte zusätzlich gezeigt

werden, dass eine Reporter-basierte, RNase H2-abhängige LAMP mit einer LFA kombiniert werden kann. Die grundlegende Funktionalität der Methode wurde gezeigt. Eine zuverlässige SNP-Erkennung gelang jedoch nicht und erfordert weitere Optimierungen.

Die Entwicklung dieser Reporter-basierten NALFIAs offenbarte aber auch Schwächen dieses Systems. So scheint im derzeitigen Format ein *multiplexing* mit universellem Teststreifen kaum möglich, was bspw. die Implementierung einer Amplifikationskontrolle ausschließt. Inter- und Intra-Lot-spezifische Schwankungen der verwendeten Universalteststreifen erschwerten die Analyse teilweise massiv. Einige Universalteststreifen zeigten eine unzureichende Auslöschung der C-Linie oder eine insensitive Darstellung der Reporterdegradierung, wodurch einige Chargen nicht für die Reporter-basierte Analytik genutzt werden konnte (Anhang, Abbildung 88).

Die Verwendung einer Reporter-basierten LFA eröffnet aus methodischer Sicht zahlreiche Möglichkeiten. Bestehende Nachweistechiken können adaptiert, optimiert oder gänzlich neu erfunden werden. Werkzeuge wie Cas12a, Cas13, Cas14, die Exonuklease-Aktivität diverser DNA-Polymerasen und die RNase H2 sind essentielle Bausteine dieser alternativen Nachweisstrategien. Reporter-basierte NALFIAs haben nicht nur eine Daseinsberechtigung, sondern stellen aus meiner persönlichen Sicht eine klare methodische Bereicherung dar. Bleibt zu hoffen, dass Hersteller universeller LFDs die gleichen Schlüsse ziehen und es schaffen eine entsprechende Plattform bereit zu stellen, die dem Potenzial dieser Methodik gerecht werden.

6. Zusammenfassung

6.1. Praxisrelevanz und *Performance*

Die Fragestellungen dieser Arbeit adressieren Sektoren wie die mikrobiologische Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie, Nischenanwendungen der Biotechnologie, sowie veterinär- und humanmedizinische Diagnostik. Diese thematische Vielfalt verdeutlicht die breite Nutzbarkeit einfacher, schneller, *Point-of-Care* kompatibler Nukleinsäure-Analysemethoden. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere die hier entwickelten Identifikationsnachweise der bierschädigenden Bakterien *Lactobacillus rossiae* und *Lactobacillus cerevisiae*. Diese Testsysteme könnten in ihrer Ausrichtung einen wichtigen Beitrag in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle einer Brauerei leisten, weil die einfache Nachweisführung die Erkennung seltener, aber trotzdem relevanter, produktschädigender Bakterien erlaubt. Es handelt sich um eine Nischenanwendung, die betroffene Brauereibetriebe schnell in die Lage versetzt, sich einem sehr speziellen mikrobiologischen Problem zu stellen.

Der auf einer Hybridisierung beruhende Identifikationsnachweis der häufigsten Bierschädiger *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. backii*, *L. (para-)collinoides*, *L. paracasei*, *L. rossiae* und *P. damnosus* beweist, dass auch komplexere Fragestellungen mit Hilfe von NALFIAs beantwortet werden können. Die Optimierung der Hybridisierungsreaktion nach DNA-Amplifikation durch die gezielte Nutzung unmarkierter DNA-Oligonukleotide ist dabei als wesentliche methodische Innovation hervorzuheben. Am Beispiel des Homo- / Heteroplasmietest für *C. reinhardtii* Chloroplastenmutanten wurde die einfache Adaptierbarkeit von NALFIAs herausgestellt. Gerade dieser Teil der Arbeit betont das Potenzial der hier beschriebenen Methodik für eine stark individualisierte Analytik. Die Nachweise der Karpfenviren CyHV-3 und CEV belegen, mit welcher Empfindlichkeit NALFIAs gestaltet werden können. Dabei liegt die untere Nachweisgrenze mit 9 bzw. 6 DNA-Kopien / μL in einem Bereich, in dem auch etablierte RT-PCR-Systeme an ihre Grenzen stoßen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NALFIAs nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sehr genaue Ergebnisse erzeugen können. Mit PCR-Techniken wie der ARMS-PCR, der *singleplex* PCR samt nachgeschalteter Hybridisierung oder der hier entwickelten Reporter-basierten RNase H2-abhängigen PCR gelang die klare Identifizierung der humanen Faktor V Leiden Punktmutation. Die in der Arbeit gezeigte Genauigkeit, Empfindlichkeit, sowie einfache Adaptierbarkeit in Kombination mit Geschwindigkeit und Einfachheit unterstreichen die Bedeutung und das große Potenzial von NALFIAs für die praktische Nutzung.

6.2. Methodische Limitationen & Innovationen

NALFIAs zeichnen sich insbesondere durch Eigenschaften wie Einfachheit, Geschwindigkeit und *Point-of-Care* Kompatibilität aus. Doch während diese etwas einseitige Aufzählung in der Fachliteratur häufig bemüht wird, so werden vergleichsweise selten relevante Limitationen dieser Methode beleuchtet. Das begrenzte *multiplexing*, der *high dose hook effect*, *carryover* Kontaminationen, sowie die Bildung von Heterodimeren wurden in dieser Arbeit detailliert bearbeitet und diskutiert. Es wurden klare Lösungsstrategien für die hier benannten methodischen Grenzen aufgezeigt. Durch Etablierung einer schnellen, einfachen Hybridisierungstechnik nach DNA-Amplifikation gelang grundsätzlich die Differenzierung von sieben verschiedenen bakteriellen Spezies. Die mit dem *high dose hook effect* verbundenen Grenzen der Universalteststreifen wurden konkret ermittelt und entsprechend in den entwickelten Nachweissystemen berücksichtigt. *Carryover* Kontaminationen wurden durch den Einsatz der Uracil-DNA-Glycosylase in das sehr sensitive CEV-Nachweissystem erfolgreich unterbunden. Falschpositive Signale, die auf eine unerwünschte Heterodimerisierung von Primern bzw. Sonden zurückzuführen waren, konnten zumeist durch Hitze oder Einzelstrangbindeproteine eliminiert werden. Insbesondere die innovative Nutzung nicht-markierter Oligonukleotide für die Auflösung von Cross Primer Dimeren ist als sehr effiziente, kostengünstige und dementsprechend wichtige methodische Neuerung hervorzuheben.

Aus methodischer Sicht nimmt die PCR in dieser Arbeit eine sehr spezielle Rolle ein. Denn obwohl diese Amplifikationstechnik in vielen diagnostischen Fragestellungen als Goldstandard gilt, wird sie im Vergleich zu isothermalen Amplifikationsmethoden vergleichsweise selten im NALFIA-assozierten Kontext genutzt (Goudouris *et al.*, 2020). Die mangelnde *Point-of-Care* Kompatibilität, die Geschwindigkeit und der Geräteaufwand der PCR werden dabei als wesentliche Limitationen betrachtet (Asiello *et al.*, 2011 / Kim und Easley *et al.*, 2011 / Wang *et al.*, 2017). Die Nutzung besonders herausgestellter methodischer Werkzeuge wie die Uracil-DNA-Glycosylase, nicht-markierte Oligonukleotide, die universelle und schnelle Hybridisierung, sowie Techniken zur Beschleunigung einer PCR erlauben durchaus eine schnelle, genaue und teils stark vereinfachte, *Point-of-Care* kompatible Analytik. Folglich konnten in dieser Arbeit wesentliche Argumente gegen die PCR in NALFIA-Systemen entkräftet werden.

Als gänzlich neue Methode wurde die RNase H2-abhängige PCR kombiniert mit einer Lateral Flow-basierten Auswertung entwickelt. Diese Reporter-basierte, RNase H2 - abhängige Amplifikation (PCR / LAMP) zeigt die Vielseitigkeit der PCR und das große Potenzial Reporter-basierter NALFIAs. Die universelle und schnelle Hybridisierung nach der Amplifikationsreaktion ist ein sehr einfaches und trotzdem mächtiges Werkzeug für NALFIAs. Hier gelingt die Genotypisierung von SNPs mit sehr hoher Genauigkeit. Aus methodischer Sicht hat die Nutzung von nicht-markierten Oligonukleotiden den mit Abstand größten Einfluss.

6.3. Nicht-markierte Oligonukleotide in NALFIAs

Nicht-markierte Oligonukleotide, die keinen Anteil an der Amplifikationsreaktion haben, spielten bislang keine große Rolle in der Entwicklung von NALFIAs. Doch auch wenn der für die Arbeit genutzte Universalteststreifen „blind“ für diese kurzen einzelsträngigen DNA-Moleküle ist, so können diese sogenannten Helfer-Oligonukleotide einen erstaunlichen Einfluss auf die Eigenschaften und Funktionalität eines Nachweises nehmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass solche Helfer spezifisch und vielfältig einsetzbar sind, um diverse NALFIA-assoziierte Limitationen zu umgehen.

Cross Primer Dimere (CPD) stellen eine wichtige Limitation in der NALFIA-Entwicklung dar. Durch die Nutzung spezifischer CPD-Helfer lassen sich diese unerwünschten Signale auf dem LFD zuverlässig eliminieren. Bei der Entwicklung eines Nachweises kann jede beliebige Sequenz für die Amplifikationsreaktion genutzt werden, unabhängig davon, ob die genutzten Primer / Sonden zur Heterodimerisierung tendieren. CPD-Helfer lassen sich an verschiedenen Stellen in ein Nachweissystem implementieren und eignen sich auch für den direkten Einsatz in der Amplifikationsreaktion. Dieses einfache und innovative Werkzeug kann für multiple NALFIA-assoziierte Amplifikationstechniken, die auf markierte Primer bzw. Sonden zurückgreifen, genutzt werden. Sie stellen eine wichtige methodische Bereicherung dar. Weiterhin wurden Helfer für die Modifizierung der Sekundärstruktur zu hybridisierender einzelsträngiger DNA genutzt. Durch die Einführung dieser nicht-markierten Faltungshelfer in eine Hybridisierungsreaktion konnte die Darstellbarkeit des Hybridisierungsproduktes auf dem Teststreifen häufig deutlich verbessert werden. Es wird vermutet, dass Faltungshelfer auf unterschiedlichen Wegen die Nachweisbarkeit eines Hybridisierungsproduktes beeinflussen können. Dabei spielt die Zugänglichkeit der für die LFA relevanten Markierungen neben der Zugänglichkeit der eigentlichen Sondenbindestelle vermutlich die entscheidende Rolle. Die Nutzung von Spezifitätshelfern führte zu einer effizienten Maskierung unerwünschter, nicht spezifischer Sondenbindestellen. Damit gelang eine deutliche Steigerung der Hybridisierungsspezifität. Analog zu den CPD-Helfern erscheint es möglich, dass durch Einkürzen der Spezifitäts- und Faltungshelfer sowie durch den Einbau eines Elongationsblocks, *one-pot* Hybridisierungen direkt im Anschluss an die Amplifikation ohne zusätzliche Arbeitsschritte gelingen können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein bisher unbekanntes und wenig genutztes „Werkzeug“ der NALFIA-Entwicklung zu charakterisieren und auf verschiedenen Wegen für eine praktisch relevante Analytik nutzbar zu machen. Die hier gezeigten Techniken lassen sich auf verschiedenste Bereiche Nukleinsäure-basierter Analytik übertragen und verstehen sich als wichtige methodische Erweiterung der NALFIA „toolbox“.

7. Literatur

1. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., & Zhang, F. (2017a). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
2. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Kellner, M. J., & Zhang, F. (2019). Nucleic Acid Detection of Plant Genes Using CRISPR-Cas13. *The CRISPR journal*, 2(3), 165–171. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0011>
3. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6299), aaf5573. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
4. Adamek, M., Matras, M., Jung-Schroers, V., Teitge, F., Heling, M., Bergmann, S. M., Reichert, M., Way, K., Stone, D. M., & Steinhagen, D. (2017). Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus. *Diseases of aquatic organisms*, 126(1), 75–81. <https://doi.org/10.3354/dao03152>
5. Adamek, M., Oschilewski, A., Wohlsein, P., Jung-Schroers, V., Teitge, F., Dawson, A., Gela, D., Piackova, V., Kocour, M., Adamek, J., Bergmann, S. M., & Steinhagen, D. (2017). Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. *Veterinary research*, 48(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0416-7>
6. Adli M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 9(1), 1911. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
7. Ahmed, F. A., Larrea-Sarmiento, A., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2018). Genome-informed diagnostics for specific and rapid detection of *Pectobacterium* species using recombinase polymerase amplification coupled with a lateral flow device. *Scientific reports*, 8(1), 15972. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34275-0>
8. Akineden, Ö., Wittwer, T., Geister, K., Plötz, M., Usleber, E. (2020). Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) with integrated DNA probe degradation for the rapid detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in powdered infant formula. *Food Control* (109). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106952>
9. Albagoush, S. A., Chakraborty, R. K., & Schmidt, A. E. (2020). Factor V Leiden Deficiency. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
10. Allgöwer, S. M., Hartmann, C. A., & Holzhauser, T. (2020). The Development of Highly Specific and Sensitive Primers for the Detection of Potentially Allergenic Soybean (*Glycine max*) Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick (LAMP-LFD). *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(4), 423. <https://doi.org/10.3390/foods9040423>
11. An, L., Tang, W., Ranalli, T. A., Kim, H. J., Wytiaz, J., & Kong, H. (2005). Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *The Journal of biological chemistry*, 280(32), 28952–28958. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503096200>
12. Andronescu, M., Condon, A., Hoos, H. H., Mathews, D. H., & Murphy, K. P. (2007). Efficient parameter estimation for RNA secondary structure prediction. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(13), i19–i28. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm223>
13. Andryukov B. G. (2020). Six decades of lateral flow immunoassay: from determining metabolic markers to diagnosing COVID-19. *AIMS microbiology*, 6(3), 280–304. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020018>
14. Ang, G. Y., Yu, C. Y., Chan, K. G., Singh, K. K., & Chan Yean, Y. (2015). Development of a dry-reagent-based nucleic acid-sensing platform by coupling thermostabilised LAMP-PCR assay to an oligonucleotide-modified lateral flow biosensor. *Journal of microbiological methods*, 118, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.024>
15. Ang, S. H., Rambeli, M., Thevarajah, T. M., Alias, Y. B., & Khor, S. M. (2016). Quantitative, single-step dual measurement of hemoglobin A1c and total hemoglobin in human whole blood using a gold sandwich immunochromatographic assay for personalized medicine. *Biosensors & bioelectronics*, 78, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.045>

16. Aoi, Y., Hosogai, M., & Tsuneda, S. (2006). Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of biotechnology*, 125(4), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.04.007>
17. Arizti-Sanz, J., Freije, C.A., Stanton, A.C. et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Commun* 11, 5921 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19097-x>
18. Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., Ogata, T., & Kitagawa, Y. (2009). Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.016>
19. Asano, S., Shimokawa, M., & Suzuki, K. (2019). PCR Analysis Methods for Detection and Identification of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1887, 95–107. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_9
20. Asiello, P. J., & Baemner, A. J. (2011). Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab on a chip*, 11(8), 1420–1430. <https://doi.org/10.1039/c0lc00666a>
21. Aveyard, J., Mehrabi, M., Cossins, A., Braven, H., & Wilson, R. (2007). One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. *Chemical communications* (Cambridge, England), (41), 4251–4253. <https://doi.org/10.1039/b708859k>
22. Aziah, I., Ravichandran, M., & Ismail, A. (2007). Amplification of ST50 gene using dry-reagent-based polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella typhi*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(4), 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.05.014>
23. Azinheiro, S., Carvalho, J., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2020). Application of Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow for a Naked-Eye Detection of *Listeria monocytogenes* on Food Processing Surfaces. *Foods* (Basel, Switzerland), 9(9), 1249. <https://doi.org/10.3390/foods9091249>
24. Azzi, L., Maurino, V., Baj, A., Dani, M., d'Aiuto, A., Fasano, M., Lualdi, M., Sessa, F., & Alberio, T. (2021). Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2. *Journal of dental research*, 100(2), 115–123. <https://doi.org/10.1177/0022034520969670>
25. Back W., Bohak I., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer, K. H. (1996). Revival of the Species *Lactobacillus lindneri* and the Design of a Species Specific Oligonucleotide Probe. *Systematic and Applied Microbiology*. 19(3), 322-325. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80058-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80058-0)
26. Badolo, A., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Aonuma, H., Bando, H., Fukumoto, S., Sagnon, N., & Kanuka, H. (2012). Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malaria journal*, 11, 227. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-227>
27. Bahçeci, K. S., & Acar, J. (2007). Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis*. *International journal of food microbiology*, 120(3), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.004>
28. Baumer, A., Fabian, M., Wilkens, M. R., Steinhagen, D., & Runge, M. (2013). Epidemiology of cyprinid herpesvirus-3 infection in latently infected carp from aquaculture. *Diseases of aquatic organisms*, 105(2), 101–108. <https://doi.org/10.3354/dao02604>
29. Behr, J., & Vogel, R. F. (2010). Mechanisms of hop inhibition include the transmembrane redox reaction. *Applied and environmental microbiology*, 76(1), 142–149. <https://doi.org/10.1128/AEM.01693-09>
30. Behr, J., Geissler, A. J., Schmid, J., Zehe, A., & Vogel, R. F. (2016). The Identification of Novel Diagnostic Marker Genes for the Detection of Beer Spoiling *Pediococcus damnosus* Strains Using the BLAST Diagnostic Gene findEr. *PloS one*, 11(3), e0152747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152747>
31. Belousov, Y. S., Welch, R. A., Sanders, S., Mills, A., Kulchenko, A., Dempcy, R., Afonina, I. A., Walburger, D. K., Glaser, C. L., Yadavalli, S., Vermeulen, N. M., & Mahoney, W. (2004). Single nucleotide polymorphism genotyping by two colour melting curve analysis using the MGB Eclipse Probe System in challenging sequence environment. *Human genomics*, 1(3), 209–217. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-1-3-209>
32. Beltz, K., Tsang, D.C., Wang, J., Rose, S.D., Bao, Y., Wang, Y., Larkin, K., Rupp, S.M., Schrepfer, D., Datta, K., Gunderson, K., Sailor, C., Hansen, S., Dobosy, J., Lewis, L., Menezes, A., Walder, J., Behlke, M., & Chen, C. (2018). A High-Performing and Cost-Effective SNP Genotyping Method Using rhPCR and Universal Reporters. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 9, 497-512.

33. Benzigar, M. R., Bhattacharjee, R., Baharfar, M., & Liu, G. (2020). Current methods for diagnosis of human coronaviruses: pros and cons. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1–20. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03046-0>
34. Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., & Hedrick, R. P. (2005). Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC microbiology*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-13>
35. Bergsveinson, J., Thomson, E., Jacoby, D., Coady, Y., & Ziola, B. (2017). Genome Sequence of *Megasphaera cerevisiae* NSB1, a Bacterium Isolated from a Canning Line and Able To Grow in Beer with High Alcohol Content. *Genome announcements*, 5(8), e01686-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01686-16>
36. Bertalan, I., Munder, M. C., Weiß, C., Kopf, J., Fischer, D., & Johanningmeier, U. (2015). A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of biotechnology*, 195, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.017>
37. Bertina, R. M., Koeleman, B. P., Koster, T., Rosendaal, F. R., Dirven, R. J., de Ronde, H., van der Velden, P. A., & Reitsma, P. H. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369(6475), 64–67. <https://doi.org/10.1038/369064a0>
38. Bhanothu, V., & Venkatesan, V. (2019). Conventional polymerase chain reaction and amplification refractory mutation system-multi-gene/ multi-primer PCR in the diagnosis of female genital tuberculosis. *Archives of microbiology*, 201(3), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01631-1>
39. Borlinghaus A, Engel R (1997) Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies – method development and validation. *Fruit Processing* 7: 262–266.
40. Boynton, J. E., & Gillham, N. W. (1996). Genetics and transformation of mitochondria in the green alga *Chlamydomonas*. *Methods in enzymology*, 264, 279–296. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)64027-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)64027-0)
41. Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., & Shark, K. B. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4858), 1534–1538. <https://doi.org/10.1126/science.2897716>
42. Broccanello, C., Chiodi, C., Funk, A., McGrath, J. M., Panella, L., & Stevanato, P. (2018). Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant methods*, 14, 28. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0295-6>
43. Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
44. Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
45. Bruning, A., Leeflang, M., Vos, J., Spijker, R., de Jong, M. D., Wolthers, K. C., & Pajkrt, D. (2017). Rapid Tests for Influenza, Respiratory Syncytial Virus, and Other Respiratory Viruses: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65(6), 1026–1032. <https://doi.org/10.1093/cid/cix461>
46. Bustin S. A. (2017). How to speed up the polymerase chain reaction. *Biomolecular detection and quantification*, 12, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.05.002>
47. Cadle, B. A., Rasmus, K. C., Varela, J. A., Leverich, L. S., O'Neill, C. E., Bachtell, R. K., & Cooper, D. C. (2010). Cellular phone-based image acquisition and quantitative ratiometric method for detecting cocaine and benzoylecgonine for biological and forensic applications. *Substance abuse : research and treatment*, 4, 21–33. <https://doi.org/10.4137/sart.s5025>
48. Cai, R., Wang, Z., Yuan, Y., Liu, B., Wang, L., & Yue, T. (2015). Detection of *Alicyclobacillus* spp. in Fruit Juice by Combination of Immunomagnetic Separation and a SYBR Green I Real-Time PCR Assay. *PloS one*, 10(10), e0141049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141049>
49. Cao, M., Fu, Y., Guo, Y., & Pan, J. (2009). *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma*, 235(1-4), 107–110. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0036-9>

50. Carrio, A., Sampedro, C., Sanchez-Lopez, J. L., Pimienta, M., & Campoy, P. (2015). Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(11), 29569–29593. <https://doi.org/10.3390/s151129569>
51. Cerritelli, S. M., & El Hage, A. (2020). RNases H1 and H2: guardians of the stability of the nuclear genome when supply of dNTPs is limiting for DNA synthesis. *Current genetics*, 66(6), 1073–1084. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01086-8>
52. Chang, K., Deng, S., & Chen, M. (2015). Novel biosensing methodologies for improving the detection of single nucleotide polymorphism. *Biosensors & bioelectronics*, 66, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.041>
53. Chang, S., Park, S. H., & Kang, D. H. (2015). Effect of extrinsic factors on the production of guaiacol by *Alicyclobacillus* spp. *Journal of food protection*, 78(4), 831–835. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-456>
54. Chang, S., Park, S. H., & Kang, D. H. (2015). Effect of extrinsic factors on the production of guaiacol by *Alicyclobacillus* spp. *Journal of food protection*, 78(4), 831–835. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-456>
55. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
56. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
57. Chen, J., Chen, K. H., Wang, L. M., Zhang, W. W., Feng, L., Dai, H. Z., & He, Y. N. (2018). High-dose HOOK effect in urinary DcR2 assay in patients with chronic kidney disease. *Clinical biochemistry*, 58, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.06.001>
58. Ching, K. H., He, X., Stanker, L. H., Lin, A. V., McGarvey, J. A., & Hnasko, R. (2015). Detection of shiga toxins by lateral flow assay. *Toxins*, 7(4), 1163–1173. <https://doi.org/10.3390/toxins7041163>
59. Choi, G., Jung, J. H., Park, B. H., Oh, S. J., Seo, J. H., Choi, J. S., Kim, d., & Seo, T. S. (2016). A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria. *Lab on a chip*, 16(12), 2309–2316. <https://doi.org/10.1039/c6lc00329j>
60. Choudhary, P., Das, S., Chakdar, H., Singh, A., Goswami, S. K., & Saxena, A. K. (2019). Rapid high throughput template preparation (rHTTP) method: a novel cost effective method of direct PCR for a wide range of plants. *BMC biotechnology*, 19(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0560-4>
61. Chum, P. Y., Haimes, J. D., André, C. P., Kuusisto, P. K., & Kelley, M. L. (2012). Genotyping of plant and animal samples without prior DNA purification. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (67), 3844. <https://doi.org/10.3791/3844>
62. Cohen, G. N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Quéréllou, J., Ripp, R., Thierry, J. C., Van der Oost, J., Weissenbach, J., Zivanovic, Y., & Forterre, P. (2003). An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Molecular microbiology*, 47(6), 1495–1512. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03381.x>
63. Compton J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350(6313), 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>
64. Connor, C. J., Luo, H., Gardener, B. B., & Wang, H. H. (2005). Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products. *International journal of food microbiology*, 99(3), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.016>
65. Corman, V. M., Haage, V. C., Bleicker, T., Schmidt, M. L., Barbara Mühlemann, B., Marta Zuchowski, M., Jó Lei, W. K., Tscheak, P., Möncke-Buchner, E., Müller, M.A., Krumbholz, A., Drexler, J. F., Drosten, C. (2020). Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid Point-of-Care Antigen tests. *medRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.12.20230292>
66. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695->
67. Corsetti, A., Settanni, L., van Sinderen, D., Felis, G. E., Dellaglio, F., & Gobbetti, M. (2005). *Lactobacillus rossii* sp. nov., isolated from wheat sourdough. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 1), 35–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63075-0>

68. Crannell, Z. A., Rohrman, B., & Richards-Kortum, R. (2014). Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PloS one*, 9(11), e112146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112146>
69. Crissman, J., Lin, Y., Separa, K., Duquette, M., Cohen, M., Velasquez, C., & Cujec, T. (2020). RNase H-dependent PCR enables highly specific amplification of antibody variable domains from single B-cells. *PloS one*, 15(11), e0241803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241803>
70. De Giovanni, N., & Fucci, N. (2013). The current status of sweat testing for drugs of abuse: a review. *Current medicinal chemistry*, 20(4), 545–561. <https://doi.org/10.2174/0929867311320040006>
71. Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A., & Thomas, P. (2014). Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 17(2), 151–166. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.151.166>
72. Ding, S., Chen, R., Chen, G., Li, M., Wang, J., Zou, J., Du, F., Dong, J., Cui, X., Huang, X., Deng, Y., & Tang, Z. (2019). One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP). *Theranostics*, 9(13), 3723–3731. <https://doi.org/10.7150/thno.33980>
73. Ding, X., Yin, K., Li, Z., Pandian, V., Smyth, J. A., Helal, Z., & Liu, C. (2020). Cleavable hairpin beacon-enhanced fluorescence detection of nucleic acid isothermal amplification and smartphone-based readout. *Scientific reports*, 10(1), 18819. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75795-y>
74. Dizon-Townson, D. S., Nelson, L. M., Jang, H., Varner, M. W., & Ward, K. (1997). The incidence of the factor V Leiden mutation in an obstetric population and its relationship to deep vein thrombosis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 176(4), 883–886. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(97\)70615-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(97)70615-x)
75. Dobosy, J. (2017). Cleavable Primers for Isothermal Amplification. International Publication Number: WO2017/136387A1. World Intellectual Property Organization, International Bureau.
76. Dobosy, J. R., Rose, S. D., Beltz, K. R., Rupp, S. M., Powers, K. M., Behlke, M. A., & Walder, J. A. (2011). RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. *BMC biotechnology*, 11, 80. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-80>
77. Dong, E., Du, H., & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(5), 533–534. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)
78. Dong, F., Allawi, H. T., Anderson, T., Neri, B. P., & Lyamichev, V. I. (2001). Secondary structure prediction and structure-specific sequence analysis of single-stranded DNA. *Nucleic acids research*, 29(15), 3248–3257. <https://doi.org/10.1093/nar/29.15.3248>
79. Dong, Y., Wu, X., Li, S., Lu, R., Li, Y., Wan, Z., Qin, J., Yu, G., Jin, X., & Zhang, C. (2021). Comparative evaluation of 19 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for detection of SARS-CoV-2. *Scientific reports*, 11(1), 2936. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80314-0>
80. dos Anjos, M. M., Ruiz, S. P., Nakamura, C. V., & de Abreu Filho, B. A. (2013). Resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spores and biofilm to industrial sanitizers. *Journal of food protection*, 76(8), 1408–1413. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-020>
81. Du, W. F., Ge, J. H., Li, J. J., Tang, L. J., Yu, R. Q., & Jiang, J. H. (2019). Single-step, high-specificity detection of single nucleotide mutation by primer-activatable loop-mediated isothermal amplification (PA-LAMP). *Analytica chimica acta*, 1050, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.068>
82. Escadafal, C., Faye, O., Sall, A. A., Faye, O., Weidmann, M., Strohmeier, O., von Stetten, F., Drexler, J., Eberhard, M., Niedrig, M., & Patel, P. (2014). Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(3), e2730. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002730>
83. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., 3rd, & Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 165–256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
84. Euler, M., Wang, Y., Heidenreich, D., Patel, P., Strohmeier, O., Hakenberg, S., Niedrig, M., Hufert, F. T., & Weidmann, M. (2013). Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. *Journal of clinical microbiology*, 51(4), 1110–1117. <https://doi.org/10.1128/JCM.02704-12>

85. Fang, Z., Wu, W., Lu, X., & Zeng, L. (2014). Lateral flow biosensor for DNA extraction-free detection of *Salmonella* based on aptamer mediated strand displacement amplification. *Biosensors & bioelectronics*, 56, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.015>
86. Feyereisen, M., Mahony, J., O'Sullivan, T., Boer, V., & van Sinderen, D. (2020). Beer spoilage and low pH tolerance is linked to manganese homeostasis in selected *Lactobacillus brevis* strains. *Journal of applied microbiology*, 129(5), 1309–1320. <https://doi.org/10.1111/jam.14730>
87. Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M., & Glöckler, J. F. (2015). Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*, 58(4), 189–194. <https://doi.org/10.2144/000114275>
88. Formosa, T., & Alberts, B. M. (1986). Purification and characterization of the T4 bacteriophage uvsX protein. *The Journal of biological chemistry*, 261(13), 6107–6118.
89. Franzo, G., Legnardi, M., Centelleghé, C., Tucciarone, C. M., Cecchinato, M., Cortey, M., Segalés, J., & Drigo, M. (2018). Development and validation of direct PCR and quantitative PCR assays for the rapid, sensitive, and economical detection of porcine circovirus 3. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 30(4), 538–544. <https://doi.org/10.1177/1040638718770495>
90. Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J., & Amann, R. (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3603–3607. <https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3603-3607.2000>
91. Gaede, L., Steinbrück, J., Bergmann, S. M., Jäger, H., Gräfe, H., Schoon, H.A., Speck, S., Truyen, U. Koi herpesvirus infection in experimentally infected common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and three potential carrier fish species *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758); *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758); and *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) by quantitative real-time PCR and in-situ hybridization. (2017). *J Appl Ichthyol*. 2017; 33: 776– 784. <https://doi.org/10.1111/jai.13368>
92. Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR-Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
93. Gilad, O., Yun, S., Adkison, M. A., Way, K., Willits, N. H., Bercovier, H., & Hedrick, R. P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *The Journal of general virology*, 84(Pt 10), 2661–2667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19323-0>
94. Gilad, O., Yun, S., Andree, K. B., Adkison, M. A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., & Hedrick, R. P. (2002). Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Diseases of aquatic organisms*, 48(2), 101–108. <https://doi.org/10.3354/dao048101>
95. Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F. J., Leutenegger, C. M., Bercovier, H., & Hedrick, R. P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of aquatic organisms*, 60(3), 179–187. <https://doi.org/10.3354/dao060179>
96. Gill, P., & Ghaemi, A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 27(3), 224–243. <https://doi.org/10.1080/15257770701845204>
97. Gocmen, D., Elston, A., Williams, T., Parish, M., & Rouseff, R. L. (2005). Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in applied microbiology*, 40(3), 172–177. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01636.x>
98. Gomez-Martinez, J., Silvy, M., Chiaroni, J., Fournier-Wirth, C., Roubinet, F., Bailly, P., & Brès, J. C. (2018). multiplex Lateral Flow Assay for Rapid Visual Blood Group Genotyping. *Analytical chemistry*, 90(12), 7502–7509. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01078>
99. Gong, L., Liu, E., Che, J., Li, J., Liu, X., Xu, H., & Liang, J. (2019). Multiple Cross Displacement Amplification Coupled With Gold Nanoparticles-Based Lateral Flow Biosensor for Detection of the Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-1*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 226. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00226>
100. González-González, E., Mendoza-Ramos, J. L., Pedroza, S. C., Cuellar-Monterrubio, A. A., Márquez-Ipiña, A. R., Lira-Serhan, D., Trujillo-de Santiago, G., & Alvarez, M. M. (2019). Validation of use of the miniPCR thermocycler for Ebola and Zika virus detection. *PloS one*, 14(5), e0215642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215642>

101. González-González, E., Trujillo-de Santiago, G., Lara-Mayorga, I. M., Martínez-Chapa, S. O., & Alvarez, M. M. (2020). Portable and accurate diagnostics for COVID-19: Combined use of the miniPCR thermocycler and a well-plate reader for SARS-CoV-2 virus detection. *PloS one*, 15(8), e0237418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237418>
102. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., & Zhang, F. (2018). multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 439–444. <https://doi.org/10.1126/science.aag0179>
103. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J., & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
104. Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>
105. Gorski, M. M., de Haan, H. G., Mancini, I., Lotta, L. A., Bucciarelli, P., Passamonti, S. M., Cairo, A., Pappalardo, E., van Hylckama Vlieg, A., Martinelli, I., Rosendaal, F. R., & Peyvandi, F. (2018). Next-generation DNA sequencing to identify novel genetic risk factors for cerebral vein thrombosis. *Thrombosis research*, 169, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.06.011>
106. Goudouris E. S. (2020). Laboratory diagnosis of COVID-19. *Jornal de pediatria*, S0021-7557(20)30199-6. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2020.08.001>
107. Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2), 135. <https://doi.org/10.3390/v12020135>
108. Grasso, E. M., Yousef, A. E., de Lamo Castellvi, S., & Rodriguez-Saona, L. E. (2009). Rapid detection and differentiation of *Alicyclobacillus* species in fruit juice using hydrophobic grid membranes and attenuated total reflectance infrared microspectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10670–10674. <https://doi.org/10.1021/jf902371j>
109. Greengard, J. S., Sun, X., Xu, X., Fernandez, J. A., Griffin, J. H., & Evatt, B. (1994). Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet (London, England)*, 343(8909), 1361–1362. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92497-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92497-x)
110. Gremmels, H., Winkel, B., Schuurman, R., Rosingh, A., Rigter, N., Rodriguez, O., Ubijaan, J., Wensing, A., Bonten, M., & Hofstra, L. M. (2021). Real-life validation of the Panbio™ COVID-19 antigen rapid test (Abbott) in community-dwelling subjects with symptoms of potential SARS-CoV-2 infection. *EClinicalMedicine*, 31, 100677. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100677>
111. Griffin, J. H., Fernández, J. A., Gale, A. J., & Mosnier, L. O. (2007). Activated protein C. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 5 Suppl 1, 73–80. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02491.x>
112. Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2008). Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 12(1), 159–163. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0112-z>
113. Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus* acidoterrestris and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food microbiology*, 26(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.008>
114. Guevara, E.E., Frankel, D.C., Ranaivonasy, J. et al. A simple, economical protocol for DNA extraction and amplification where there is no lab. *Conservation Genet Resour* 10, 119–125 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0758-5>
115. Gupta, V., Chander, V., Chakravarti, S., Sharma, G. K., Malla, J. A., Gupta, V. K., & Nandi, S. (2018). multiplex amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) provides convenient method for differentiation of canine parvovirus vaccine and field strains. *Virusdisease*, 29(4), 565–568. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0491-z>
116. Hammond, R. W., & Zhang, S. (2016). Development of a rapid diagnostic assay for the detection of tomato chlorotic dwarf viroid based on isothermal reverse-transcription-recombinase polymerase amplification. *Journal of virological methods*, 236, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.06.013>
117. Hardinge, P., & Murray, J. (2019). Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. *Scientific reports*, 9(1), 7400. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817>

118. Harris E. H. (2001). CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 52, 363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
119. Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., & Taguchi, H. (2001). Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. Applied microbiology and biotechnology, 55(5), 596–603. <https://doi.org/10.1007/s002530100600>
120. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/technology (Nature Publishing Company), 11(9), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
121. Hoofnagle, A. N., & Wener, M. H. (2009). The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. Journal of immunological methods, 347(1-2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.003>
122. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR-Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science (New York, N.Y.), 327(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
123. Howard I (2006) ACB Workshop October 2005–Review. European Quality Control System (EQCS) Workshop 2006. Available: http://www.eqcs.org/download/Workshop2006/07_ACBworkshop2005.pdf
124. Howson, E., Armson, B., Madi, M., Kasanga, C. J., Kandusi, S., Sallu, R., Chepkwony, E., Siddle, A., Martin, P., Wood, J., Mioulet, V., King, D. P., Lembo, T., Cleaveland, S., & Fowler, V. L. (2017). Evaluation of Two Lyophilized Molecular Assays to Rapidly Detect Foot-and-Mouth Disease Virus Directly from Clinical Samples in Field Settings. Transboundary and emerging diseases, 64(3), 861–871. <https://doi.org/10.1111/tbed.12451>
125. Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nature reviews. Microbiology, 1–14. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
126. Huang, X., Zhai, C., You, Q., & Chen, H. (2014). Potential of cross-priming amplification and DNA-based lateral-flow strip biosensor for rapid on-site GMO screening. Analytical and bioanalytical chemistry, 406(17), 4243–4249. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7791-y>
127. Huang, Y., Wang, W., Wu, T., Xu, L. P., Wen, Y., & Zhang, X. (2016). A three-line lateral flow biosensor for logic detection of microRNA based on Y-shaped junction DNA and target recycling amplification. Analytical and bioanalytical chemistry, 408(28), 8195–8202. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9925-x>
128. Hui, W., Zhang, S., Zhang, C., Wan, Y., Zhu, J., Zhao, G., Wu, S., Xi, D., Zhang, Q., Li, N., & Cui, Y. (2016). A novel lateral flow assay based on GoldMag nanoparticles and its clinical applications for genotyping of MTHFR C677T polymorphisms. Nanoscale, 8(6), 3579–3587. <https://doi.org/10.1039/c5nr07547e>
129. Hünninger, T., Felbinger, C., Wessels, H., Mast, S., Hoffmann, A., Schefer, A., Märklbauer, E., Paschke-Kratzin, A., & Fischer, M. (2015). Food Targeting: A Real-Time PCR Assay Targeting 16S rDNA for Direct Quantification of *Alicyclobacillus* spp. Spores after Aptamer-Based Enrichment. Journal of agricultural and food chemistry, 63(17), 4291–4296. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00874>
130. Hünninger, T., Fischer, C., Wessels, H., Hoffmann, A., Paschke-Kratzin, A., Haase, I., & Fischer, M. (2015). Food sensing: selection and characterization of DNA aptamers to *Alicyclobacillus* spores for trapping and detection from orange juice. Journal of agricultural and food chemistry, 63(8), 2189–2197. <https://doi.org/10.1021/jf505996m>
131. Hussain, H., & Chong, N. F. (2016). Combined Overlap Extension PCR Method for Improved Site Directed Mutagenesis. BioMed research international, 2016, 8041532. <https://doi.org/10.1155/2016/8041532>
132. Imanaka T. (2011) Enzymes Involved in DNA Amplification (e.g. Polymerases) from Thermophiles: Evolution of PCR Enzymes. In: Horikoshi K. (eds) Extremophiles Handbook. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_22
133. Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekisoe, O. M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J., & Igarashi, I. (2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites. Journal of microbiological methods, 71(3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.09.019>
134. Itonaga, M., Matsuzaki, I., Warigaya, K., Tamura, T., Shimizu, Y., Fujimoto, M., Kojima, F., Ichinose, M., & Murata, S. (2016). Novel Methodology for Rapid Detection of KRAS Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification. PloS one, 11(3), e0151654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151654>
135. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>

136. Janz, V., Schoon, J., Morgenstern, C., Preininger, B., Reinke, S., Duda, G., Breitbach, A., Perka, C. F., & Geissler, S. (2018). Rapid detection of periprosthetic joint infection using a combination of 16s rDNA polymerase chain reaction and lateral flow immunoassay: A Pilot Study. *Bone & joint research*, 7(1), 12–19. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.71.BJR-2017-0103.R2>
137. Jayamohan, H., Lambert, C. J., Sant, H. J., Jafek, A., Patel, D., Feng, H., Beeman, M., Mahmood, T., Nze, U., & Gale, B. K. (2020). SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1–23. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>
138. Jeffreys, A. J., Wilson, V., Neumann, R., & Keyte, J. (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic acids research*, 16(23), 10953–10971. <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.10953>
139. Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International journal of food microbiology*, 33(1), 139–155. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01154-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01154-3)
140. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
141. Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Kim, N. G., Woolley, A. E., Segel, M., Barretto, R., Ranu, A., Macrae, R. K., Faure, G., Ioannidi, E. I., Krajewski, R. N., Bruneau, R., Huang, M. W., Yu, X. G., Li, J. Z., Walker, B. D., Hung, D. T., Greninger, A. L., Jerome, K. R., ... Zhang, F. (2020). Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *The New England journal of medicine*, 383(15), 1492–1494. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2026172>
142. Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Segel, M., Bruneau, R., Huang, M. W., Kim, N. G., Yu, X., Li, J., Walker, B. D., Greninger, A. L., Jerome, K. R., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2020). Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2020.05.04.20091231. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>
143. Jung-Schroers, V., Adamek, M., Teitge, F., Hellmann, J., Bergmann, S. M., Schütze, H., Kleingeld, D. W., Way, K., Stone, D., Runge, M., Keller, B., Hesami, S., Waltzek, T., & Steinhagen, D. (2015). Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC veterinary research*, 11, 114. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0424-7>
144. Kajala, I., Bergsveinson, J., Friesen, V., Redekop, A., Juvonen, R., Storgårds, E., & Ziola, B. (2018). *Lactobacillus backii* and *Pediococcus damnosus* isolated from 170-year-old beer recovered from a shipwreck lack the metabolic activities required to grow in modern lager beer. *FEMS microbiology ecology*, 94(1), 10.1093/femsec/fix152. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix152>
145. Kaminski, M. M., Alcantar, M. A., Lape, I. T., Greensmith, R., Huske, A. C., Valeri, J. A., Marty, F. M., Klämbt, V., Azzi, J., Akalin, E., Riella, L. V., & Collins, J. J. (2020). A CRISPR-based assay for the detection of opportunistic infections post-transplantation and for the monitoring of transplant rejection. *Nature biomedical engineering*, 4(6), 601–609. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0546-5>
146. Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature protocols*, 14(10), 2986–3012. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>
147. Kern, C. C., Vogel, R. F., & Behr, J. (2014). Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential. *Food microbiology*, 40, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.015>
148. Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., & Flegel, T. W. (2008). Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of virological methods*, 153(2), 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.025>
149. Kil, E. J., Kim, S., Lee, Y. J., Kang, E. H., Lee, M., Cho, S. H., Kim, M. K., Lee, K. Y., Heo, N. Y., Choi, H. S., Kwon, S. T., & Lee, S. (2015). Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination. *Journal of virological methods*, 213, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.10.020>
150. Kim, H., Dixit, S., Green, C. J., & Faris, G. W. (2009). Nanodroplet real-time PCR system with laser assisted heating. *Optics express*, 17(1), 218–227. <https://doi.org/10.1364/oe.17.000218>
151. Kim, J. M., Lim, S. J., Kim, S., Kim, M., Kim, B., Tai, T. A., Kim, S., & Yoon, B. (2020). Rapid detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid qPCR and a DNA-chip. *Journal of veterinary science*, 21(1), e4. <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e4>

152. Kim, J., & Easley, C. J. (2011). Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. *Bioanalysis*, 3(2), 227–239. <https://doi.org/10.4155/bio.10.172>
153. Kim, J., Cao, X. E., Finkelstein, J. L., Cárdenas, W. B., Erickson, D., & Mehta, S. (2019). A two-colour multiplexed lateral flow immunoassay system to differentially detect human malaria species on a single test line. *Malaria journal*, 18(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2957-x>
154. Kim, S. W., Giri, S. S., Kim, S. G., Kwon, J., Oh, W. T., & Park, S. C. (2020). Carp Edema Virus and Cyprinid Herpesvirus-3 Coinfection is Associated with Mass Mortality of Koi (*Cyprinus carpio haematopterus*) in the Republic of Korea. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(3), 222. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030222>
155. Kim, S., & Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual review of biomedical engineering*, 9, 289–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>
156. Kim, Y. K., Lim, S. I., Cho, I. S., Cheong, K. M., Lee, E. J., Lee, S. O., Kim, J. B., Kim, J. H., Jeong, D. S., An, B. H., & An, D. J. (2015). A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhea virus: The lateral immunochromatography assay. *Journal of virological methods*, 225, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.024>
157. Kim, Y., Yaseen, A. B., Kishi, J. Y., Hong, F., Saka, S. K., Sheng, K., Gopalkrishnan, N., Schaus, T. E., & Yin, P. (2020). Single-strand RPA for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2020.08.17.20177006. <https://doi.org/10.1101/2020.08.17.20177006>
158. Kindle, K. L., Schnell, R. A., Fernández, E., & Lefebvre, P. A. (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *The Journal of cell biology*, 109(6 Pt 1), 2589–2601. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.2589>
159. Kitpipit, T., Sittichan, K., & Thanakiatkrai, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food chemistry*, 163, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.062>
160. Koksai, V., Baris, I., & Etlik, O. (2007). Primer-engineered multiplex PCR-RFLP for detection of MTHFR C677T, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations. *Experimental and molecular pathology*, 83(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.12.006>
161. Konstantou, J. K., Ioannou, P. C., & Christopoulos, T. K. (2009). Dual-allele dipstick assay for genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension reaction. *European journal of human genetics : EJHG*, 17(1), 105–111. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.139>
162. Koob, J., Jacob, F., Wenning, M., & Hutzler, M. (2017). *Lactobacillus cerevisiae* sp. nov., isolated from a spoiled brewery sample. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(9), 3452–3457. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002139>
163. Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
164. Kricka L. J. (2002). Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Annals of clinical biochemistry*, 39(Pt 2), 114–129. <https://doi.org/10.1258/0004563021901865>
165. Krishnan, M., Ugaz, V. M., & Burns, M. A. (2002). PCR in a Rayleigh-Bénard convection cell. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), 793. <https://doi.org/10.1126/science.298.5594.793>
166. Krölov, K., Frolova, J., Tudoran, O., Suhorutsenko, J., Lehto, T., Sibul, H., Mäger, I., Laanpere, M., Tulp, I., & Langel, Ü. (2014). Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by recombinase polymerase amplification directly from urine samples. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 16(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.08.003>
167. Kuang, H., Xing, C., Hao, C., Liu, L., Wang, L., & Xu, C. (2013). Rapid and highly sensitive detection of lead ions in drinking water based on a strip immunosensor. *Sensors* (Basel, Switzerland), 13(4), 4214–4224. <https://doi.org/10.3390/s130404214>
168. Kujovich J. L. (2011). Factor V Leiden thrombophilia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2>
169. Kulkarni, R. D., Mishra, M. N., Mohanraj, J., Chandrasekhar, A., Ajantha, G. S., Kulkarni, S., & Bhat, S. (2018). Development of a dry-reagent mix-based polymerase chain reaction as a novel tool for the identification of *Acinetobacter* species and its comparison with conventional polymerase chain reaction. *Journal of laboratory physicians*, 10(1), 68–72. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_74_17

170. Kumvongpin, R., Jearanaikoon, P., Wilailuckana, C., Sae-Ung, N., Prasongdee, P., Daduang, S., Wongsena, M., Boonsiri, P., Kiatpathomchai, W., Swangvaree, S. S., Sandee, A., & Daduang, J. (2017). Detection assay for HPV16 and HPV18 by loop-mediated isothermal amplification with lateral flow dipstick tests. *Molecular medicine reports*, 15(5), 3203–3209. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6370>
171. Kurn, N., Chen, P., Heath, J. D., Kopf-Sill, A., Stephens, K. M., & Wang, S. (2005). Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications. *Clinical chemistry*, 51(10), 1973–1981. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.053694>
172. Kusumawati, A., Tampubolon, I. D., Hendarta, N. Y., Salasia, S. I., Wanahari, T. A., Mappakaya, B. A., & Hartati, S. (2015). Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for an easy and rapid detection of Jembrana disease virus. *Virusdisease*, 26(3), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s13337-015-0277-5>
173. Lalremruata, A., Nguyen, T. T., McCall, M., Mombo-Ngoma, G., Agnandji, S. T., Adegnik, A. A., Lell, B., Ramharter, M., Hoffman, S. L., Kremsner, P. G., & Mordmüller, B. (2020). Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Assay for Ultrasensitive Detection of Low-Density Plasmodium falciparum Infection from Controlled Human Malaria Infection Studies and Naturally Acquired Infections. *Journal of clinical microbiology*, 58(5), e01879-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01879-19>
174. Law, J. W., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
175. Ledford, H., & Callaway, E. (2020). Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature*, 586(7829), 346–347. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02765-9>
176. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (62), 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
177. Lee, R. A., Puig, H., Nguyen, P. Q., Angenent-Mari, N. M., Donghia, N. M., McGee, J. P., Dvorin, J. D., Klapperich, C. M., Pollock, N. R., & Collins, J. J. (2020). Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of Plasmodium species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25722–25731. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010196117>
178. Lee, S. H., Baek, Y. H., Kim, Y. H., Choi, Y. K., Song, M. S., & Ahn, J. Y. (2017). One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV. *Frontiers in microbiology*, 7, 2166. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02166>
179. Lefever, S., Rihani, A., Van der Meulen, J., Pattyn, F., Van Maerken, T., Van Dorpe, J., Hellemans, J., & Vandesompele, J. (2019). Cost-effective and robust genotyping using double-mismatch allele-specific quantitative PCR. *Scientific reports*, 9(1), 2150. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38581-z>
180. Li, J., Liang, W., Xu, S., Shi, J., Zhou, X., Liu, B., Yu, L., Xiong, J., Si, G., & He, D. (2019). Rapid and sensitive detection of Senecavirus A by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick method. *PloS one*, 14(5), e0216245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216245>
181. Li, J., Macdonald, J., & von Stetten, F. (2018). 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>
182. Li, J., Pollak, N. M., & Macdonald, J. (2019). multiplex Detection of Nucleic Acids Using Recombinase Polymerase Amplification and a Molecular Colorimetric 7-Segment Display. *ACS omega*, 4(7), 11388–11396. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01097>
183. Li, X. Y., Zhang, C., Zhang, Q. L., Zhu, J. L., Liu, Q., Chen, M. W., Yang, X. M., Hui, W. L., & Cui, Y. L. (2017). Sensitive genotyping of mutations in the EGFR gene from NSCLC patients using PCR-GoldMag lateral flow device. *Scientific reports*, 7(1), 8346. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08210-8>
184. Lian, T., Hui, W., Li, X., Zhang, C., Zhu, J., Li, R., Wan, Y., & Cui, Y. (2016). Apolipoprotein E genotyping using PCR-GoldMag lateral flow assay and its clinical applications. *Molecular medicine reports*, 14(5), 4153–4161. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5768>
185. Liljander, A., Yu, M., O'Brien, E., Heller, M., Nepper, J. F., Weibel, D. B., Gluecks, I., Younan, M., Frey, J., Falquet, L., & Jores, J. (2015). Field-Applicable Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae. *Journal of clinical microbiology*, 53(9), 2810–2815. <https://doi.org/10.1128/JCM.00623-15>

186. Lin, C. W., Kuo, J. C., Liu, H. L., Cheng, Y. S., & Huang, H. L. (2018). A new method for detection of single nucleotide polymorphism in a female reproduction-associated gene, *tmigd1*, of *Anas platyrhynchos* using a strip biosensor with gold nanoparticles. *Poultry science*, 97(10), 3456–3462. <https://doi.org/10.3382/ps/pey240>
187. Lin, L., Guo, J., Liu, H., & Jiang, X. (2021). Rapid Detection of Hepatitis B Virus in Blood Samples Using a Combination of Polymerase Spiral Reaction With Nanoparticles Lateral-Flow Biosensor. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 578892. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.578892>
188. Litos, I. K., Emmanouilidou, E., Glynou, K. M., Laios, E., Ioannou, P. C., Christopoulos, T. K., Kampa, M., Castanas, E., & Gravanis, A. (2007). Rapid genotyping of CYP2D6, CYP2C19 and TPMT polymorphisms by primer extension reaction in a dipstick format. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6), 1849–1857. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1593-4>
189. Litos, I. K., Ioannou, P. C., Christopoulos, T. K., Traeger-Synodinos, J., & Kanavakis, E. (2009). Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Biosensors & bioelectronics*, 24(10), 3135–3139. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.03.010>
190. Liu, C., Qi, R. J., Jiang, J. Z., Zhang, M. Q., & Wang, J. Y. (2019). Development of a Blocking Primer to Inhibit the PCR Amplification of the 18S rDNA Sequences of *Litopenaeus vannamei* and Its Efficacy in *Crassostrea hongkongensis*. *Frontiers in microbiology*, 10, 830. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00830>
191. Liu, W. T., Guo, H., & Wu, J. H. (2007). Effects of target length on the hybridization efficiency and specificity of rRNA-based oligonucleotide microarrays. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 73–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.01468-06>
192. Liu, W., Dong, D., Yang, Z., Zou, D., Chen, Z., Yuan, J., & Huang, L. (2015). Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Scientific reports*, 5, 12723. <https://doi.org/10.1038/srep12723>
193. Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends in analytical chemistry : TRAC*, 98, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
194. Lohse, S., Pfuhl, T., Berkó-Göttel, B., Rissland, J., Geißler, T., Gärtner, B., Becker, S. L., Schneitler, S., & Smola, S. (2020). Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(11), 1231–1232. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30362-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30362-5)
195. Longo, M. C., Berninger, M. S., & Hartley, J. L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93(1), 125–128. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90145-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90145-h)
196. Loose, F. N., Breitbach, A., Bertalan, I., Rüster, D., Truyen, U., & Speck, S. (2020). Diagnostic validation of a rapid and field-applicable PCR-lateral flow test system for point-of-care detection of cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *PloS one*, 15(10), e0241420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241420>
197. Lourens, A., Jarvis, J. N., Meintjes, G., & Samuel, C. M. (2014). Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by use of lateral flow assay on cerebrospinal fluid samples: influence of the high-dose "hook" effect. *Journal of clinical microbiology*, 52(12), 4172–4175. <https://doi.org/10.1128/JCM.01683-14>
198. Lucotte, G., & Champenois, T. (2003). duplex PCR-RFLP for simultaneous detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A. *Molecular and cellular probes*, 17(5), 267–269. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.07.008>
199. Luo, H., Yousef, A. E., & Wang, H. H. (2004). A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Letters in applied microbiology*, 39(4), 376–382. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01596.x>
200. Ma, C., Wang, F., Wang, X., Han, L., Jing, H., Zhang, H., & Shi, C. (2017). A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 53(77), 10696–10699. <https://doi.org/10.1039/c7cc06469a>
201. Ma, Q., Yao, J., Yuan, S., Liu, H., Wei, N., Zhang, J., & Shan, W. (2019). Development of a lateral flow recombinase polymerase amplification assay for rapid and visual detection of *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* in cerebral spinal fluid. *BMC infectious diseases*, 19(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3744-6>
202. Mackay I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(3), 190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x>
203. Magambo, K. A., Kalluvya, S. E., Kapoor, S. W., Seni, J., Chofle, A. A., Fitzgerald, D. W., & Downs, J. A. (2014). Utility of urine and serum lateral flow assays to determine the prevalence and predictors of cryptococcal antigenemia in

- HIV-positive outpatients beginning antiretroviral therapy in Mwanza, Tanzania. *Journal of the International AIDS Society*, 17(1), 19040. <https://doi.org/10.7448/IAS.17.1.19040>
204. Mak, G. C., Cheng, P. K., Lau, S. S., Wong, K. K., Lau, C. S., Lam, E. T., Chan, R. C., & Tsang, D. N. (2020). Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 129, 104500. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104500>
 205. Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1311, 47–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4
 206. Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., & Collins, F. S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic acids research*, 19(5), 1154. <https://doi.org/10.1093/nar/19.5.1154>
 207. Mast, S., Dietrich, R., Didier, A., & Märklbauer, E. (2016). Development of a Polyclonal Antibody-Based Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Various Fruit Juices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(2), 497–504. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03841>
 208. Mathews D. H. (2004). Using an RNA secondary structure partition function to determine confidence in base pairs predicted by free energy minimization. *RNA* (New York, N.Y.), 10(8), 1178–1190. <https://doi.org/10.1261/rna.7650904>
 209. Matras, M., Borzym, E., Stone, D., Way, K., Stachnik, M., Maj-Paluch, J., Palusińska, M., & Reichert, M. (2017). Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Journal of fish diseases*, 40(3), 319–325. <https://doi.org/10.1111/jfd.12518>
 210. Matras, M., Stachnik, M., Borzym, E., Maj-Paluch, J., & Reichert, M. (2019). Potential vector species of carp edema virus (CEV). *Journal of fish diseases*, 42(7), 959–964. <https://doi.org/10.1111/jfd.13000>
 211. Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M., & Yamasato, K. (2002). *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 5), 1681–1685. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1681>
 212. Mayfield, S. P., Manuell, A. L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., & Marin-Navarro, J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
 213. McCaskill J. S. (1990). The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers*, 29(6-7), 1105–1119. <https://doi.org/10.1002/bip.36029062>
 214. Mei, Z., Qu, W., Deng, Y., Chu, H., Cao, J., Xue, F., Zheng, L., El-Nezamic, H. S., Wu, Y., & Chen, W. (2013). One-step signal amplified lateral flow strip biosensor for ultrasensitive and on-site detection of bisphenol A (BPA) in aqueous samples. *Biosensors & bioelectronics*, 49, 457–461. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.006>
 215. Mens, P. F., de Bes, H. M., Sondo, P., Laochan, N., Keerecharoen, L., van Amerongen, A., Flint, J., Sak, J. R., Proux, S., Tinto, H., & Schallig, H. D. (2012). Direct blood PCR in combination with nucleic acid lateral flow immunoassay for detection of *Plasmodium* species in settings where malaria is endemic. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3520–3525. <https://doi.org/10.1128/JCM.01426-12>
 216. Mercier, B., Gaucher, C., Feugeas, O., & Mazurier, C. (1990). Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic acids research*, 18(19), 5908. <https://doi.org/10.1093/nar/18.19.5908>
 217. Moeini-Zanjani, A., Pournajaf, A., Ferdosi-Shahandashti, E., Gholami, M., Masjedian, F., Khafri, S., & Rajabnia, R. (2020). Comparison of loop-mediated isothermal amplification and conventional PCR tests for diagnosis of common *Brucella* species. *BMC research notes*, 13(1), 533. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05377-8>
 218. Moers, A. P. H. A., Hallett, R. L., Borrow, R., Schallig, H. D. F. H., Sutherland, C. J., & van Amerongen, A. (2015). Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* by PCR Primer Extension and Lateral Flow Immunoassay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 365–371. <https://doi.org/10.1128/AAC.03395-14>
 219. Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M. multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodborne pathogens in raw milk. *J Appl Microbiol*. 2019 Jul;127(1):262-273. doi: 10.1111/jam.14285. PMID: 31002451.
 220. Morales-Narváez, E., Naghdi, T., Zor, E., & Merkoçi, A. (2015). Photoluminescent lateral-flow immunoassay revealed by graphene oxide: highly sensitive paper-based pathogen detection. *Analytical chemistry*, 87(16), 8573–8577. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02383>

221. Moreno, M. L., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á., León, F., Rodríguez-Herrera, A., & Sousa, C. (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*, 66(2), 250–257. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310148>
222. Morlan, J., Baker, J., & Sinicropi, D. (2009). Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PloS one*, 4(2), e4584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004584>
223. Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular detection and quantification*, 1(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>
224. Mothershed, E. A., & Whitney, A. M. (2006). Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 363(1-2), 206–220. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.050>
225. Motré, A., Li, Y., & Kong, H. (2008). Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase. *Gene*, 420(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.017>
226. Mrotzek, G., Haryanti, Koesharyani, I., Tretyakov, A. N., Sugama, K., & Saluz, H. P. (2010). Fast short-fragment PCR for rapid and sensitive detection of shrimp viruses. *Journal of virological methods*, 168(1-2), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.05.010>
227. Muddu, R., Hassan, Y. A., & Ugaz, V. M. (2011). Rapid PCR thermocycling using microscale thermal convection. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (49), 2366. <https://doi.org/10.3791/2366>
228. Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
229. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
230. Mustafa, M. I., & Makhawi, A. M. (2020). SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases. *Journal of clinical microbiology*, JCM.00745-20. Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20>
231. Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Metsky, H. C., Durbin, A. F., Kellner, M. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Parham, L. A., Garcia, K. F., Barnes, K. G., Chak, B., Mondini, A., Nogueira, M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Yozwiak, N. L., MacInnis, B. L., Sabeti, P. C. (2018). Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 444–448. <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
232. Nakauchi, M., Takashita, E., Fujisaki, S., Shirakura, M., Ogawa, R., Morita, H., Miura, H., Saito, S., Watanabe, S., Odagiri, T., & Kageyama, T. (2020). Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza and other respiratory viruses*, 14(4), 436–443. <https://doi.org/10.1111/irv.12728>
233. Nanfack, A. J., Agyingi, L., Noubiap, J. J., Ngai, J. N., Colizzi, V., & Nyambi, P. N. (2015). Use of amplification refractory mutation system PCR assay as a simple and effective tool to detect HIV-1 drug resistance mutations. *Journal of clinical microbiology*, 53(5), 1662–1671. <https://doi.org/10.1128/JCM.00114-15>
234. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
235. Newman, S. M., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M., & Harris, E. H. (1990). Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, 126(4), 875–888. <https://doi.org/10.1093/genetics/126.4.875>
236. Ngom, B., Guo, Y., Wang, X., & Bi, D. (2010). Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(3), 1113–1135. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3661-4>
237. Nielsen, K., Yu, W. L., Kelly, L., Williams, J., Dajer, A., Gutierrez, E., Ramirez Cruz, G., Renteria, T., Bermudez, R., & Algire, J. (2009). Validation and field assessment of a rapid lateral flow assay for detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, 30(3), 313–321. <https://doi.org/10.1080/15321810903084749>
238. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

239. O'Farrell B. (2008). Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. *Lateral Flow Immunoassay*, 1–33. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3_1
240. O'Farrell B. (2009) Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. In: Wong R., Tse H. (eds) *Lateral Flow Immunoassay*. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3_1
241. Ocenar, J., Arizala, D., Boluk, G., Dhakal, U., Gunarathne, S., Paudel, S., Dobhal, S., & Arif, M. (2019). Development of a robust, field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific detection of potato pathogen *Dickeya dianthicola* targeting a unique genomic region. *PloS one*, 14(6), e0218868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218868>
242. Oteiza, J. M., Ares, G., Sant'Ana, A. S., Soto, S., & Giannuzzi, L. (2011). Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: results of a 14-year survey. *International journal of food microbiology*, 151(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.004>
243. Pacifici, R., Farré, M., Pichini, S., Ortuño, J., Roset, P. N., Zuccaro, P., Segura, J., & de la Torre, R. (2001). Sweat testing of MDMA with the Drugwipe analytical device: a controlled study with two volunteers. *Journal of analytical toxicology*, 25(2), 144–146. <https://doi.org/10.1093/jat/25.2.144>
244. Padhi, S. K., Tolo, I., McEachran, M., Primus, A., Mor, S. K., & Phelps, N. (2019). Koi herpesvirus and carp oedema virus: Infections and coinfections during mortality events of wild common carp in the United States. *Journal of fish diseases*, 42(11), 1609–1621. <https://doi.org/10.1111/jfd.13082>
245. Palka-Santini, M., Cleven, B. E., Eichinger, L., Krönke, M., & Krut, O. (2009). Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC microbiology*, 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-1>
246. Paradh, A. D., Hill, A. E., & Mitchell, W. J. (2014). Detection of beer spoilage bacteria *Pectinatus* and *Megasphaera* with acridinium ester labelled DNA probes using a hybridisation protection assay. *Journal of microbiological methods*, 96, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.014>
247. Park, H. K., Yoon, J. W., Shin, J. W., Kim, J. Y., & Kim, W. (2010). *rpoA* is a useful gene for identification and classification of *Streptococcus pneumoniae* from the closely related viridans group streptococci. *FEMS microbiology letters*, 305(1), 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01913.x>
248. Paul, D., Naik, P. & Roy, S. (2020). Developing a Point-of-Care Molecular Test to Detect SARS-CoV-2. *Trans Indian Natl. Acad. Eng.* 5, 229–232. <https://doi.org/10.1007/s41403-020-00127-5>
249. Pecchia, S., & Da Lio, D. (2018). Development of a rapid PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay (PCR-NALFIA) based on rDNA IGS sequence analysis for the detection of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Journal of microbiological methods*, 151, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.010>
250. Peng, H., Long, H., Huang, W., Liu, J., Cui, J., Kong, L., Hu, X., Gu, J., & Peng, D. (2017). Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific reports*, 7, 44853. <https://doi.org/10.1038/srep44853>
251. Peplies, J., Glöckner, F. O., & Amann, R. (2003). Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1397–1407. <https://doi.org/10.1128/aem.69.3.1397-1407.2003>
252. Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y., Kotler, M. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 2003;55: 5–12.
253. Petakov, M. S., Damjanović, S. S., Nikolić-Durović, M. M., Dragojlović, Z. L., Obradović, S., Gligorović, M. S., Simić, M. Z., & Popović, V. P. (1998). Pituitary adenomas secreting large amounts of prolactin may give false low values in immunoradiometric assays. The hook effect. *Journal of endocrinological investigation*, 21(3), 184–188. <https://doi.org/10.1007/BF03347299>
254. Pettipher, G. L., Osmundson, M. E., & Murphy, J. M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in applied microbiology*, 24(3), 185–189. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00373.x>
255. 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>
256. Pöhlmann, C., Dieser, I., & Sprinzl, M. (2014). A lateral flow assay for identification of *Escherichia coli* by ribosomal RNA hybridisation. *The Analyst*, 139(5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1039/c3an02059b>

257. Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(2), 569–582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>
258. Powledge T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in physiology education*, 28(1-4), 44–50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>
259. Prado, D., Szczerepa, M., Capeloto, O. A., Astrath, N., Santos, N., Previdelli, I., Nakamura, C. V., Mikcha, J., & Abreu Filho, B. A. (2019). Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. *International journal of food microbiology*, 305, 108238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238>
260. Prescott, M. A., Reed, A. N., Jin, L., & Pastey, M. K. (2016). Rapid Detection of Cyprinid Herpesvirus 3 in Latently Infected Koi by Recombinase Polymerase Amplification. *Journal of aquatic animal health*, 28(3), 173–180. <https://doi.org/10.1080/08997659.2016.1185048>
261. Qian, J., Boswell, S. A., Chidley, C., Lu, Z. X., Pettit, M. E., Gaudio, B. L., Fajnzylber, J. M., Ingram, R. T., Ward, R. H., Li, J. Z., & Springer, M. (2020). An enhanced isothermal amplification assay for viral detection. *Nature communications*, 11(1), 5920. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19258-y>
262. Qiu, X., Shu, J.I., Baysal, O. et al. Real-time capillary convective PCR based on horizontal thermal convection. *Microfluid Nanofluid* 23, 39 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10404-019-2207-0>
263. Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J., & Morata, P. (2008). Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 15(2), 293–296. <https://doi.org/10.1128/CVI.00270-07>
264. Rajendran, V. K., Bakthavathsalam, P., Bergquist, P. L., & Sunna, A. (2019). A portable nucleic acid detection system using natural convection combined with a smartphone. *Biosensors & bioelectronics*, 134, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.050>
265. Rani, A., Ravindran, V. B., Surapaneni, A., Shahsavari, E., Haleyr, N., Mantri, N., & Ball, A. S. (2021). Evaluation and comparison of recombinase polymerase amplification coupled with lateral-flow bioassay for *Escherichia coli* O157:H7 detection using diiferent genes. *Scientific reports*, 11(1), 1881. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81312-6>
266. Ranjbar, R., & Afshar, D. (2015). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Yersinia enterocolitica* via targeting a conserved locus. *Iranian journal of microbiology*, 7(4), 185–190.
267. Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RM, Behnke CA, Kirk P, Hokanson CA, Crea R, Mendez M, Mayfield SP. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J*. 2010 Aug;8(6):719-33. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x. Epub 2010 Mar 7. PMID: 20230484; PMCID: PMC2918638
268. Ridker [1], P. M., Glynn, R. J., Miletich, J. P., Goldhaber, S. Z., Stampfer, M. J., & Hennekens, C. H. (1997). Age-specific incidence rates of venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden mutation. *Annals of internal medicine*, 126(7), 528–531. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-126-7-199704010-00005>
269. Ridker [2], P. M., Miletich, J. P., Hennekens, C. H., & Buring, J. E. (1997). Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA*, 277(16), 1305–1307.
270. Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Lindpaintner, K., Stampfer, M. J., Eisenberg, P. R., & Miletich, J. P. (1995). Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *The New England journal of medicine*, 332(14), 912–917. <https://doi.org/10.1056/NEJM199504063321403>
271. Roche, P., Najih, M., Lee, S. S., Beitel, L. K., Carnevale, M. L., Paliouras, M., Kirk, A. G., & Trifiro, M. A. (2017). Real time plasmonic qPCR: how fast is ultra-fast? 30 cycles in 54 seconds. *The Analyst*, 142(10), 1746–1755. <https://doi.org/10.1039/c7an00304h>
272. Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., Beltran, G., Torija, M. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2021). *Pectinatus* spp. - Unpleasant and recurrent brewing spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 336, 108900. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108900>
273. Rohrman, B. A., & Richards-Kortum, R. R. (2012). A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab on a chip*, 12(17), 3082–3088. <https://doi.org/10.1039/c2lc40423k>
274. Rosendaal, F. R., Koster, T., Vandenbroucke, J. P., & Reitsma, P. H. (1995). High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*, 85(6), 1504–1508.

275. Roskos, K., Hickerson, A. I., Lu, H. W., Ferguson, T. M., Shinde, D. N., Klaue, Y., & Niemz, A. (2013). Simple system for isothermal DNA amplification coupled to lateral flow detection. *PloS one*, 8(7), e69355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069355>
276. Ross, G., Filippini, D., Nielen, M., & Salentijn, G. I. (2020). Unraveling the Hook Effect: A Comprehensive Study of High Antigen Concentration Effects in Sandwich Lateral Flow Immunoassays. *Analytical chemistry*, 10.1021/acs.analchem.0c03740. Advance online publication. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03740>
277. Roth, J. M., de Bes, L., Sawa, P., Omweri, G., Osoti, V., Oberheilmann, B., Schallig, H., & Mens, P. F. (2018). Plasmodium Detection and Differentiation by Direct-on-Blood PCR Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay: Development, Validation, and Evaluation. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 20(1), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.09.004>
278. Ruppert, C., Phogat, N., Laufer, S., Kohl, M., & Deigner, H. P. (2019). A smartphone readout system for gold nanoparticle-based lateral flow assays: application to monitoring of digoxigenin. *Mikrochimica acta*, 186(2), 119. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3195-6>
279. Russel, J., Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Shah, S. A., & Sørensen, S. J. (2020). CRISPRCasTyper: Automated Identification, Annotation, and Classification of CRISPR-Cas Loci. *The CRISPR journal*, 3(6), 462–469. <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0059>
280. Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324(6093), 163–166. <https://doi.org/10.1038/324163a0>
281. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
282. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
283. Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International journal of food microbiology*, 89(2-3), 105–124. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00153-3)
284. Sakhabutdinova, A. R., Chemeris, A. V., & Garafutdinov, R. R. (2020). Enhancement of PCR efficiency using mono- and disaccharides. *Analytical biochemistry*, 606, 113858. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113858>
285. Sanchez, J. A., Pierce, K. E., Rice, J. E., & Wangh, L. J. (2004). Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 1933–1938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305476101>
286. Scaife, M. A., Nguyen, G., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K. E., & Smith, A. G. (2015). Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 82(3), 532–546. <https://doi.org/10.1111/tpj.12781>
287. Schneiderbanger, J., Jacob, F., & Hutzler, M. (2019). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* isolated from beer. *Journal of applied microbiology*, 126(4), 1187–1198. <https://doi.org/10.1111/jam.14202>
288. Schneiderbanger, J., Grammer, M., Jacob, F., and Hutzler, M. (2018) Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *J. Inst. Brew.*, 124: 173– 181. doi: 10.1002/jib.486.
289. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
290. Schramm, E. C., Staten, N. R., Zhang, Z., Bruce, S. S., Kellner, C., Atkinson, J. P., Kyttaris, V. C., Tsokos, G. C., Petri, M., Sander Connolly, E., & Olson, P. K. (2015). A quantitative lateral flow assay to detect complement activation in blood. *Analytical biochemistry*, 477, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.01.024>
291. Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., & Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food microbiology*, 46, 553–563. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>
292. Scobie, G. A., Ho, S. T., Dolan, G., & Kalsheker, N. A. (1996). Development of a rapid DNA screening procedure for the Factor V Leiden mutation. *Clinical molecular pathology*, 49(6), M361–M363. <https://doi.org/10.1136/mp.49.6.m361>

293. Serebrennikova, K. V., Samsonova, J. V., & Osipov, A. P. (2019). A semi-quantitative rapid multi-range gradient lateral flow immunoassay for procalcitonin. *Mikrochimica acta*, 186(7), 423. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3550-2>
294. Shapiro, S., & Wilk, M. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611. doi:10.2307/2333709
295. Shayanfar, S., Harzman, C. & Pillai, S.D. Fruit juice and puree characteristics influence enrichment requirements for real-time PCR detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* . *FoodContamination* 2, 2 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40550-015-0008-0>
296. Shen, H., Wen, J., Liao, X., Lin, Q., Zhang, J., Chen, K., Wang, S., & Zhang, J. (2020). A Sensitive, Highly Specific Novel Isothermal Amplification Method Based on Single-Nucleotide Polymorphism for the Rapid Detection of *Salmonella Pullorum*. *Frontiers in microbiology*, 11, 560791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560791>
297. Shibata, T., Cunningham, R. P., DasGupta, C., & Radding, C. M. (1979). Homologous pairing in genetic recombination: complexes of recA protein and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5100–5104. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5100>
298. Shimada A. (1996) PCR-Based Site-Directed Mutagenesis. In: Trower M.K. (eds) *In Vitro Mutagenesis Protocols. Methods In Molecular Medicine™*, vol 57. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-332-5:157>
299. Shukla, S., Leem, H., Lee, J. S., & Kim, M. (2014). Immunochromatographic strip assay for the rapid and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* in artificially contaminated tomato samples. *Canadian journal of microbiology*, 60(6), 399–406. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0223>
300. Shyu, R. H., Shyu, H. F., Liu, H. W., & Tang, S. S. (2002). Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 40(3), 255–258. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00193-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00193-3)
301. Siegmund, B., & Pöllinger-Zierler, B. (2006). Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(16), 5984–5989. <https://doi.org/10.1021/jf060602n>
302. Simpson, W. J., & Smith, A. R. (1992). Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *The Journal of applied bacteriology*, 72(4), 327–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01843.x>
303. Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., & Witthuhn, R. C. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation--a review. *Food microbiology*, 28(3), 331–349. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.008>
304. Soliman, H., & El-Matbouli, M. (2018). Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid herpes virus-3 in koi and common carp. *Journal of fish diseases*, 41(5), 761–772. <https://doi.org/10.1111/jfd.12774>
305. Sourri, P., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., & Nychas, G. E. (2019). A single enzyme PCR-RFLP assay targeting V1-V3 region of 16S rRNA gene for direct identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from other *Alicyclobacillus* species. *Journal of applied genetics*, 60(2), 225–229. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00498-8>
306. Ståhlberg, A., Krzyzanowski, P. M., Egyud, M., Filges, S., Stein, L., & Godfrey, T. E. (2017). Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nature protocols*, 12(4), 664–682. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.006>
307. Stone, G. G., Oberst, R. D., Hays, M. P., McVey, S., & Chengappa, M. M. (1994). Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of clinical microbiology*, 32(7), 1742–1749. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.7.1742-1749.1994>
308. Student. (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, 6(1), 1-25. doi:10.2307/2331554
309. Sueoka N. (1960). MITOTIC REPLICATION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN CHLAMYDOMONAS REINHARDI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(1), 83–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.1.83>
310. Sun, J., Wang, Y., Lv, A., Xian, J. A., Wang, Q., Zhang, S., Guo, Y., & Xing, K. (2019). Histochemical distribution of four types of enzymes and mucous cells in the intestine of koi carp (*Cyprinus carpio* var. koi). *Fish physiology and biochemistry*, 45(4), 1367–1376. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00673-y>
311. Sun, Y., Chen, J., Li, J., Xu, Y., Jin, H., Xu, N., Yin, R., & Hu, G. (2017). Novel approach based on one-tube nested PCR and a lateral flow strip for highly sensitive diagnosis of tuberculous meningitis. *PloS one*, 12(10), e0186985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186985>
312. Surzycki S. (2000) PCR Analysis. In: *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56968-5_16

313. Tanner, N. A., & Evans, T. C., Jr (2014). Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Current protocols in molecular biology*, 105, . <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
314. Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C., Jr (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
315. Taranova, N.A., Byzova, N.A., Zaiko, V.V. et al. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse. *Microchim Acta* 180, 1165–1172 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1043-2>
316. Templeton N. S. (1992). The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology*, part B, 1(1), 58–72. <https://doi.org/10.1097/00019606-199203000-00008>
317. Terns, M. P., & Terns, R. M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.005>
318. Tian, L., Sato, T., Niwa, K., Kawase, M., Tanner, A. C., & Takahashi, N. (2014). Rapid and sensitive PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of the oral microbiota. *BioMed research international*, 2014, 180323. <https://doi.org/10.1155/2014/180323>
319. Toffan, A., Marsella, A., Abbadi, M., Abass, S., Al-Adhadh, B., Wood, G., & Stone, D. M. (2020). First detection of koi herpesvirus and carp oedema virus in Iraq associated with a mass mortality in common carp (*Cyprinus carpio*). *Transboundary and emerging diseases*, 67(2), 523–528. <https://doi.org/10.1111/tbed.13428>
320. Toubanaki, D. K., Margaroni, M., Prapas, A., & Karagouni, E. (2020). Development of a Nanoparticle-based Lateral Flow Strip Biosensor for Visual Detection of Whole Nervous Necrosis Virus Particles. *Scientific reports*, 10(1), 6529. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63553-z>
321. Turvey, M. E., Weiland, F., Keller, E. J., and Hoffmann, P. (2017) The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. *J. Inst. Brew.*, 123: 373– 387. doi: 10.1002/jib.428.
322. Uchino F, Doi S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural and Biological Chemistry* 1967; 31: 817-22.
323. Urusov, A. E., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2019). Towards Lateral Flow Quantitative Assays: Detection Approaches. *Biosensors*, 9(3), 89. <https://doi.org/10.3390/bios9030089>
324. Van Cott, E. M., Khor, B., & Zehnder, J. L. (2016). Factor V Leiden. *American journal of hematology*, 91(1), 46–49. <https://doi.org/10.1002/ajh.24222>
325. van Dam, G. J., de Dood, C. J., Lewis, M., Deelder, A. M., van Lieshout, L., Tanke, H. J., van Rooyen, L. H., & Corstjens, P. L. (2013). A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen. *Experimental parasitology*, 135(2), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.017>
326. Vincent, M., Xu, Y., & Kong, H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO reports*, 5(8), 795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>
327. Vingataramin, L., & Frost, E. H. (2015). A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *BioTechniques*, 58(3), 120–125. <https://doi.org/10.2144/000114263>
328. Vriesekoop, F., Krah, M., Hucker, B. and Menz, G. (2012), 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.*, 118: 335-345. <https://doi.org/10.1002/jib.49>
329. Wahba, L., Amon, J. D., Koshland, D., & Vuica-Ross, M. (2011). RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability. *Molecular cell*, 44(6), 978–988. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.017>
330. Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Malinowski, D. P. (1992). Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic acids research*, 20(7), 1691–1696. <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1691>
331. Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Shank, D. D. (1992). Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 392–396. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.392>

332. Walls, I., & Chuyate, R. (2000). Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International*, 83(5), 1115–1120.
333. Walster, C.I. Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, fish *Veterinary Journal*. 1999;3: 54–58.
334. Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Stone, D. M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A. J., & Hedrick, R. P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *The Journal of general virology*, 86(Pt 6), 1659–1667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80982-0>
335. Wan, M., Rosenberg, J. N., Faruq, J., Betenbaugh, M. J., & Xia, J. (2011). An improved colony PCR procedure for genetic screening of *Chlorella* and related microalgae. *Biotechnology letters*, 33(8), 1615–1619. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0596-6>
336. Wang, H., Jiang, J., Mostert, B., Sieuwerts, A., Martens, J. W., Sleijfer, S., Foekens, J. A., & Wang, Y. (2013). Allele-specific, non-extendable primer blocker PCR (AS-NEPB-PCR) for DNA mutation detection in cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 15(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.08.007>
337. Wang, L., Zhao, P., Si, X., Li, J., Dai, X., Zhang, K., Gao, S., & Dong, J. (2020). Rapid and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* With an Isothermal Amplification and Lateral Flow Strip Combined Method That Eliminates False-Positive Signals From Primer-Dimers. *Frontiers in microbiology*, 10, 2959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02959>
338. Wang, X., Ji, P., Fan, H., Dang, L., Wan, W., Liu, S., Li, Y., Yu, W., Li, X., Ma, X., Ma, X., Zhao, Q., Huang, X., & Liao, M. (2020). CRISPR-Cas12a technology combined with immunochromatographic strips for portable detection of African swine fever virus. *Communications biology*, 3(1), 62. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0796-5>
339. Wang, X., Shang, X., & Huang, X. (2020). Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR-Cas-based detection methods. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1682–1691. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1793689>
340. Wang, Y., Li, H., Wang, Y., Zhang, L., Xu, J., & Ye, C. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification Label-Based Gold Nanoparticles Lateral Flow Biosensor for Detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 8, 192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00192>
341. Wang, Y., Li, H., Wang, Y., Zhang, L., Xu, J., & Ye, C. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification Label-Based Gold Nanoparticles Lateral Flow Biosensor for Detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 8, 192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00192>
342. Wang, Y., Sun, L., Li, J. Q., Wang, Z. M., Jiao, W. W., Xiao, J., Shen, C., Xu, F., Qi, H., Wang, Y. H., Guo, Y. J., & Shen, A. D. (2019). Label-Free Cross-Priming Amplification Coupled With Endonuclease Restriction and Nanoparticles-Based Biosensor for Simultaneous Detection of Nucleic Acids and Prevention of Carryover Contamination. *Frontiers in chemistry*, 7, 322. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00322>
343. Wang, Y., Wang, Y., Li, D., Xu, J., & Ye, C. (2018). Detection of nucleic acids and elimination of carryover contamination by using loop-mediated isothermal amplification and antarctic thermal sensitive uracil-DNA-glycosylase in a lateral flow biosensor: application to the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Mikrochimica acta*, 185(4), 212. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2723-8>
344. Wang, Y., Wang, Y., Ma, A. J., Li, D. X., Luo, L. J., Liu, D. X., Jin, D., Liu, K., & Ye, C. Y. (2015). Rapid and Sensitive Isothermal Detection of Nucleic-acid Sequence by Multiple Cross Displacement Amplification. *Scientific reports*, 5, 11902. <https://doi.org/10.1038/srep11902>
345. Wang, Y., Wang, Y., Wang, H., Xu, J., & Ye, C. (2018). A label-free technique for accurate detection of nucleic acid-based self-avoiding molecular recognition systems supplemented multiple cross-displacement amplification and nanoparticles based biosensor. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(8), 1671–1684. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1389748>
346. Wang, Y., Yan, W., Fu, S., Hu, S., Wang, Y., Xu, J., & Ye, C. (2018). Multiple Cross Displacement Amplification Coupled With Nanoparticles-Based Lateral Flow Biosensor for Detection of *Staphylococcus aureus* and Identification of Methicillin-Resistant *S. aureus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00907>
347. Wang, Z., Cai, R., Yuan, Y., Niu, C., Hu, Z., & Yue, T. (2014). An immunomagnetic separation-real-time PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit products. *International journal of food microbiology*, 175, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.015>
348. Way, K., Haenen, O., Stone, D., Adamek, M., Bergmann, S. M., Bigarré, L., Diserens, N., El-Matbouli, M., Gjessing, M. C., Jung-Schroers, V., Leguay, E., Matras, M., Olesen, N. J., Panzarin, V., Piačková, V., Toffan, A., Vendramin, N.,

- Vesel, T., & Waltzek, T. (2017). Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Diseases of aquatic organisms*, 126(2), 155–166. <https://doi.org/10.3354/dao03164>
349. Weber, D. G., Sahm, K., Polen, T., Wendisch, V. F., & Antranikian, G. (2008). Oligonucleotide microarrays for the detection and identification of viable beer spoilage bacteria. *Journal of applied microbiology*, 105(4), 951–962. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03799.x>
 350. Wei, S., Sun, Y., Xi, G., Zhang, H., Xiao, M., & Yin, R. (2018). Development of a single-tube nested PCR-lateral flow biosensor assay for rapid and accurate detection of *Alternaria panax* Whetz. *PloS one*, 13(11), e0206462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206462>
 351. Wen, T., Huang, C., Shi, F. J., Zeng, X. Y., Lu, T., Ding, S. N., & Jiao, Y. J. (2020). Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. *The Analyst*, 145(15), 5345–5352. <https://doi.org/10.1039/d0an00629g>
 352. Wharam, S. D., Marsh, P., Lloyd, J. S., Ray, T. D., Mock, G. A., Assenberg, R., McPhee, J. E., Brown, P., Weston, A., & Cardy, D. L. (2001). Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal nucleic acid amplification assay based on the formation of a three-way junction structure. *Nucleic acids research*, 29(11), E54–e54. <https://doi.org/10.1093/nar/29.11.e54>
 353. Wheeler, E. K., Hara, C. A., Frank, J., Deotte, J., Hall, S. B., Benett, W., Spadaccini, C., & Beer, N. R. (2011). Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification. *The Analyst*, 136(18), 3707–3712. <https://doi.org/10.1039/c1an15365j>
 354. Winder, A. D., Mora, A. S., Berry, E., & Lurain, J. R. (2017). The "hook effect" causing a negative pregnancy test in a patient with an advanced molar pregnancy. *Gynecologic oncology reports*, 21, 34–36. <https://doi.org/10.1016/j.gore.2017.06.008>
 355. Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Jr, Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 42(2), 263–269. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-263>
 356. Witthuhn, R. C., van der Merwe, E., Venter, P., & Cameron, M. (2012). Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International journal of food microbiology*, 157(1), 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.022>
 357. Woodman M. E. (2008). Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). *Current protocols in microbiology*, Appendix 3, . <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ds9>
 358. Wu H, Zhao P, Yang X, Li J, Zhang J, Zhang X, Zeng Z, Dong J, Gao S and Lu C (2020) A Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Strip Combined Method That Detects *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium With No Worry of Primer-Dependent Artifacts. *Front. Microbiol.* 11:1015. doi: 10.3389/fmicb.2020.01015
 359. Wu, Y. D., Zhou, D. H., Zhang, L. X., Zheng, W. B., Ma, J. G., Wang, M., Zhu, X. Q., & Xu, M. J. (2016). Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for equipment-free detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy cattle feces. *Parasitology research*, 115(9), 3551–3555. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5120-4>
 360. Xiao, Z., Lie, P., Fang, Z., Yu, L., Chen, J., Liu, J., Ge, C., Zhou, X., & Zeng, L. (2012). A lateral flow biosensor for detection of single nucleotide polymorphism by circular strand displacement reaction. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(68), 8547–8549. <https://doi.org/10.1039/c2cc33931e>
 361. Xu, G., Hu, L., Zhong, H., Wang, H., Yusa, S., Weiss, T. C., Romaniuk, P. J., Pickerill, S., & You, Q. (2012). Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Scientific reports*, 2, 246. <https://doi.org/10.1038/srep00246>
 362. Xu, Y., Liu, Y., Wu, Y., Xia, X., Liao, Y., & Li, Q. (2014). Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection. *Analytical chemistry*, 86(12), 5611–5614. <https://doi.org/10.1021/ac5010458>
 363. Xuhong, Y., Sinong, Z., Jianping, L., Yu, C., Juanli, Z., Chao, Z., Desheng, L., Kai, H., Yali, C., & Wenli, H. (2019). A PCR-lateral flow assay system based on gold magnetic nanoparticles for CYP2C19 genotyping and its clinical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 636–643. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1575841>
 364. Yamazaki, K., Teduka, H., & Shinano, H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(3), 543–545. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.543>

365. Yan, G., Jun, L., Kangchen, Z., Yiyue, G., Yang, Y., Xiaoyu, Z., Zhiyang, S., & Lunbiao, C. (2015). Rapid and visual detection of human enterovirus coxsackievirus A16 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow device. *Letters in applied microbiology*, 61(6), 531–537. <https://doi.org/10.1111/lam.12499>
366. Yang, L. Z., Wang, Y., Li, S. Q., Yao, R. W., Luan, P. F., Wu, H., Carmichael, G. G., & Chen, L. L. (2019). Dynamic Imaging of RNA in Living Cells by CRISPR-Cas13 Systems. *Molecular cell*, 76(6), 981–997.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.024>
367. Yao, J., Zong, X., Cui, C., Mu, L. and Zhao, H. (2018), Metabonomics analysis of nonvolatile small molecules of beers during forced ageing. *Int J Food Sci Technol*, 53: 1698–1704. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13754>
368. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., & Day, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research*, 29(17), E88–e88. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>
369. Yonesaki, T., & Minagawa, T. (1989). Synergistic action of three recombination gene products of bacteriophage T4, uvsX, uvsY, and gene 32 proteins. *The Journal of biological chemistry*, 264(14), 7814–7820.
370. Yonesaki, T., Ryo, Y., Minagawa, T., & Takahashi, H. (1985). Purification and some of the functions of the products of bacteriophage T4 recombination genes, uvsX and uvsY. *European journal of biochemistry*, 148(1), 127–134. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08816.x>
371. Yongkiettrakul, S., Jaroenram, W., Arunrut, N., Chareanchim, W., Pannengpetch, S., Suebsing, R., Kiatpathomchai, W., Pornthanakasem, W., Yuthavong, Y., & Kongkasuriyachai, D. (2014). Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitology international*, 63(6), 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.06.004>
372. Yongkiettrakul, S., Kampeera, J., Chareanchim, W., Rattanajak, R., Pornthanakasem, W., Kiatpathomchai, W., & Kongkasuriyachai, D. (2017). Simple detection of single nucleotide polymorphism in *Plasmodium falciparum* by SNP-LAMP assay combined with lateral flow dipstick. *Parasitology international*, 66(1), 964–971. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.024>
373. Yongkiettrakul, S., Kolić, F. R., Kongkasuriyachai, D., Sattabongkot, J., Nguitragool, W., Nawattanapaibool, N., Suansomjit, C., Warit, S., Kangwanransan, N., & Buates, S. (2020). Validation of PfSNP-LAMP-Lateral Flow Dipstick for Detection of Single Nucleotide Polymorphism Associated with Pyrimethamine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(11), 948. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10110948>
374. Yrad, F. M., Castañares, J. M., & Alocilja, E. C. (2019). Visual Detection of Dengue-1 RNA Using Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 9(3), 74. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9030074>
375. Yu, P., Dai, Y., Dong, J., Zhang, L., Ping, Y., Wang, X., Wang, D., & Tao, Z. (2020). ARMS TaqMan real-time PCR for genotyping factor V Leiden mutation in Han Chinese. *Electrophoresis*, 41(23), 2015–2020. <https://doi.org/10.1002/elps.202000193>
376. Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosensors & bioelectronics*, 172, 112752. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>
377. Zarghampoor, F., Behzad-Behbahani, A., Azarpira, N., Khatami, S. R., Fanian, M., Hossein Aghdaie, M., & Rafiei Dehbidi, G. (2020). A Single Tube Overlap Extension PCR Method for Splicing of Multiple DNA Fragments. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 12(1), 37–43.
378. Zasada, A. A., Zacharczuk, K., Formińska, K., Wiatrzyk, A., Ziółkowski, R., & Malinowska, E. (2018). Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. *Analytical biochemistry*, 560, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.09.008>
379. Zeng, L., & Xiao, Z. (2017). A Lateral Flow Biosensor for the Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1572, 421–430. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6911-1_27
380. Zhang, D., Huang, L., Liu, B., Ge, Q., Dong, J., & Zhao, X. (2019). Rapid and Ultrasensitive Quantification of multiplex Respiratory Tract Infection Pathogen via Lateral Flow Microarray based on SERS Nanotags. *Theranostics*, 9(17), 4849–4859. <https://doi.org/10.7150/thno.35824>
381. Zhang, J., Cao, J., Zhu, M., Xu, M., & Shi, F. (2019). Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Mycoplasma ovipneumoniae*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(2), 31. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2601-5>
382. Zhang, S., Cai, Y., Zhang, J., Liu, X., He, L., Cheng, L., Hua, K., Hui, W., Zhu, J., Wan, Y., Cui, Y. (2020). Tetra-primer ARMS-PCR combined with GoldMag lateral flow assay for genotyping: simultaneous visual detection of both alleles. *Nanoscale*, 12(18), 10098–10105. <https://doi.org/10.1039/d0nr00360c>

383. Zhang, S., Wang, J., Zhuo, Z., Su, X., Chen, M., Chen, W., Li, T., Zhang, D., Min, X., Ge, S., & Xia, N. (2019). An efficient isothermal PCR method for on-site detection of nucleic acid. *BioTechniques*, 67(2), 63–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0190>
384. Zhang, Y., & Ying, J. Y. (2015). Homogeneous Immunochemical Assay on the Lateral Flow Strip for Measurement of DNase I Activity. *Analytical chemistry*, 87(20), 10193–10198. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02658>
385. Zhang, Y., Ren, G., Buss, J., Barry, A. J., Patton, G. C., & Tanner, N. A. (2020). Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *BioTechniques*, 69(3), 178–185. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0078>
386. Zheng, C., Wang, K., Zheng, W., Cheng, Y., Li, T., Cao, B., Jin, Q., & Cui, D. (2021). Rapid developments in lateral flow immunoassay for nucleic acid detection. *The Analyst*, 10.1039/d0an02150d. Advance online publication. <https://doi.org/10.1039/d0an02150d>
387. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
388. Zhu, X., Wang, X., Han, L., Chen, T., Wang, L., Li, H., Li, S., He, L., Fu, X., Chen, S., Xing, M., Chen, H., & Wang, Y. (2020). multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosensors & bioelectronics*, 166, 112437. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112437>
389. Ziegler, I., Fagerström, A., Strålin, K., & Mölling, P. (2016). Evaluation of a Commercial multiplex PCR Assay for Detection of Pathogen DNA in Blood from Patients with Suspected Sepsis. *PloS one*, 11(12), e0167883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167883>
390. Zöller, B., & Dahlbäck, B. (1994). Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet (London, England)*, 343(8912), 1536–1538. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92940-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92940-8)
391. Zuker, M., & Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic acids research*, 9(1), 133–148. <https://doi.org/10.1093/nar/9.1.133>

8. Anhang

8.1. Zusätzliche Informationen zur Einleitung

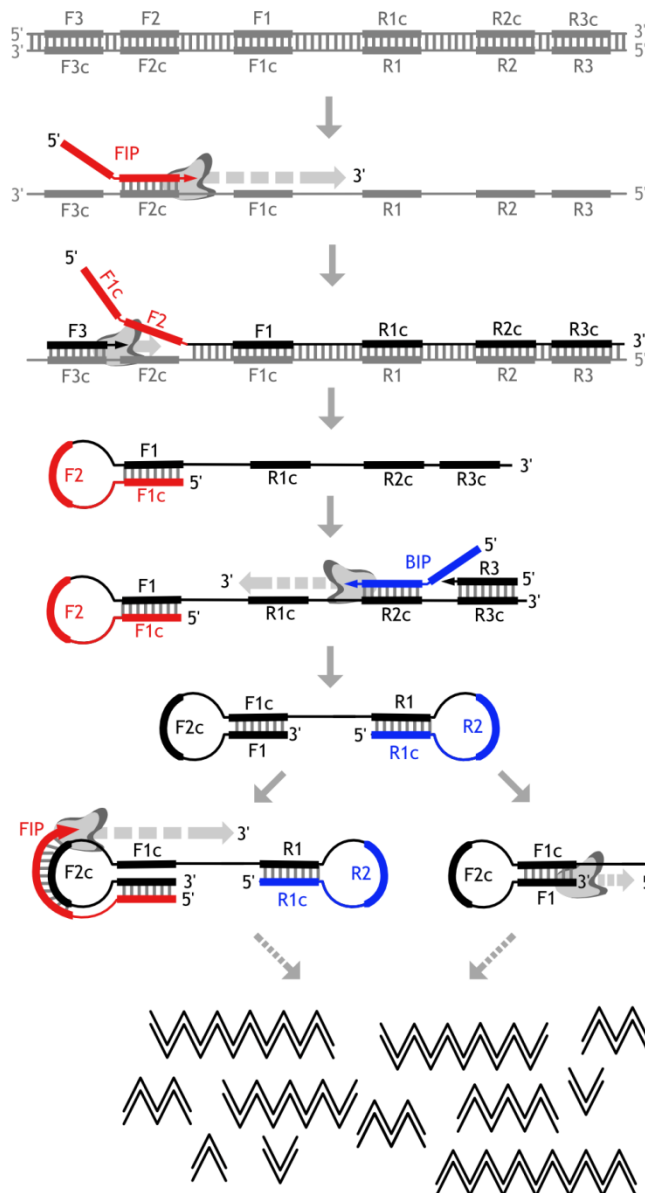
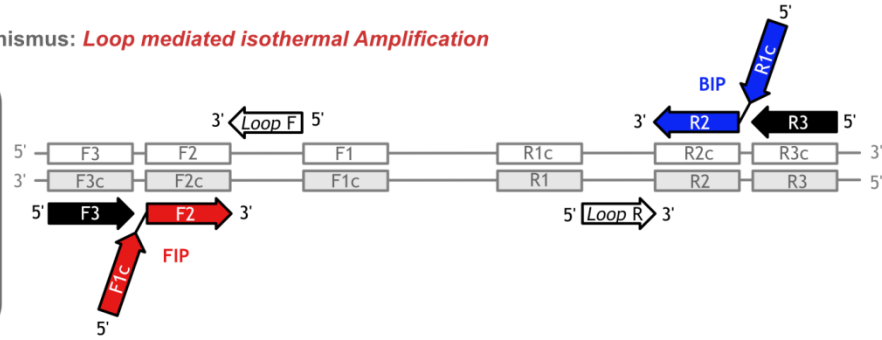
8.1.1. Amplifikationsmechanismus der LAMP

In der LAMP verwendete DNA-Polymerasen verfügen über eine starke Strangverdrängungsaktivität, was für die effiziente isothermale Amplifikation essentiell ist. Ein sehr häufig genutztes LAMP-Enzym leitet sich vom großem Fragment der DNA Polymerase I aus *Bacillus stearothermophilus* ab (Notomi *et al.*, 2000 / Tanner *et al.*, 2014). In der Abbildung 7 ist der komplexe Amplifikationsmechanismus gemäß Notomi *et al.* (2010) verbildlicht, und wird im Folgenden ergänzend beschrieben.

Bei erhöhter Temperatur und ggf. dem Zusatz des Reaktionsadditivs Betain kann ein initiales Primerannealing erfolgen (Ranjbar und Afshar, 2015). Durch Elongation der modular konzipierten inneren Primer FIP und BIP wird die Amplifikation eingeleitet. Die „Freisetzung“ dieses einzelsträngigen Produktes gelingt durch die außen liegenden Primer F3 und B3, die ihrerseits elongiert werden. Die Primer FIP und BIP verfügen über ein 5' Segment, welches komplementär zu einem Teil des FIP- bzw. BIP-vermittelten Elongationsproduktes ist. Das ermöglicht die Bildung terminaler *loops*, was der Methode seinen Namen verleiht. Durch weitere Annealing- und Elongationsschritte entsteht das LAMP-charakteristische Reaktions-Zwischenprodukt, welches aufgrund der beidseitigen terminalen *loops* eine Art Hantelform (*dumbbell structure*) aufweist (Hardinge und Murray, 2019). Diese Struktur ist Grundlage für multiples Primerannealing der Primer FIP und BIP und ggf. der zusätzlichen *loop* Primer. Darüber hinaus kann das 3' Ende der *dumbbell structure* Primer-unabhängig elongiert werden. Aufgrund dessen entstehen in den Folgeschritten immer mehr Amplifikationsprodukte, die wiederum immer mehr Primerbindestellen präsentieren, wodurch die exponentielle DNA-Vervielfältigung einsetzt. Ein weiterer wichtiger Unterschied zur PCR ist der Umstand, dass Amplifikationsprodukte verschiedenster Größen entstehen. Darüber hinaus wird bedeutend mehr Amplifikat innerhalb einer LAMP erzeugt, als es bei der PCR der Fall ist.

Amplifikationsmechanismus: **Loop mediated isothermal Amplification**

Das **LAMP-Primerdesign** ist komplexer als bei der klassischen PCR. Es werden mindestens vier Primer (innere Primer: FIP und BIP, äußere Primer: F3 & R3) benötigt. Zusätzliche Loop Primer können die Amplifikationseffizienz zusätzlich steigern.



Template DNA. Initiales Anheftung wird durch die Temperatur von etwa 60°C und ggf. durch die Nutzung einer erhöhten Betain-Konzentration ermöglicht.

Initiales Anheftung des forward inner Primers (FIP), der sich aus zwei Segmenten besteht - F1c (5' Teil) und F2 (3' Teil). Elongation FIP durch DNA-Polymerase.

Anheftung und Elongation von F3 initiiert **Strangverdrängung** des vorher synthetisierten Stranges.

Der "verdrängte" Strang bildet aufgrund des FIP-5'Teils eine **terminale Loop Struktur** aus.

Anheftung, **Elongation von BIP** (backward inner Primer), und nachfolgende **Strangverdrängung** durch Anheftung & Elongation von R3.

Das für LAMP charakteristische Zwischenprodukt samt terminaler Loops: **"dumbbell structure"** ist Grundlage für multiple Anheftung- und Elongationsvarianten.

Das hantelförmige LAMP Zwischenprodukt erlaubt erneut des Anheftung der inneren Primer (hier FIP), aber auch die **Primer-unabhängige Elongation** des 3' Endes.

Multiple Anheftung-Möglichkeiten und kontinuierliche Strangverdrängung ermöglichen eine **exponentielle Amplifikation**, sodass LAMP-Produkte in unterschiedlichen Größen entstehen. Die Anreicherung großer Mengen der Reaktionsprodukte ist charakteristisch für die LAMP.

Abbildung 66 – Loop mediated isothermal amplification – Primerübersicht und Amplifikationsmechanismus. Aufbau der Primer, sowie die Positionierung der entsprechenden Primerbindestellen ermöglichen bei etwa 60°C unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit starker Strangverdrängungsaktivität die isothermale, exponentielle Amplifikation von DNA.

8.1.2. Genereller Amplifikationsmechanismus der RPA

Die *Recombinase Polymerase Amplification* ist eine DNA-Amplifikationsmethode, bei der verschiedene DNA-interagierende Enzyme genutzt werden, damit eine exponentielle Vermehrung einer Ziel-DNA bei vergleichsweise niederen Temperaturen stattfinden kann. Dabei werden gemäß Piepenburg *et al* (2006) die Rekombinase T4 UvsX und der „Beladungsfaktor“ UvsY in Kombination mit dem Einzelstrangbindeprotein G32P genutzt. Bei T4 UvsX handelt es sich um eine Rekombinase, welche der Bakteriophage T4 entstammt und *in vivo* wichtige Funktionen im Kontext genetischer Rekombination, DNA-Reparatur und DNA-Replikation einnimmt (Yonesaki *et al.*, 1985 / Shibata *et al.*, 1979 / Formosa und Alberts, 1986). Im Jahr 1989 wurde erstmalig die synergistische Funktion der in der RPA genutzten Proteine beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass UvsY und G32P stabilisierend auf die UvsX-Bindung einzelsträngiger DNA wirkt (Yonesaki und Minagawa, 1989). Im Kontext der RPA wird in Anwesenheit von ATP die Bildung von T4 UvsX-Primer-Komplexen forciert, welche die doppelsträngige *template* DNA nach passenden Bindungsstellen „scannen“ und eine spezifische Bindungen der Primer an das *template* ermöglichen, ohne dass eine Denaturierung bei erhöhten Temperaturen notwendig ist. Die daraus resultierende Struktur wird durch das Einzelstrangbindeprotein G32P stabilisiert, sodass nach Deassemblierung des T4 UvsX-Primer-Komplexes gebundene Primer durch die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *Bacillus subtilis* an deren freien 3'OH-Ende elongiert werden können. Die Wiederholung dieses beschriebenen Prozesses führt letztlich zu einer exponentiellen Vermehrung des adressierten dsDNA-Fragmentes bei einer konstanten Temperatur (RPA-Produkt). Die Zugabe von UvsY und dem „crowding agent“ Carbowax20M ist wesentlicher Bestandteil einer effizient funktionierenden RPA.

8.1.2.1. RPA und Lateral Flow

In der Initialveröffentlichung der Gruppe um Niall Armes wurden zusätzliche Abwandlungen der RPA-Methode beschrieben, um Reaktionsprodukte auf verschiedenen Plattformen nachweisen zu können. Das umfasst sowohl die Auswertung durch *in tube* Fluoreszenz-Messung analog zu RT-PCR-Techniken, der Auftrennung der RPA-Produkte im Agarosegel und der Amplikon-Nachweis durch Nutzung eines universellen LFDs (Piepenburg *et al.*, 2006). Bei Letzterem stand die Verwendung spezieller modifizierter Sonden in Kombination mit der Endonuklease IV aus *Escherichia coli* (nfo) im Zentrum dieser methodischen Variation (Cranell *et al.*, 2014 / Escadafal *et al.*, 2014). Im Falle des Lateral Flow-basierten Nachweises wird die nfo, sowie eine speziell gestaltete Sonde in das Nachweissystem integriert. Diese Sonde trägt am 5' Ende eine für das LFD relevante Markierung (bspw. 6-FAM), einen 3' Elongationsblock (bspw. Spacer C3), sowie eine interne Modifizierung („THF“ oder „dSpacer“). Bei erfolgreicher Bindung der Sonde während der RPA an den *template* Strang, kann die nfo die interne Modifizierung „erkennen“ und an eben dieser Position einen Schnitt „setzen“, sodass der 5' Teil der Sonde nun als elongierbarer Primer vorliegt. Durch die zusätzliche 5' Biotinylierung des entgegen gerichteten Primers, kann bei erfolgreicher und effizienter Amplifikation

ein dual markiertes dsDNA-Fragment entstehen, welches aufgrund des Markierungsmusters via LFA nachweisbar wird. In der Abbildung 70 ist der Amplifikationsmechanismus der nfo-abhängigen RPA verbildlicht.

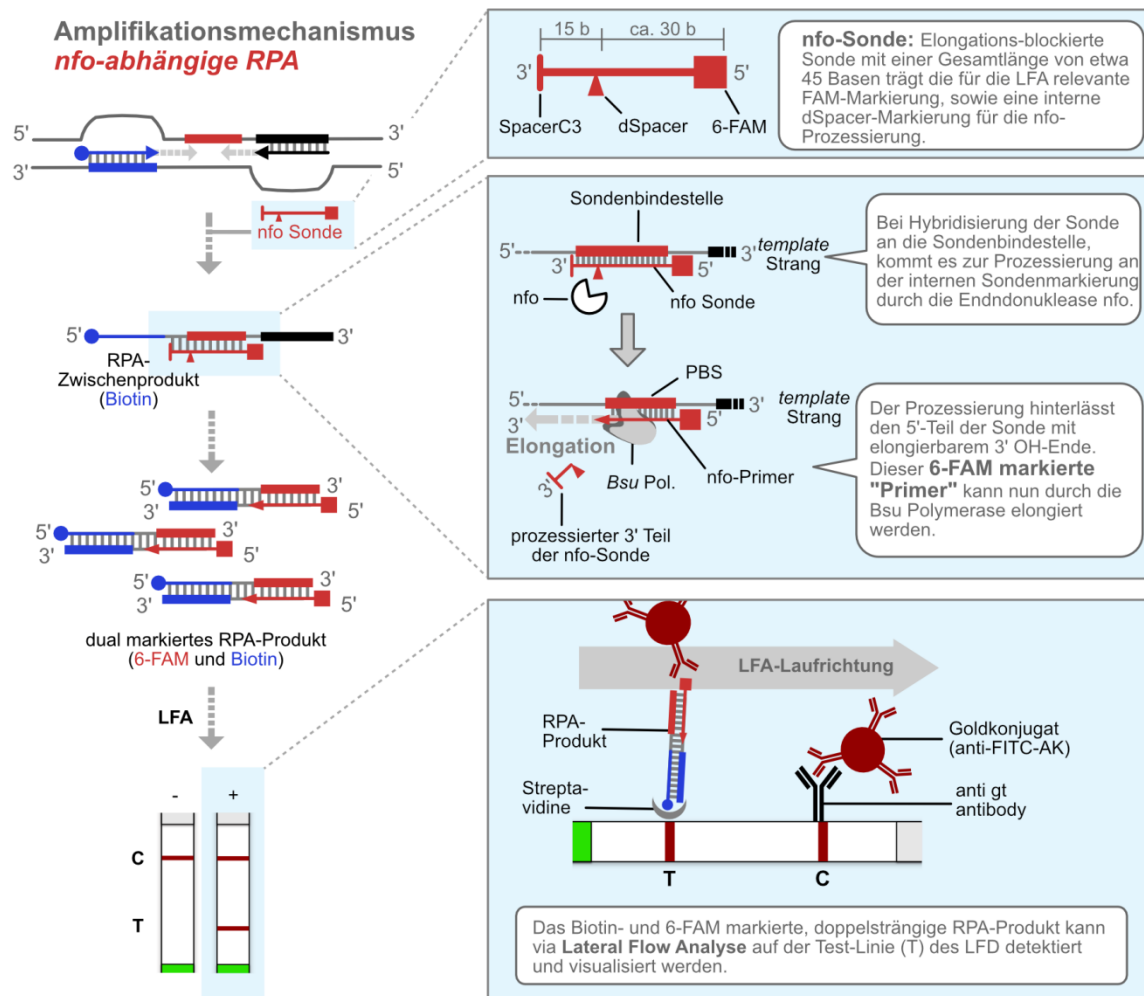


Abbildung 67 – Amplifikationsmechanismus der nfo-abhängigen RPA kombiniert mit Lateral Flow-basiertem *readout*. Analog zur vorherigen Abbildung wird das Rekombinase-abhängige Primerannealing induziert. Dabei wird ein 5'-Biotin-markierter *forward* Primer (blauer Pfeil) und ein unmarkierter *reverse* Primer (schwarzer Pfeil) für die Amplifikation genutzt. Darüber hinaus wird eine elongationsblockierte (Spacer C3) nfo-Sonde in die RPA integriert, welche bei korrektem Annealing durch die Endonuklease nfo an der internen dSpacer-Modifizierung „geschnitten“ wird. Der 6-FAM markierte 3' Teil der Sonde kann nun am freien 3' OH-Ende durch die Bsu Polymerase (*Bsu Pol.*) elongiert werden, und fungiert folglich als Primer. In Folgezyklen wiederholt sich dieser Prozess, sodass letztlich dual markiertes (Biotin, 6-FAM) RPA-Produkt exponentiell amplifiziert wird. Durch das Markierungsmuster kann dieses Amplifikat via Lateral Flow Analyse nachgewiesen werden, wobei die Anwesenheit der Test-Linie (T) mit der erfolgreichen Anreicherung des RPA-Produktes korreliert.

Im Gegensatz zur LAMP, gibt es vergleichsweise wenige methodische Modifikationen sofern RPA und Lateral Flow kombiniert werden. Der überwältigende Teil bisheriger Veröffentlichungen nutzt die „nfo-Methode“, was aber auch eine starke Indikation für die Funktionalität dieser methodischen Kombination sein kann (Lobato und O’Sullivan, 2018). Im praktischen Kontext wurde die RPA-LFA für zahlreiche *Point-of-Care* kompatible Applikationen genutzt. Drei repräsentative Anwendungen sollen die

Charakteristika dieser Amplifikationstechnik, sowie deren Potenzial in einem praktischen Kontext orientierend beleuchten (Abbildung 71).

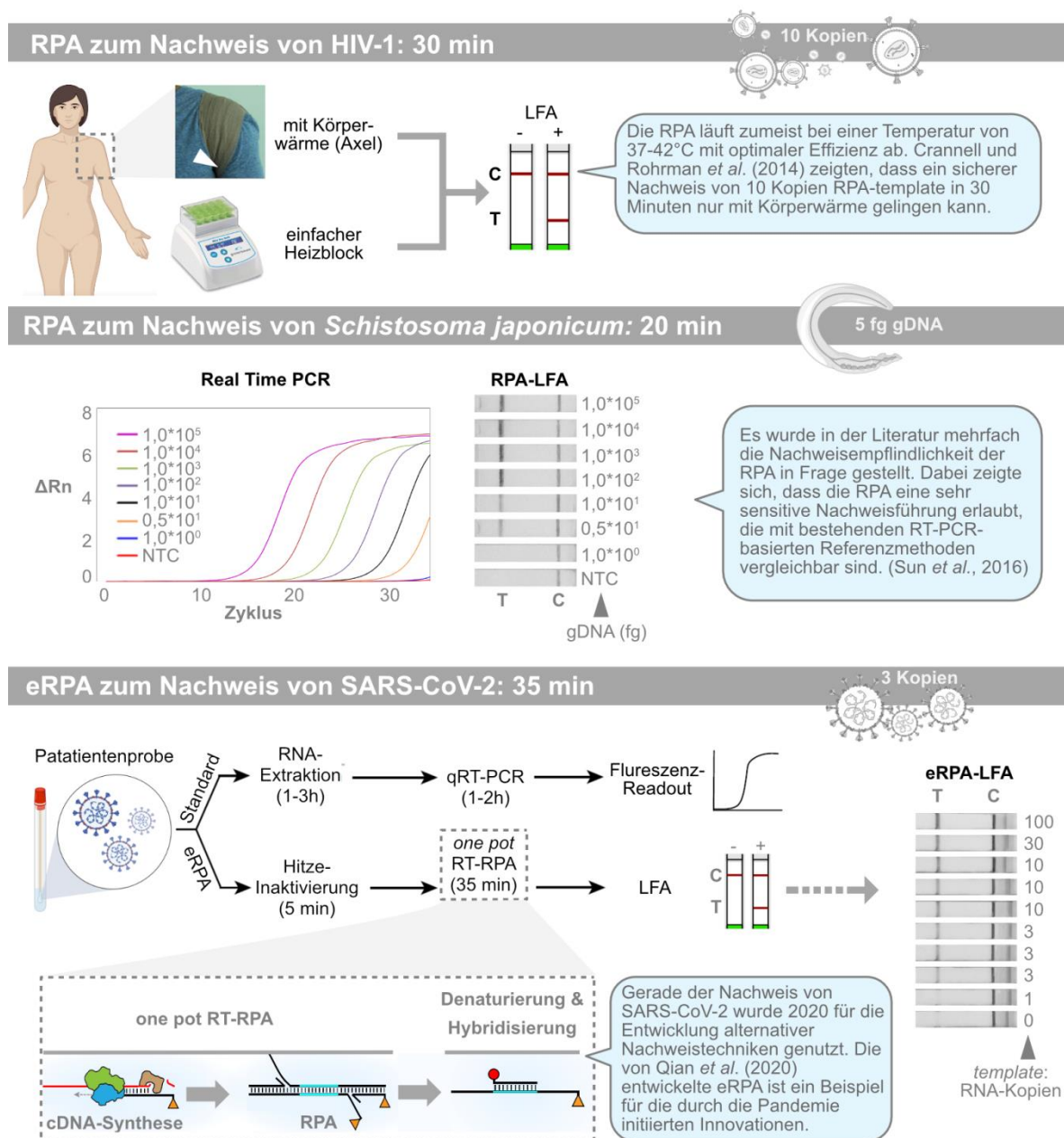


Abbildung 68 –Charakteristika und Besonderheiten der RPA-LFA. Durch Nutzung einer Bandage kann eine RPA-Reaktion in der Achsel inkubiert und anschließend via LFA ausgewertet werden. Mit dieser Technik gelang es 10 Kopien eines künstlichen Plasmids mit HIV-I spezifischer Sequenz binnen 30 Minuten via LFA nachzuweisen. Diese Ergebnisse zur Nutzung von Körperwärme für eine erfolgreiche Nachweisführung leiten sich von Crannell und Rohmann *et al.*, 2014 ab. Der Vergleich der Nachweisempfindlichkeit von RT-PCR und RPA (mittlerer Teil der Abbildung) entstammt Sun *et al.*, 2016. Hier konnte der Nachweis des Parasiten *Schistosoma japonicum* mittels RPA-LFA vergleichbar sensitiv erfolgen, wie die Referenz-RT-PCR. Im Zuge der COVID-19 Pandemie tauchten zunehmend Veröffentlichungen auf, die die 2006 etablierte RPA-LFA Nachweismethodik gemäß Piepenburg *et al.* (2006) überarbeiteten und modifizierten. Stellvertretend dafür zeigt der untere Teil der Abbildung die durch Qian *et al.* (2020) entwickelte eRPA-Methodik, die eine *one pot* RT-RPA mit einer nachgeschalteten Hybridisierungsreaktion kombiniert. Diese spezifische Nachweisteknik ermöglicht einen Lateral Flow-basierten readout mit einer Empfindlichkeit, bei der 3 RNA-Kopien für den erfolgreichen Nachweis von SARS-CoV-2 genügen.

Bereits im Jahr 2014 verwiesen Crannell und Rohrmann *et al.* auf eine wichtige Möglichkeit, die isothermale Amplifikationen bei etwa 37°C bieten. Sie untersuchten gezielt die Nutzung von Körperwärme, um eine vollends Geräte-unabhängige DNA-Amplifikation zu etablieren. Dabei erwies sich die Inkubation des Reaktionsgemisches in der Achsel unter Verwendung einer Bandage als zielführend, um eine effiziente RPA zu gewährleisten. Dabei gelang binnen 30 Minuten der sichere Nachweis von etwa 10 Kopien einer HIV-1 spezifischen DNA-Sequenz durch die „Körperwärme-RPA“ und abschließender LFA.

Die beschriebene Nachweisempfindlichkeit ist in Anbetracht des Tempos und des geringen Geräteaufwands gerade im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Techniken beeindruckend (Kim *et al.*, 2020). Mehrfach wurde die Sensitivität der RPA mit Referenz RT-PCRs verglichen. In den meisten Fällen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die RPA durchaus in der Lage sei, eine vergleichbar empfindliche Nachweisführung zu gewährleisten. So zeigten bspw. Sun *et al.* (2016), dass der RPA-LFA basierte Nachweis von 5 fg genomischer DNA des Parasiten *Schistosoma japonicum* (mit humaner DNA im Hintergrund) binnen 20 Minuten gelingen kann. Diese Empfindlichkeit bewegt sich laut Autoren im Bereich der unteren Nachweisgrenze der herangezogenen RT-PCR Methode.

Wie eingangs beschrieben, rückte die, durch das SARS-Coronavirus 2 verursachte Pandemie, die molekulare Diagnostik den Fokus der wissenschaftlichen und öffentlichen Wahrnehmung. Das spiegelt sich auch im methodischen Sektor der RPA-LFA Methode wider. So wurde die RT-RPA wesentlicher Bestandteil innovativer diagnostischer Ansätze wie SHERLOCK oder DETECTR, die eine ultrasensitive Amplikonerkennung durch verschiedene CRISPR-Cas-basierte Systeme nutzen (Abschnitt 1.3.4). Darüber hinaus erschienen im Jahr 2020 Publikationen, die von der beschriebenen und so oft bewährten nfo-Methode abwichen und somit methodische Alternativen aufzeigten (Kim *et al.*, 2020 / Qian *et al.*, 2020). Dabei nutzten Kim *et al.* (2020) die sogenannte *single strand* RT RPA, bei der nach *one pot* cDNA-Synthese und Amplifikation ein T7-Exonuklease-Verdau die schnelle Hybridisierung des ssRPA-Produktes mit markierten Sonden ermöglichte. Dabei gelang der spezifische Nachweis von 8 Kopien eines SARS-CoV-2 spezifischen RNA-Fragments aus Saliva in nur 8 Minuten inklusive LFA. Ein noch sensitiverer Nachweis des Erregers von COVID-19 konnte durch Qian *et al.* (2020) erbracht werden (Abbildung 71). Unter Nutzung einer *one pot* RT-RPA und einer nachgeschalteten Hybridisierungsreaktion mit einer markierten Sonde gelang die Erkennung von nur 3 Kopien eines SARS-CoV-2 spezifischen RNA-Fragmentes über abschließende LFA. Diese Ergebnisse unterstreichen die Praxisrelevanz, sondern auch das Entwicklungspotenzial von RPA-LFA Methoden.

8.2. Zusatz Material und Methoden

8.2.1. Übersicht: relevanter Plasmide

8.2.1.1. Sequenzierung pKHV

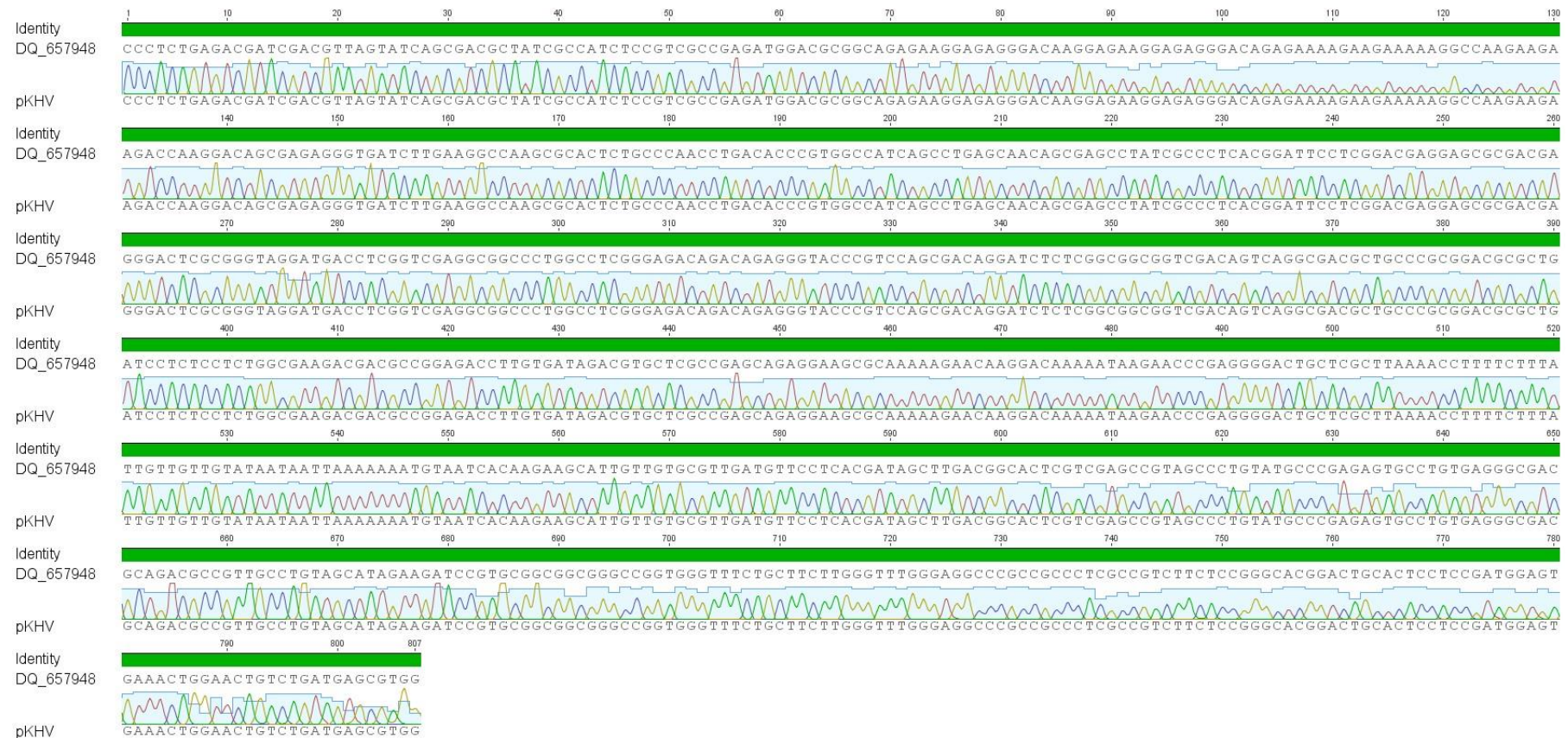


Abbildung 69 – Sequenzierung und *Alignment* der in pGEM-T inserierten KHV-spezifischen Sequenz. Als Referenzsequenz wurde der relevante Abschnitt aus der Genomsequenzierung des Isolats: Cyprinid Herpesvirus 3 strain KHV-U, complete genome (*Accession No.*: DQ_657948). Der grüne Balken symbolisiert die „Identity“ und somit den übereinstimmenden Bereich innerhalb des *Alignments*. Erstellt mit Geneious R7.

8.2.1.2. Sequenzierung pCEV

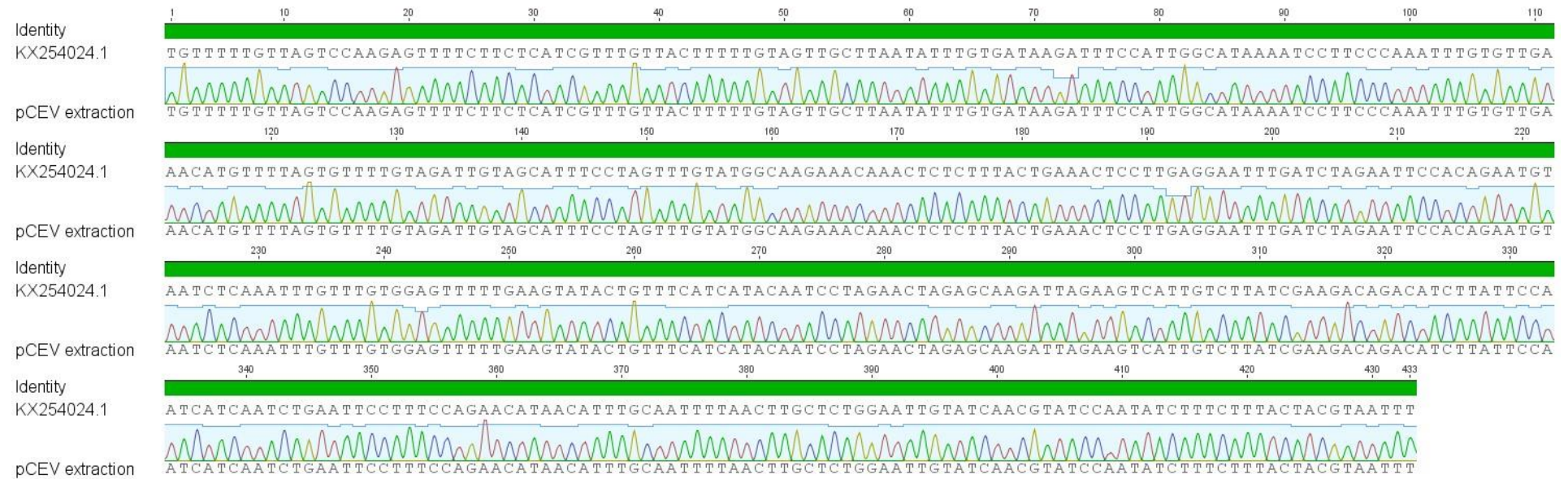


Abbildung 70 – Sequenzierung und *Alignment* der in pGEM-T inserierten CEV-spezifischen Sequenz. Als Referenzsequenz wurde der relevante Abschnitt der Sequenz: Carp Edema Virus Isolate Q098, 4a protein gene, partial cds (Accession No: KX_254024). Der grüne Balken symbolisiert die „Identity“ und somit den übereinstimmenden Bereich innerhalb des *Alignments*. Erstellt mit Geneious R7.

8.2.1.3. Sequenzierung pFVL_{Mut}

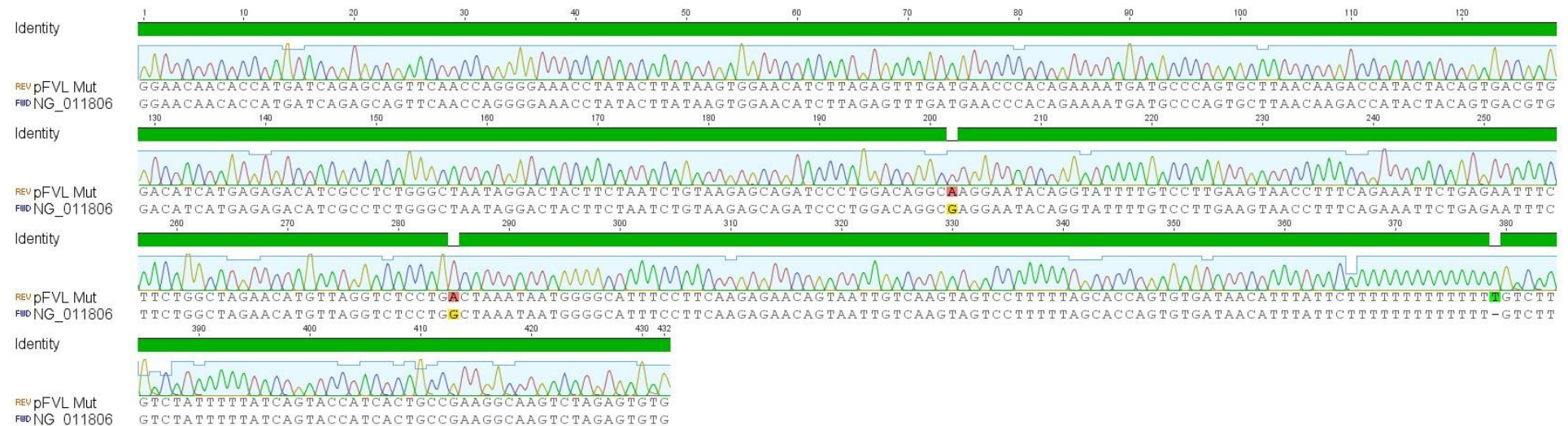


Abbildung 71 – Sequenzierung pFVL_{Mut} und *Alignment* gegen Referenzsequenz: Homo sapiens coagulation factor V (F5), RefSeqGene (LRG_553) on chromosome 1 (*Accession No.*: NG_011806). Farbig hinterlegte Basen symbolisieren Abweichungen zwischen den verglichenen Sequenzen. An Position 202 der hier dargestellten Sequenz handelt es sich um den FVL-charakteristischen SNP. Die anderen Abweichungen liegen im Bereich des Intron 10 des Faktor V-codierenden Gens. Der grüne Balken symbolisiert die „Identity“ und somit den übereinstimmenden Bereich innerhalb des *Alignments*. Erstellt mit Geneious R7.

8.2.1.4. Alignment pFVL_{Mut} und pFVL_{WT}

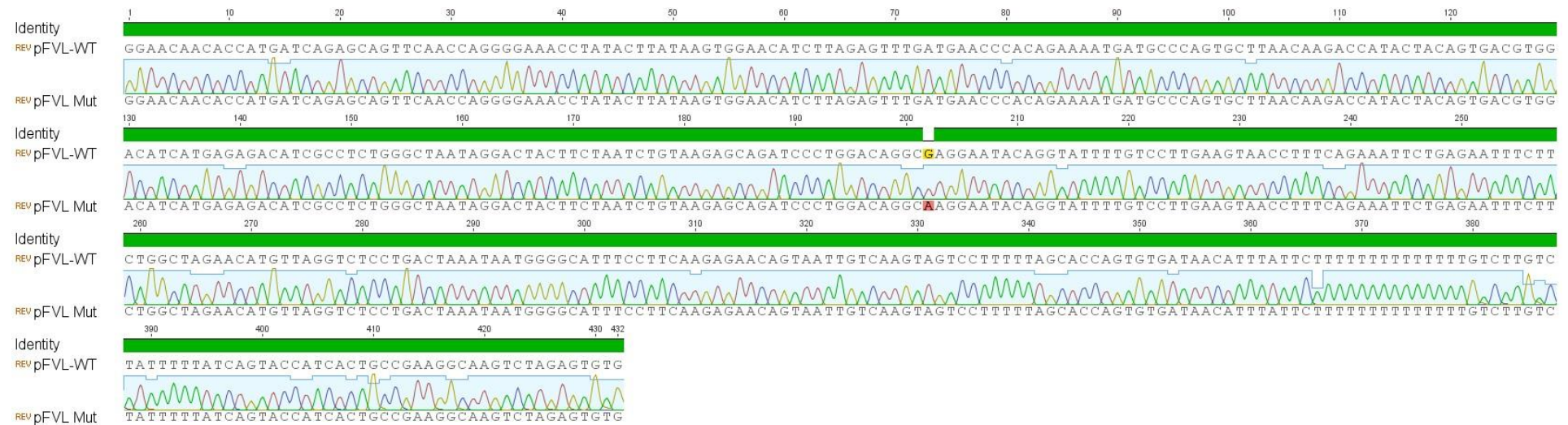


Abbildung 72 – pFVL_{Mut} Sequenzierung und Alignment im Vergleich zur pFVL_{WT}-Sequenz. Die farbig hinterlegten Basen sind symbolisieren Abweichungen, in diesem Fall den charakteristischen SNP. Abweichungen zur Referenzsequenz aus Abbildung sind identisch zwischen den pFVL_{WT} und pFVL_{Mut}. Der grüne Balken symbolisiert die „Identity“ und somit den übereinstimmenden Bereich innerhalb des Alignments. Erstellt mit Geneious R7.

8.2.2. Übersicht: relevanter Oligonukleotide

Die folgenden Tabelle sind aufgrund des Umfangs und zum Zweck der Übersichtlichkeit in verschiedene Teile untergliedert.

Tabelle 22.1 - Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Nachweis-System	Oligonukleotid - Name	Oligonukleotid - Sequenz 5' > 3'	5' Modi-fikation	3' Modi-fikation	interne Modi-fikation	Funktion
Nachweis <i>L. cerevisiae</i> via multiplex PCR	L. cerevisiae_for 1	gttaaacgggtctgcagagc	-	-	-	Primer
	L. cerevisiae_for 2	caactccttacgacgaatttac	-	-	-	Primer
	L. cerevisiae_rev 1	gtcgcccatcagcaact	-	-	-	Primer
	L. cerevisiae_rev 2	ccttatctgcagtcattcgc	-	-	-	Primer
	L. cerevisiae_for 1_Biotin	gttaaacgggtctgcagagc	Biotin	-	-	Primer
	L. cerevisiae_rev 1_FITC	gtcgcccatcagcaact	FITC	-	-	Primer
Nachweis <i>L. rossiae</i> via multiplex PCR	L. rossiae for 1.1 (F1)	actcgggttttgattgac	-	-	-	Primer
	L. rossiae for 1.2 (F2)	ccagattgacgagacattgaag	-	-	-	Primer
	L. rossiae rev 1 (R1)	cactcaatgtctcgtcaatc	-	-	-	Primer
	L. rossiae rev 2.1 (R4)	tttctggttaaataccgtcactatc	-	-	-	Primer
	L. rossiae rev 2.2	actctgtgttaaagaagaacgtatc	-	-	-	Primer
	L. rossiae_for 3 Biotin (F4)	ctgtgttaaagaagaacgtatc	Biotin	-	-	Primer
	L. rossiae_rev 3_FITC	ctgtgttaaataccgtcactatc	FITC	-	-	Primer
	L. rossiae forL (F3)	gaatctccacaatggcgcaagc	-	-	-	Primer
	L. rossiae revL (R3)	ccactaccctctctgcactcaagttat	-	-	-	Primer
	L. rossiae revL_FITC (R3)	ccactaccctctctgcactcaagttat	FITC	-	-	Primer
	L. rossiae probe (F3)	gaacgtatctgagagtaactgttcagatagtgac	-	-	-	Primer
	Anti_L.rossiae_revL	ataactgagtgacagaagagggtagtg	-	-	-	CPD-Helfer
Homo-/ Heteroplasmie-Schnelltest für <i>C. reinhardtii</i> mittels duplex-PCR	psbA_+86 for_FITC	catcggttggttcggtgtaac	FITC	-	-	Primer
	IL-Rev-DIG	cgattgcgttagaagttggga	Digoxygenin	-	-	Primer
	Fud7-Rev-DIG	tggctgctgattaccttctg	Biotin	-	-	Primer
	psbA_+147 for_FITC	atcgcttcatcgctgctcc	FITC	-	-	Primer
	psbA_147 rev	ggcaggcaacaataatacattgtccc	-	-	-	CPD-Helfer

Tabelle 22.2 – Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Nachweis-System	Oligonukleotid - Name	Oligonukleotid - Sequenz 5' > 3'	5' Modifikation	3' Modifikation	interne Modifikation	Funktion
LB-PC-Ident (PCR)	LBPC-For 1	gtttaggacygaacatttg	-	-	-	Primer
	LBPC-For 2	gtttaggactgaacttg	-	-	-	Primer
	LBPC-For 3	gtttaggactggacattg	-	-	-	Primer
	LBPC-For 4	gtttaggactgaacattwg	-	-	-	Primer
	LBPC-Rev 1	gtactcaggatcctgaac	-	-	-	Primer
	LBPC-Rev 1-FITC	gtactcaggatcctgrac	FITC	-	-	Primer
	AntiLBPC-For 1	crgtcctacaac	-	-	-	CPD-Helfer
	AntiLBPC-Rev 1	caggatcctgag	-	-	-	CPD-Helfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Lactobacillus brevis</i>	Lbr-p1-Biotin	gctcgccatagag	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Lbr-H1	gtttaggactgaacattgagttaccaaagt	-	-	-	Faltungshelfer
	Lbr-H2	gatgataaccgaagagctctggg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lbr-H3	gtgatacccccgtaggtgaaa	-	-	-	Faltungshelfer
	Lbr-H4	gtcaaccctcagttcaggatcctgagtac	-	-	-	Faltungshelfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Lactobacillus lindneri</i>	Lli-p1-Biotin	gaagctgcaccaaag	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Lli-H2	atttgataattgaagcagctg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lli-H3	gtgatagtctcgtaaatgaaatcgaat	-	-	-	Faltungshelfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Lactobacillus backi</i>	Lba-p1-Biotin	gatcaaaactgctaa	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Lba-H1	gtttaggactgaacattagagttaccaaag	-	-	-	Faltungshelfer
	Lba-H2	tagtgtagtctgaagcagtggtg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lba-H3	cgctgcgtcaaagaggggtgaaaatcccg	-	-	-	Faltungshelfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Lactobacillus (para-) collinoides</i>	Lco-p1-Biotin	ttggtagttgaacag	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Lco-H2	gggaagcctgrccaaagaggggtg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lco-H3	gccccgtaaacgaaccaata	-	-	-	Faltungshelfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Lactobacillus rossiae</i>	Lro-p1-Biotin	acgtgccataggggt	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Lro-H2	ccttgatagtcgaagcgttggtg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lro-H3	gagagccacgtagacgaatcaaaagtc	-	-	-	Faltungshelfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Lactobacillus (para-) casei</i>	Lca-p1-Biotin	gcgaaaactgcgaac	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Lca-H1	gtttaggactggacattggagttaccaaag	-	-	-	Faltungshelfer
	Lca-H2	ccgacgtagtcgaagtcagctgg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lca-H3	gctgcgccacagaaggtgaaagccctg	-	-	-	Faltungshelfer
	Lca-H4	ctccgtccaggatcctgagtac	-	-	-	Faltungshelfer
post PCR Hybridisierung, Identifikation von <i>Pediococcus damnosus</i>	Pda-p1-Biotin	gattttcatagccg	-	Biotin-TEG	-	Sonde
	Pda-H1	gtttaggaccgaacattgagttacca	-	-	-	Faltungshelfer
	Pda-H2	cagtcctggaagactggccagagcgggtg	-	-	-	Faltungshelfer
	Pda-H3	cagccccgtaggcaaatgaaaa	-	-	-	Faltungshelfer
KHV-Nachweis mittels duplex-PCR und post PCR-Hybridisierung	KHV-86F	gacgccggagacctgtg	-	-	-	Primer
	KHV-86F BIO	gacgccggagacctgtg	Biotin	-	-	Primer
	KHV-163R FITC	cgggttctattttgtcctgtt	FITC	-	-	Primer
	KHV-163R BIO	cgggttctattttgtcctgtt	Biotin	-	-	Primer
	KHV-109P (RC) FITC	cgtgctcgccgagcagaggaag	FITC	-	-	Sonde
	KHV-109P(RC) BIO	cgtgctcgccgagcagaggaag	Biotin	-	-	Sonde
	KHV-Helper 1	gacgccggagacctgtg	-	-	-	Faltungs-Helfer
	KHV-Helper 2	gcaaaaagaacaaggacaaaataagaaccc	-	-	-	Faltungs-Helfer

Tabelle 22.3 – Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Nachweis-System	Oligonukleotid - Name	Oligonukleotid - Sequenz 5' > 3'	5' Modi-fikation	3' Modi-fikation	interne Modi-fikation	Funktion
CEV-Nachweis (verschiedene Nachweisstrategien, inkl. <i>multiplex</i> PCR + post PCR-Hybridisierung)	CEFAS_CEV_FOR 1	gtatggagatccaaagtacttag	-	-	-	Primer
	CEFAS_CEV_FOR 2	gttatcaatgaaattgtgtattg	-	-	-	Primer
	CEFAS_CEV_REV 1	ctctcactattgtgacttg	-	-	-	Primer
	CEFAS_CEV_REV 2	tagcaaagtactacatcatcc	-	-	-	Primer
	CEV_FOR 3	ccattggcataaaatccttccc	-	-	-	Assay-Etablierung
	CEV_FOR 3L	gatttcattggcataaaatccttccc	-	-	-	Primer
	CEV_FOR 3XL	gtrataagatttcattggcataaaatccttccc	-	-	-	Primer
	CEV_FOR 3_Biotin	ccattggcataaaatccttccc	Biotin	-	-	Primer
	CEV_FOR 3.2	ccattgcatataaaatccttccc	-	-	-	Primer
	CEV_FOR 4	gcatttcctagttgtatggc	-	-	-	Primer
	CEV_FOR 4_Biotin	gcatttcctagttgtatggc	Biotin	-	-	Primer
	CEV_FOR 4s_FITC	cctagttgtatggcaag	FITC	-	-	Primer
	CEV_REV 2 FITC	tagcaaagtactacatcatcc	FITC	-	-	Primer
	CEV_REV 3	gattggaataagatgctgtcttcg	-	-	-	Primer
	CEV_REV 3 FITC	gattggaataagatgctgtcttcg	FITC	-	-	Primer
	CEV_REV_4	cctcaaggagttcagtaagag	-	-	-	Primer
	CEV_REV_4 FITC	cctcaaggagttcagtaagag	FITC	-	-	Primer
	CEV_REV_5.2 Biotin	ctgctmtagttctaggattg	Biotin	-	-	Primer
	CEV_REV_5.2 FITC	ctgctmtagttctaggattg	FITC	-	-	Primer
	ANTI CEV 5.2 REV	caatcctagaactagagcaag	-	-	-	Faltungs-& CPD-Helfer
	CEV_Helper 1	acatgttttaghgtttgta	-	-	-	Faltungs-Helfer
	CEV_Helper 1-2	gtagcatttcctagttgtatggcaag	-	-	-	Faltungs-Helfer
	CEV_Helper 2	acaaactctcttactghaactcc	-	-	-	Faltungs-Helfer
	CEV_Helper 3	ccttgaggaatygtatctagaattcc	-	-	-	Faltungs-Helfer
	CEV_probe 1_FITC	gtagcatttcctagttgtatggcaag	FITC	-	-	Sonde
	CEV_probe 1_Biotin	gtagcatttcctagttgtatggcaag	Biotin	-	-	Sonde
	CEV_probe 2_Biotin	acatgttttaghgtttgta	Biotin	-	-	Sonde
Identifikation von <i>Lactobacillus lindneri</i> (Reporter-basierte rhPCR)	LBPC-For 1	gttgtaggacygaacatttg	-	-	-	Primer
	LBPC-For 2	gttgtaggactgaacttg	-	-	-	Primer
	LBPC-For 3	gttgtaggactggacattg	-	-	-	Primer
	LBPC-For 4	gttgtaggactgaacattwg	-	-	-	Primer
	LBPC-Rev 1	gtactcaggatcctgaac	-	-	-	Primer
	LBPC-Rev 1-FITC	gtactcaggatcctgrac	FITC	-	-	Primer
	Lli-rhRep 1	ggaagctgc5ccaagag	6-FAM	Biotin-TEG	rA	Reporter
Vorarbeiten Nachweis der Faktor V Leiden Mutation (1)	FVL-MutA-For	gtaagagcagatccctggacaggcaaggaatacag	-	-	-	Primer
	FVL-MutA-Rev	caaggacaaaatacctgtattcctgcctgtccag	-	-	-	Primer
	FVL-Seq-For 1	ggaacaacacatgatcagagc	-	-	-	Primer
	FVL-Seq-For 2	ctgcacgttgacacatgtacc	-	-	-	Primer
	FVL-for 1	catgagagacatgcctctgg	-	-	-	Primer
	FVL-for 2	catgcctctgggctaataagg	-	-	-	Primer
	FVL-for 3	ctgtaagagcagatccctgg	-	-	-	Primer
	FVL- for 4	cgccctctgggctaataaggactac	-	-	-	Primer
	FVL- for 5	gaccatactacagtgcctggac	-	-	-	Primer
	FVL- for 6	cacagaaaatgatgcccatgtgc	-	-	-	Primer
	FVL-rev 1	gacctaacatgttctagccag	-	-	-	Primer
	FVL-rev 2	ggagacctaacaatgttctagccag	-	-	-	Primer
	FVL-rev 3	ggagacctaacaatgttctagcc	-	-	-	Primer
	FVL-rev 4	cttcggcagtgatggtactg	-	-	-	Primer
	FVL-rev 5	cacactctagactgccttcgg	-	-	-	Primer
	FVL-71 for	catcatgagagacatgcctctgg	-	-	-	Primer
	FVL-OE-for 1	gtaagagcagatccctggacaggcaaggaatacag				Primer
	FVL-OE-rev 1	caaggacaaaatacctgtattcctgcctgtccag				Primer
	FVL +218 rev	cttccttcggcagtgatggtact	-	-	-	Primer

Tabelle 22.4 – Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Nachweis-System	Oligonukleotid - Name	Oligonukleotid - Sequenz 5' > 3'	5' Modi-fikation	3' Modi-fikation	interne Modi-fikation	Funktion
Nachweis der Faktor V Leiden Mutation mittels rhPCR	rhFVL-for 1	gcagatccctggacaggc	-	-	-	Primer
	rh-FVL-for 2	gagcagatccctggacaggc	-	-	-	Primer
	rh-FVL-for 3	aagagcagatccctggacaggc	-	-	-	Primer
	rh-FVL-for 4	gtaagagcagatccctggacaggc	-	-	-	Primer
	rhFVL-rev 1	ggacaaaatacctgtattcct	-	-	-	Primer
	rh-FVL-rev 2	caaggacaaaatacctgtattcct	-	-	-	Primer
	rh-FVL-rev 3	ctcaaggacaaaatacctgtattcct	-	-	-	Primer
	rh-FVL-Mut-R2-BIO	caaggacaaaatacctgtattcct8gcct	Biotin	Spacer C3	8: rU	rh-Primer
	rh-FVL-Mut-F1-BIO	gcagatccctggacaggc5agga	Biotin	Spacer C3	5: rA	rh-Primer
	rh-FVL-WT-R2-DIG	caaggacaaaatacctgtattcct7gcct	Digoxigenin	Spacer C3	7: rC	rh-Primer
	rh-FVL-F2-FITC	catcgctctgggctaataagg5ctac	FITC	Spacer C3	5: rA	rh-Primer
	FVL-rev 2 FITC	ggagacctaacaatgttctagccag	FITC	-	-	Primer
Nachweis der Faktor V Leiden Mutation mittels ARMS-PCR	ARMS-FVL-WT-F1b-T	gcagatccctggacaggtg	-	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1b-G	cagatccctggacagggg	-	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1a-A	gcagatccctggacagacg	-	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1a-C	cagatccctggacagccg	-	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1c-T	cagatccctggacatgcg	-	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1c-A	cagatccctggacaagcg	-	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1c-C	agatccctggacagcg	-	-	-	ARMS-Primer
	Ex-ARMS-FVL-Mut-F1-DIG (EX-Mut for 2t)	aactcaagcagatccctggacagtca	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1a-t-DIG (WT for 1t)	gcagatccctggacaggtg	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1a-g-DIG (WT for 1g)	gcagatccctggacagggg	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1a-DIG	gcagatccctggacagtgcg	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1b-DIG (WT for 1a)	gcagatccctggacaggag	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-F1c-DIG	ttcagatccctggacaggag	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-WT-R2-DIG	caaggacaaaatacctgtattcttc	Digoxigenin	-	-	ARMS-Primer
	FVL-WT-F1-DIG (WT for)	agatccctggacaggcg	Digoxigenin	-	-	Primer
	Ex-ARMS-FVL-WT-F1-BIO (EX-WT for1a)	ctagtgtgcagatccctggacaggag	Biotin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-for 1-BIO+	agcagatccctggacagtca	Biotin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-Mut-F1BIO (Mut for 2t)	gcagatccctggacagtca	Biotin	-	-	ARMS-Primer
	ARMS-FVL-R2-BIO	caaggacaaaatacctgtattcttt	Biotin	-	-	ARMS-Primer
	FVL-Mut-F1-BIO (Mut for)	cagatccctggacaggca	Biotin	-	-	Primer
	FVL-rev 2 FITC (rev 2-FITC)	ggagacctaacaatgttctagccag	FITC	-	-	Primer
	FVL-rev 2-FITC+	ccaggagacctaacaatgttctagcc	FITC	-	-	Primer
	Ex-FVL-rev 2-FITC	gccaggagacctaacaatgttctagcca	FITC	-	-	Primer
Nachweis der Faktor V Leiden Mutation mittels Standard-PCR und post PCR-Hybridisierung	FVL-WT-P1-DIG	gtattctcgctgtc	Digoxigenin	-	-	Primer
	FVL-Mut-P1-BIO	gtattctcgctgtc	Biotin	-	-	Primer
	FVL-rev 2 FITC	ggagacctaacaatgttctagccag	FITC	-	-	Primer
	FVL-H1	ggagacctaacaatgttctagccagaagaaattctcag	-	-	-	Primer
	FVL-H2	ctgaaaggttacttcaaggacaaaatac	-	-	-	Primer
	FVL-H3	ggatctgctcttacagattagaag	-	-	-	Primer
	FVL-H4	gtcctattagcccagagcgcatg	-	-	-	Primer
Nachweis Faktor V Leiden Mutation (Reporter-basierte rhPCR)	FVL-WT-rhRep 1	ctggacaggc5aggaataacag	6-FAM	Biotin-TEG	rA	Reporter
	FVL-Mut-rhRep 1	ctggacaggc5aggaataacag	6-FAM	Biotin-TEG	rA	Reporter
	FVL-WT-Block 1	ctggacaggcgaggaataca	-	inversed dG	-	Spezifitäts-Helfer
	FVL-Mut-Block 1	ctggacaggcaaggaataca	-	inversed dG	-	Spezifitäts-Helfer
	FVL-for 2	catcgctctgggctaataagg	-	-	-	Primer
	FVL-rev 2	ggagacctaacaatgttctagccag	-	-	-	Primer

Tabelle 22.5 – Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Nachweis-System	Oligonukleotid - Name	Oligonukleotid - Sequenz 5' > 3'	5' Modi-fikation	3' Modi-fikation	interne Modi-fikation	Funktion
Nachweis Faktor V Leiden Mutation (Reporter-basierte rhLAMP-nicht funktionell)	FVL-WT-rhRep 1	ctggacaggc5aggaatacag	6-FAM	Biotin-TEG	rA	Reporter
	FVL-Mut-rhRep 1	ctggacaggc5aggaatacag	6-FAM	Biotin-TEG	rA	Reporter
	FVL-WT-Block 1	ctggacaggcaggaataca	-	inversed dG	-	Spezifitäts-Helfer
	FVL-Mut-Block 1	ctggacaggcaaggaataca	-	inversed dG	-	Spezifitäts-Helfer
	FVL-F3_1	aaccacagaaaatgatgc	-	-	-	LAMP-Primer (F3)
	FVL-F3_2	cacagaaaatgatcccag	-	-	-	LAMP-Primer (F3)
	FVL-B3_1	ccattatttagccaggagacc	-	-	-	LAMP-Primer (B3)
	FVL-B3_2	cccattatttagccaggaga	-	-	-	LAMP-Primer (B3)
	FVL-B3_3	ccccattatttagccagga	-	-	-	LAMP-Primer (B3)
	FVL-FIP_1	gtcctattagcccagaggcgccagtgttaacaagacca	-	-	-	LAMP-Primer (FIP)
	FVL-FIP_2	gtcctattagcccagaggcggtgcttaacaagaccatactacag	-	-	-	LAMP-Primer (FIP)
	FVL-FIP_3	agaagtagtctattagcccagaggccagtgttaacaagacca	-	-	-	LAMP-Primer (FIP)
	FVL-FIP_4	agaagtagtctattagcccagagggtgcttaacaagaccatactacag	-	-	-	LAMP-Primer (FIP)
	FVL-BIP_1	aggtattttgtccttgaagtaaccttaacatgttctagccagaaga	-	-	-	LAMP-Primer (BIP)
	FVL-BIP_2	aggtattttgtccttgaagtaaccttaacatgttctagccaga	-	-	-	LAMP-Primer (BIP)
	FVL-LF_1	gtctctcatgatgccacgtc				LAMP-Primer (LF)
	FVL-LB_1	ttcagaaattctgagaatttc				LAMP-Primer (LB)
Identifikation von Bakterien mittels PCR, PCR-Produktaufreinigung und Sanger-Sequenzierung	16S_1250R_Seq	tgtacacgtgtgtagccca	-	-	-	Primer
	16S_350F_Seq	cacattgggactgagacacg	-	-	-	Primer
	16S_Start_F1	tgccataacatgcaagtcgaac	-	-	-	Primer
	16S_Start_F2	gcytaayacatgcaagtyg	-	-	-	Primer
	23S-Seq-for 1	ctagragccgatgaaggacg	-	-	-	Primer
	23S-Seq-rev 1	ctggtycactatcggtcactag	-	-	-	Primer
Interne Amplifikationskontrolle	psbA_-133 for	gtgctagtgtaactaacgtttg	-	-	-	Primer
	psbA_+570 rev	gtgttctgttggaatacga	-	-	-	Primer
	psbA_+86 for_FITC	catcggttggtcggtgtaac	FITC	-	-	Primer
	psbA_147 rev	ggagcagcgatgaaagcgatg	-	-	-	CPD-Helfer
	IL-Rev-DIG	cgattgcgttagaagttggga	Digoxygenin	-	-	Primer
	psbA_147 for_DIG	catcgcttcatcgctgctcc	Digoxygenin	-	-	Primer
	psbA_412 rev_FITC	gcgatccatggacgcatacc	FITC	-	-	Primer
	Fud7-Rev-DIG	ttggctgctgattaccttcg	Biotin	-	-	Primer
	Anti_CgGluc_rev	tcagggtgtggagcggacat	-	-	-	CPD-Helfer
	CgGluc_Stop	gtccacaccta	-	-	Spacer C3	CPD-Helfer
	CgGluc_162F_DIG	actgcgagtggagacacatgat	Digoxygenin	-	-	Primer
	CgGluc_230R_FITC	tcagggtgtggagcggacat	FITC	-	-	Primer
Weitere PCR-Hybridisierungsassays	16S_UniF1_FITC	ccaractcctacggaggcgwgc	FITC	-	-	Primer
	16S_UniR1	gtatyacgcggctgctggcac	-	-	-	Primer
	AAB-H1	gccggggctcttctgcgggtaccg	-	-	-	Faltungs-Helfer
	AAB-H2	ccgaaagtgttacaatccgaa	-	-	-	Faltungs-Helfer
	AAB-p1_Biotin	catcatcgctccccg	Biotin	-	-	Sonde

8.2.3. Übersicht: Nachweis-Zusammensetzung

Die Übersicht zur Zusammensetzung der erarbeiteten Nachweise, sowie der dazugehörigen Temperaturprotokolle untergliedert sich analog zum vorherigen Part aufgrund der Größe und zum Zweck der Übersichtlichkeit in Untertabellen.

Tabelle 23.1 – Übersicht Zusammensetzung von Nachweisen Bierschädigender Bakterien

Nachweis-system	Komponente	Bezeichnung / Beschreibung	V in μL (je Reaktion)	Konzentration Arbeitslösung	End-Konzentration in der Reaktion
<i>L. cerevisiae</i> (duplex PCR)	Nachweisprimer <i>forward</i>	<i>L. cerevisiae_for</i> 1_Biotin	0,25	25 pmol / μL	0,25 μM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	<i>L. cerevisiae_rev</i> 1_FITC	0,25	25 pmol / μL	0,25 μM
	IAC-Primer <i>forward</i>	<i>psbA_+86</i> for_FITC	0,20	25 pmol / μL	0,2 μM
	IAC-Primer <i>reverse</i>	IL-Rev-DIG	0,20	25 pmol / μL	0,2 μM
	IAC- <i>template</i>	pMM2	0,20	0,04 pg / μL	160 Kopien / μL
	DNA-Polymerase-Mix	HotStart Taq DNA-Polymerase Mix	12,50	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	10,00	-	-
	<i>template</i>	Kultur / Kolonie / Verdünnung / Extrakt	2,00	-	-
<i>L. rossiae</i> (duplex PCR)	Nachweisprimer <i>forward</i>	<i>L.rossiae_for</i> 3_Biotin (F4)	0,25	25 pmol / μL	0,25 μM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	<i>L.rossiae_rev</i> L_FITC (R3)	0,25	25 pmol / μL	0,25 μM
	IAC-Primer <i>forward</i>	<i>psbA_+147</i> for_DIG	0,15	25 pmol / μL	0,15 μM
	IAC-Primer <i>reverse</i>	<i>psbA_412</i> rev_FITC	0,15	25 pmol / μL	0,15 μM
	IAC- <i>template</i>	pMM2	0,20	0,04 pg / μL	160 Kopien / μL
	DNA-Polymerase-Mix	HotStart Taq DNA-Polymerase Mix	12,50	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	9,50	-	-
	<i>template</i>	Kultur / Kolonie / Verdünnung / Extrakt	2,00	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. singleplex Ident-PCR	Nachweisprimer <i>forward</i> 1	LBPC-For 1	0,20	25 pmol / μL	0,2 μM
	Nachweisprimer <i>forward</i> 2	LBPC-For 2	0,20	25 pmol / μL	0,2 μM
	Nachweisprimer <i>forward</i> 3	LBPC-For 3	0,20	25 pmol / μL	0,2 μM
	Nachweisprimer <i>forward</i> 4	LBPC-For 4	0,20	25 pmol / μL	0,2 μM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	LBPC-Rev 1-FITC	0,30	25 pmol / μL	0,3 μM
	DNA-Polymerase-Mix	HotStart Taq DNA-Polymerase Mix	12,50	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	9,40	-	-
	<i>template</i>	Kultur / Kolonie / Verdünnung / Extrakt	2,00	-	-
Reporter-basierte RNase H2 abhängige PCR (singleplex)	Nachweisprimer <i>forward</i> 1	LBPC-For 1	0,50	25 pmol / μL	0,625 μM
	Nachweisprimer <i>forward</i> 2	LBPC-For 2	0,50	25 pmol / μL	0,625 μM
	Nachweisprimer <i>forward</i> 3	LBPC-For 3	0,50	25 pmol / μL	0,625 μM
	Nachweisprimer <i>forward</i> 4	LBPC-For 4	0,50	25 pmol / μL	0,625 μM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	LBPC-Rev 1	0,50	25 pmol / μL	0,625 μM
	Reporter-Sonde	Lli-rhRep 1	0,40	10 pmol / μL	0,2 μM
	DNA-Polymerase-Mix	rhAMP® Genotyping Master Mix	10,00	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	5,10	-	-
	<i>template</i>	Kultur / Kolonie / Verdünnung / Extrakt	2,00	-	-

Tabelle 23.2 – Zusammensetzung Nachweise FVL-Mutation, Carp Edema Virus, Homo-/ Heteroplasmietest

Nachweis-system	Komponente	Bezeichnung / Beschreibung	V in µL (je Reaktion)	Konzentration Arbeitslösung	End-Konzentration in der Reaktion
C. reinhartii Homo-/ Heteroplasmietest (duplex PCR)	Nachweisprimer <i>forward</i>	psbA_+147 for_FITC	0,60	25 pmol / µL	0,6 µM
	Nachweisprimer <i>reverse 1</i>	IL-Rev-DIG	0,30	25 pmol / µL	0,3 µM
	Nachweisprimer <i>reverse 2</i>	Fud7-Rev-DIG	0,30	25 pmol / µL	0,3 µM
	DNA-Polymerase	Maxima HotStart Taq DNA-Polymerase	0,20	5 U / µL	1 U pro Reaktion
	dNTPs	dNTP Mix, Thermo Fisher	0,50	10 mM je dNTP	0,2 mM
	PCR-Puffer	10x HotStart PCR Buffer, Thermo Fisher	2,50	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Magnesiumchlorid	25 mM MgCl ₂ , Thermo Fisher	4,00	25 mM	4 mM
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O	14,60	-	-
	<i>template</i>	Extrakt / Flüssigkultur / Kolonie	2,00	-	-
Carp Edema Virus-Nachweis (duplex PCR)	Nachweisprimer <i>forward</i>	CEV-for 3.2	0,1	25 pmol / µL	0,125 µM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	CEV-rev 5.2-FITC	0,25	100 pmol / µL	1,25 µM
	IAC-Primer <i>forward</i>	CgGluc_162F_DIG	0,1	10 pmol / µL	0,05 µM
	IAC-Primer <i>reverse</i>	CgGluc_230R_FITC	0,1	10 pmol / µL	0,05 µM
	IAC-CPD-Helfer	CgGluc_Stop	0,25	100 pmol / µL	1,25 µM
	DNA-Polymerase-Mix	HotStart Taq DNA-Polymerase Mix	10	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Uracil DNA-Glycosylase	UDG-Mix	1	20-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	3,2	-	-
	<i>template</i>	isolierte DNA / Abstrich-Extrakt	5	-	-
KHV-Nachweis	Loose und Breitbach <i>et al.</i> , 2020				
Faktor V Leiden Nachweis (ARMS-PCR, singleplex)	Nachweisprimer <i>forward</i>	WT-for1g-DIG / Mut-for2t-BIO	0,25	25 pmol / µL	0,25 µM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	FVL-rev 2 FITC	0,25	25 pmol / µL	0,25 µM
	DNA-Polymerase-Mix	HotStart Taq DNA-Polymerase Mix	12,50	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	10,00	-	-
	<i>template</i>	Plasmid-DNA, PCR-Fragment, gDNA	2,00	-	-
Faktor V Leiden Nachweis (rhPCR, singleplex)	Nachweisprimer <i>forward</i>	rh-FVL-F2-FITC	0,25	25 pmol / µL	0,25 µM
	Nachweisprimer <i>reverse</i>	rh-FVL-Mut-R2-BIO oder rh-FVL-WT-DIG	0,25	25 pmol / µL	0,25 µM
	DNA-Polymerase-Mix	rhAMP® Genotyping Master Mix	12,50	2-fach konzentriert	1-fach konzentriert
	Wasser / TE-Puffer	ddH ₂ O / 1xTE-Puffer	10,00	-	-
	<i>template</i>	Plasmid-DNA, PCR-Fragment, gDNA	2,00	-	-
Faktor V Leiden Nachweis (Rep-rhPCR, singleplex)	Primer <i>forward</i>	FVL-for 2	0,20	25 pmol / µL	0,5 µM
	Primer <i>reverse</i>	FVL-rev 2	0,20	25 pmol / µL	0,5 µM
	Reporter	FVL-WT-rhRep 1 oder FVL-Mut-rhRep 1	0,40	10 pmol / µL	0,4 µM
	Block-Sonde	FVL-Mut-Block 1 oder FVL-WT-Block 1	0,40	10 pmol / µL	0,4 µM
	Polymerase-Mix	rhAMP® Genotyping Master Mix	5,00	2x-konzentriert	1-fach konzentriert
	<i>template</i>	Plasmid-DNA, PCR-Fragment, gDNA	1,00	-	-
	Wasser	ddH ₂ O	2,80	-	-

Tabelle 24 – Übersicht Temperaturprotokolle der präsentierten Nachweise

Nachweis-system	Schritt	T in °C	t in sek	zurück zu Schritt	Zyklus-zahl	ΔT in °C je Zyklus	Δt in sek je Zyklus
<i>L. cerevisiae</i> (duplex PCR)	1. Initialdenaturierung	95	240				
	2. Denaturierung	95	15				
	3. Annealing	65	15			-0,15	
	4. Elongation	72	5	2.	34 x		
	5. finale Elongation	72	30				
	6. Pause	8	∞				
<i>L. rossiae</i> (duplex PCR)	1. Initialdenaturierung	95	240				
	2. Denaturierung	95	15				
	3. Annealing	65	15			-0,3	
	4. Elongation	72	5	2.	12 x		
	5. Denaturierung	95	15				
	6. Annealing	61	15			-0,16	-0,2
	7. Elongation	72	5	5.	24x		
	8. finale Elongation	72	30				
	9. Pause	8	∞				
<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pedococcus</i> spp. singleplex ident-PCR	1. Initialdenaturierung	95	240				
	2. Denaturierung	95	15				
	3. Annealing	58	15				
	4. Elongation	72	1	2.	34 x		
	5. finale Elongation	72	10				
	6. Pause	8	∞				
Reporter-basierte RNase H2 abhängige PCR (singleplex)	1. Initialdenaturierung	95	600				
	2. Denaturierung	95	10				
	3. Annealing	55	30				
	4. Elongation	68	15	2	35		
	5. finale Elongation	68	60				
	6. Pause	8	∞				
<i>C. reinhardtii</i> Homo-/ Heteroplasmiertest (duplex PCR)	1. Initialdenaturierung	95	300				
	2. Denaturierung	95	45				
	3. Annealing	70	30			-0,1	
	4. Elongation	72	6	zurück zu 2.	20 x		
	5. Denaturierung	95	45				
	6. Annealing	68	30				
	7. Elongation	72	6	zurück zu 2.	20 x		
	8. finale Elongation	72	300				
	9. Pause	8	∞				
Carp Edema Edema- Nachweis (duplex PCR)	1. UDG-Verdau	37	600				
	2. Initialdenaturierung	95	240				
	3. Denaturierung	95	5				
	4. Annealing	60	25				
	5. Elongation	72	3	3.	59 x		
	6. finale Elongation	72	30				
	7. Pause	20	∞				
	8. Denaturierung	95	10				
	9. Hybridisierung	50	300				
	10. Lateral Flow Analyse	50	∞				

KHV-
Nachweis

Loose und Breitbach et al., 2020

Faktor V Leiden Nachweis (ARMS- PCR, singleplex)	1. Initialdenaturierung	95	240				
	2. Denaturierung	95	15				
	3. Annealing	65	15				
	4. Elongation	72	5	2	10		
	5. finale Elongation	72	15				
	6. Pause	8	∞				
Faktor V Leiden Nachweis (rhPCR, singleplex)	1. Initialdenaturierung	95	600				
	2. Denaturierung	95	10				
	3. Annealing	66 (WT) / 63 (Mut)	30	2	35		
	4. finale Elongation	68	30				
	5. Pause	8	∞				
Faktor V Leiden Nachweis (Rep- rhPCR, <i>simianlex1</i>)	1. Initialdenaturierung	95	600				
	2. Denaturierung	95	10				
	3. Annealing	65	30				
	4. Elongation	68	15	2	35		

5. finale Elongation	68	60
6. Pause	8	∞

8.2.4. *Escherichia coli* – assoziierte Methoden (Klonierung, Transformation, selektive Kultivierung)

8.2.4.1. Verwendete *E. coli* Stämme

In Verlauf dieser Arbeit wurden drei verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet (DH5 α [Clontech], TG1 [Stratagene], Top10 [Invitrogen]). In jedem Fall handelt es sich um Laborstämme, die sich vom Stamm *E. coli* K12 ableiten und somit für den Umgang im gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 1 geeignet sind.

8.2.4.2. Generelle Anzuchtbedingungen

E. coli wurde unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkultur wurde während der Anreicherungsphase kontinuierlich geschüttelt. Die Zwischenlagerung lebender Zellen auf Festmedium erfolgte im Kühlschrank bei 4-6°C für maximal 10 Tage. Platten wurde für diesen Zweck mit Parafilm verschlossen. Jeglicher Umgang mit *E. coli* erfolgte unabhängig von den den genutzten Stämmen oder Klonen unter möglichst sauberen bzw. sterilen Bedingungen.

8.2.4.3. Die Übernachtskultur

Die Anreicherung von *E. coli* erfolgte präferiert über Übernachtskulturen. Hierbei wurde i.d.R. Zellmaterial einer KBE in 5-10 mL LB-Medium (+ etwaiges Antibiotikum) überführt. Nach 16-24 stündiger Inkubation (schüttelnd bei 37°C) wurde die eingetrübte Kultur weiterverarbeitet.

8.2.4.4. Anzucht auf selektivem Festmedium

Hierzu wurde LB-Agar verwendet, dem sofern notwendig relevante Antibiotika zugesetzt wurden. Ein Aliquot von 10 bis maximal 100 μ L einer *E. coli*-Zellsuspension wurden auf die Platte aufgebracht und mittels sterilem Drigalskyspatel möglichst gleichmäßig verteilt. Alternative erfolgte das "Ausplattieren" über die Glasperlenemethode, wobei mind. 3 sterile Glasperlen intensiv in der geschlossenen Platte geschüttelt wurden. Die Platten wurden mit der Agarseite nach oben für 16-24 h bei 37°C inkubiert.

8.2.4.5. Isolierung von Plasmiden

Zur Plasmidisolierung wurde das Wizard[®] SV Miniprep Kit (Promega Corp.) genutzt. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit dem "Zentrifugationsprotokoll" entsprechend der Herstellerangaben mit wenigen Abweichungen. Zellmaterial aus 8-10 mL einer Übernachtskultur wurden für die Isolierung eines Plasmids herangezogen. Weiterhin erfolgte die Elution in 50 μ L frischem vorgewärmten ddH₂O (40°C) oder 1xTE-Puffer. Dabei wurde die 1 minütige Elution auf 10 min ausgedehnt. Ggf. erfolgte die Elution im Inkubator bei 40°C für 10 min. Die Konzentration und Reinheit der Probe wurde mittels

Nanodrop® ND-1000 bestimmt. Isolierte Plasmide wurden bei -20°C, zum Teil über mehrere Jahre, gelagert.

8.2.4.6. Erzeugung chemisch kompetenter E.coli Zellen

Der gewünschte *Escherichia coli* Stamm wurde in Form einer Übernachtskultur (5-10 mL LB-Medium⁹) angereichert. 3 mL dieser stationären Kultur wurde in 200 mL Φ B¹⁰ Medium gegeben. Die Kultur wurde schüttelnd bei 37°C inkubiert bis eine optischen Dichte von maximal 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden sofort geerntet und in allen weiteren Schritten gekühlt weiterverarbeitet. Aufgeteilt auf 4 x 50 mL Reaktionsgefäße wurden die Zellen für 15 min auf Eis abgekühlt und dann bei 4°C für 5 min bei 4000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets vorsichtig in je 20 mL sterilem und eiskaltem TfbI¹¹-Puffer resuspendiert. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert (4°C, 5 min, 4000 g), der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in je 2mL sterilem, eiskaltem TfbII-Puffer¹² resuspendiert. Nach abschließender 20 minütiger Inkubation der Zellsuspension auf Eis wurden je 100 μ L der chemisch kompetenten Zellen in vorgekühlte (-80°C) 1,5 mL Reaktionsgefäße zügig aliquotiert und sofort in Flüssigstickstoff gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

8.2.4.7. Transformation chemisch kompetenter Zellen via Hitzeschock

Die Transformation chemisch kompetenter erfolgte über ein einfaches Hitzeschock-Protokoll. 100 μ L Aliquots kompetenter Zellen wurden der Lagerung bei -80°C entnommen und dann schonend für 10 - 15 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2,5 μ L des Klonierungsproduktes folgte eine erneute Inkubation auf Eis für weitere 20 min. Anschließend erfolgte der 45 sekündige Hitzeschock der Zellen bei 42°C in einem vorgewärmten Wasserbad. Im Anschluss an eine 2 minütige Inkubationsphase auf Eis erfolgte sofort die Zugabe von 900 μ L SOC-Medium¹³. Diese Mischung wurde für etwa 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach einem niedertourigen Zentrifugationsschritt wurden 900 μ L des Überstandes vorsichtig mit der Pipette abgenommen und das Pellet im Restvolumen resuspendiert. Danach erfolgte die Anzucht auf einem festen Selektivmedium.

⁹ **LB-Medium:** Hefeextrakt: 10 g/L; Trypton: 5 g/L; Natriumchlorid: 5 g/L

¹⁰ **Φ B Medium:** Hefeextrakt: 5 g/L; Trypton 20 g/L; Magnesiumsulfat: 4 g/L; Kaliumchlorid: 10 mM

¹¹ **TfbI-Puffer:** Kaliumacetat: 30 mM; Manganchlorid: 50 mM; Rubidiumchlorid: 50 mM; Calciumchlorid: 10 mM; Glycerol: 15% (v/v); pH 5,8

¹² **TfbII-Puffer:** MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid): 10 mM; Calciumchlorid: 75 mM; Rubidiumchlorid: 10 mM; Glycerol: 15% (v/v)

¹³ **SOC-Medium:** Trypton: 2% (w/v); Hefeextrakt: 0,5% (w/v); Natriumchlorid: 10 mM; Kaliumchlorid: 2,5 mM; Magnesiumchlorid: 10 mM; Magnesiumsulfat: 10 mM; Glukose: 20 mM

8.2.4.8. Standard PCR und OE-PCR: Erstellung des Inserts für die Klonierung

Die Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines NALFIAs, bei dem kein natürliches Probenmaterial genutzt werden kann, ist die Verfügbarkeit genetischen Materials zur Vervielfältigung definierter DNA-Zielsequenzen. Über Standard- und OE-PCR wurden PCR-Produkte generiert, die für eine anschließende Klonierung verwendet wurden. Die Amplifikation erfolgte dabei präferiert mit einer Taq DNA-Polymerase, da diese die erforderlichen A-Überhänge am Amplifikat erzeugt. Im Falle des Faktor V Leiden-Testsystems wurde via *Overlap Extension* PCR (OE-PCR) die Faktor V Leiden-Mutation in die Zielsequenz eingefügt (Husain und Chong, 2016 / Zarghampoor *et al.*, 2020). Dabei wurde die goTaq DNA-Polymerase von Promega verwendet. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde für die pGEM[®]-T Klonierung herangezogen.

8.2.5. *Chlamydomonas reinhardtii* – assoziierte Methoden

8.2.5.1. Southern Blot Analyse

Bei der klassischen Southern Blot Analyse nach Sambrook et al. (1998) wurde Gesamtzell-DNA von *C. reinhardtii* isoliert und mit der Restriktionsendonuclease *Hind*III verdaut. Nach Auftrennung der verdauten DNA via AGE erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Die Hybridisierung wurde mit einer 5SrDNA spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde durchgeführt. Dabei wurde die Hybridisierungslösung¹⁴ über Nacht mit der Membranoberseite inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran gewaschen, geblockt und in Antikörperlösung (Anti-Dig *fab fragments*, Roche) inkubiert. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde CSPD gewählt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte entsprechend der Herstellerangaben des CSPD *ready-to-use* Kits von Roche.

8.2.5.2. Chlorophyll-Bestimmung

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurden Zellen aus 1 mL einer *C. reinhardtii* Flüssigkultur in 80% Aceton (v/v) und für 2 min geschüttelt. Nach einer 5 min Zentrifugation (RT, 16000 g) wurde der Überstand in Küvette überführt und dann in einem Spektralphotometer die OD bei 652 nm gemessen. Anhand der folgenden Formel ließ sich der Chlorophyllgehalt errechnen:

$$\frac{\text{OD 652 nm} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{34,5 \text{ (molarer Extinktionskoeffizient)}} = \text{mg Chlorophyll a und b je mL}$$

¹⁴Hybridisierungslösung: 2,5 µL Sonde; 5xSSC; 50% Formamid (v/v); 0,1% N-Laurosylsarcosin (w/v); 2% Blocking Reagenz (w/v, Boehringer GmbH); 0,2% SDS (w/v)

8.2.6. *Alicyclobacillus* – assoziierte Methoden (Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140)

8.2.6.1. Zusammensetzung des Probensets

Die Zusammensetzung des Probensets ist essentiell für die abzuleitende Aussagekraft der Ergebnisse der Vergleichsanalyse. Insgesamt wurden 60 bereits charakterisierte, natürlich kontaminierte Fruchtsaftkonzentrate untersucht. Entsprechend der Vorgabe (DIN EN ISO 16140) gliedert sich das Probenaset in 30 filtrierbare und 30 nicht-filtrierbare Proben, wobei 30 Proben positiv und 30 Proben negative für die Anwesenheit von *Alicyclobacillus* getestet wurden. Unter den Proben wurden darüber hinaus verschiedene Matrices bedacht (Apfelsaftkonzentrat, Orangensaftkonzentrat, Pfirsichsaftkonzentrat, Fruchtjoghurt und *Smoothies*). Das gesamte Probenaset wurde freundlicherweise durch LADR zur Verfügung gestellt und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei 4°C gelagert.

8.2.6.2. Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. aus Fruchtsaftkonzentraten durch selektive Kultivierung

Der Kultur-basierte Nachweis von *Alicyclobacillus* aus Fruchtsaftkonzentraten wurde in Anlehnung an die Richtlinie der International Fruit and Vegetable Juice Association (IFU Method No. 12: 2007) durchgeführt. Im Unterschied zu dieser methodischen Vorgabe wurden filtrierbare Konzentrate analog zu nicht-filtrierbaren behandelt, wodurch alle Probenmatrices einheitlich beprobt werden konnten. 10 g Probenmaterial wurde mit 90 mL BAT-B (Döhler GmbH) gemischt und nach einem Hitzeschock (10 min, 80°C) bei 45°C inkubiert. Nach 5d wurden 100 µL der Anreicherung auf BAT-A¹⁵ ausplattiert und erneut 3d bei 45°C inkubiert. Sichtbare und repräsentative KBEs wurden auf frische BAT-A und PC-A¹⁶ überimpft. Wachstum auf BAT-A und ausbleibendes Wachstum auf PC-A bestätigt den Nachweis von *Alicyclobacillus* spp.

8.2.6.3. Identifikation von *Alicyclobacillus* spp. und Guaiacolnachweis

Im Rahmen der Vergleichsanalyse wurde einzelne und repräsentative KBEs Kultur-positiver Proben via MALDI-TOF-MS und 16S-Gensequenzierung analysiert und identifiziert. Diese Analyse wurde durch den Laborverbund Dr. Kramer und Kollegen (LADR) entsprechend interner Maßgaben durchgeführt. Der enzymatische Nachweis des *Alicyclobacillus*-charakteristischen off-flavour Guaiacol erfolgte unter Zuhilfenahme des *Guaiacol Detection Kits* (Döhler GmbH) nach Herstellerangaben.

8.2.6.4. PCR-Lateral Flow-basiertes Testsystem für *Alicyclobacillus*

Das Nachweisregime des kommerziell verfügbaren *Alicyclobacillus*-Nachweissystems (Milenia Biotec GmbH) setzt sich aus aufeinanderfolgenden PCR-LFAs zusammen. Nach einer einfachen DNA-Aufarbeitung wird zunächst ein Screening auf *Alicyclobacillus* spp. durchgeführt. Bei einem positivem

¹⁵ **BAT-A:** gebrauchsfertiger BAT-Agar, Döhler GmbH

¹⁶ **PC-A:** gebrauchsfertiger Plate Count Agar, Döhler GmbH

Ergebnis wird erneut ein Aliquot des DNA-Extrakts in eine zweite Identifizierungs-PCR gegeben. Hierbei wird auf die Anwesenheit Guaiacol-bildender *Alicyclobacillus* spp. geprüft, sowie ggf. eine Identifizierung des häufigsten Schädigers *A. acidoterrestris* vorgenommen. Darüber hinaus ist es möglich mit dem Milenia Testsystem Einzelkolonien oder Kolonie-Pools schnell zu untersuchen. Hierfür wird bspw. eine Kolonie in 100 µL ddH₂O oder steriles BAT-B überimpft und resuspendiert. 2 µL aus dieser Mischung werden für die Analyse verwendet ohne weitere DNA-Extraktion. Auch Anreicherungen von Einzelkolonien in reinem BAT-B sind möglich. PCR-inhibierende Effekte treten dann auf, wenn Mischungen aus Fruchtsäften und Fruchtsaft-Konzentraten analysiert werden. Diese beinhalten zumeist zahlreiche PCR-Inhibitoren (vor allem Polyphenole und Polysaccharide), die eine einfache qualitative PCR-Direktanalytik unmöglich machen. In diesen Fällen wird eine einfache Aufarbeitung empfohlen.

8.2.6.5. Zeitpunkte der PCR-Analyse

Fünf PCR-Analysezeitpunkte wurden im Rahmen der Vergleichsuntersuchung gewählt. Das Probenset wurde einmal direkt vor Anreicherung direkt beprobt. Im Zuge des 5-tägigen Inkubationsschrittes wurde nach 2 Tagen, nach 3 Tagen und nach 5 Tagen ein Aliquot zur PCR-Analyse entnommen. Der letzte Analysepunkt war die Direktanalyse von Kolonien oder Kolonie-Pools auf BAT-A nach 8 Tagen. Durch die Definition dieser Analysezeitpunkte konnte innerhalb der Anreicherung eine Art Wachstums-Monitoring betrieben werden. Das wiederum erlaubt Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten von *Alicyclobacillus* spp. in natürlich kontaminierten Probenmatrices.

8.2.7. Methoden zur (schnellen) Extraktion von DNA aus verschiedenen Matrices

8.2.7.1. Extraktion von Gesamtzell-DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Extraktion von Gesamtzell-DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgte nach Newman *et al* (1990). Ein Algenpellet (Zellen entsprechend 150 µg Chlorophyll) wurde in 300 µL TEN-Puffer¹⁷ resuspendiert. Dieser Suspension wurden 40 µL 20% SDS (w/v), 40 µL 20% Laurylsarcosyl (w/v) und 30 µL Pronase zugegeben. Durch 10 minütiges Invertieren erfolgte die Zelllyse. Nach Zugabe von 650 µL PCI¹⁸ wurde die Mischung für 5 Minuten vorsichtig geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation (16000 g, RT) wurde die klare obere Phase in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut einem PCI-Fällungsschritt unterzogen. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol (100%, -20°C) gefällt (invertieren, Inkubation bei -20°C für 30 Minuten). Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde die denaturierte DNA 2-mal mit 800 µL 70%igen Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 300 µL TE-Puffer¹⁹ gelöst. Anschließend wurde der DNA-haltigen Lösung

¹⁷ **TEN-Puffer:** 50mM EDTA; 20mM Tris; 0,1M NaCl; pH 8.0

¹⁸ **PCI:** Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 25:24:1

¹⁹ **TE-Puffer:** 10mM Tris; 10mM EDTA; pH 8.0

30 µL Ammoniumacetat (3M) und 30 µL Magnesiumchlorid (3M) zugegeben. Danach wurde die DNA erneut mit 100%igem Ethanol gefällt und 2x mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde final in destilliertem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der DNA-Reinheit erfolgte mittels Nanodrop.

8.2.7.2. Extraktion humaner gDNA aus Blut

Die Extraktion humaner DNA aus Blut wurde mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit erfolgte mit Hilfe des Nanodrop.

8.2.7.3. Aufkochen / *boiling-method*

Eine sehr einfache Form der Probenvorbereitung ist das „Aufkochen“ (adaptiert nach Queipo *et al.*, 2008). Dabei wird ein Aliquot einer (ankonzentrierten) Kultur, oder Zellmaterial von Festmedium in einem geringen Volumen ddH₂O resuspendiert und 2-10 min bei >90°C inkubiert (Thermocycler, Thermoblock). Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (1 min, RT, > 6000 g) wird ein Aliquot aus dem Überstand der Probe in den PCR-Mastermix gegeben.

8.2.7.4. ETNA DNA-Extraktion

Die ETNA-Extraktion ist eine schnelle, einfache und preisgünstige Methode um DNA aus Hefen und grampositiven Bakterien zu isolieren. Sie beruht auf einer alkalischen Lyse und schnellen DNA-Fällung. Die Abarbeitung erfolgte gemäß Vingataramin und Frost (2015).

8.2.7.5. Probenvorbereitung mit Chelex-100

Diese einfache Probenvorbereitung basiert auf der Nutzung des Resins Chelex-100. Diese Komponente wird häufig genutzt um divalente Kationen zu binden, DNasen zu inhibieren und potentielle Inhibitoren für folgende Amplifikationen zurückzuhalten. Die in dieser Arbeit verwendete *quick & dirty* Extraktionsmethode wurde gemäß Cao *et al.* (2009) genutzt.

8.2.7.6. EDTA-basierte Probenvorbereitung

Die Nutzung des EDTA-Extraktionspuffers (10 mM EDTA) war die Grundlage für eine weitere genutzte einfache Probenvorbereitung. Die Abarbeitung erfolgte gemäß Wan *et al.* (2011).

8.2.8. Erstellung von Grafiken

In dieser Arbeit wurden alle Grafiken eigenständig unter Zuhilfenahme des Programmnes Affinity Designer erstellt. Einige Grafikelemente wurde der Online Plattform www.BioRender.com entnommen. Hierzu zählen die Abbildungen: 1, 2, 5, 14, 26, 68.

8.3. zusätzliche Ergebnisse

8.3.1. Validierung eines NALFIAs zum Nachweis von *Alicyclobacillus* aus Fruchtsaftkonzentraten

Tabelle 25.1 – Ergebnisübersicht der Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140 (Teil 1). Die Bestätigungsanalytik setzt sich aus enzymatischem Test auf die Fähigkeit der Guaiacol-Bildung, sowie Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS bzw. Sequenzierung eines 16S-Gen-spezifischen Amplifikates. Die Proben wurden vor Anreicherung, nach 2d, 3d und 5d mittels NALFIA untersucht (positives Testergebnis [„pos.“ / „+“], negatives Testergebnis [„neg.“ / „-“], nicht analysiert [n.a.]). Dabei werden die NALFIA-assoziierten Ergebnisse in den Nachweis auf *Alicyclobacillus* spp. („acb“), auf *Alicyclobacillus acidoterrestris* („aat“) und auf Guaiacol-bildende *Alicyclobacillus* spp. („gp“) unterteilt.

Informationen Probenstet			Kultivierung (gemäß IFU No.12) und Bestätigungsanalytik				NALFIA											
Nr.	Matrix	filtrierbar	IFU No. 12	Guaiacol	MALDI	16S-Seq.	nach 0d			nach 2d			nach 3d			nach 5d		
							acb	aat	gp	acb	aat	gp	acb	aat	gp	acb	aat	gp
1	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-	+	-	-
2	Mehrfrucht Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	-	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-
3	Birnsaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+
4	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
5	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	<i>A. sendaiensis</i>	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-
6	Pfirsich Püree	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Orangensaft Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
8	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10	Orangensaft Konzentrat	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
11	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
12	Apfelsaft Konzentrat	nein	pos.	neg.	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-
13	Smoothie	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-
14	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	-	-	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
15	Orangensaft Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Smoothie	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	-	-	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
17	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	-	-	-	+	-	-	+	-	-
18	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	pos.	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Mehrfrucht Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
20	Apfelsaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
22	Apfelsaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Orangensaft Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
24	Orangensaft Konzentrat	nein	pos.	neg.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	Orangensaft Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 25.2 – Ergebnisübersicht der Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140 (Teil 2). Die Bestätigungsanalytik setzt sich aus enzymatischem Test auf die Fähigkeit der Guaiacol-Bildung, sowie Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS bzw. Sequenzierung eines 16S-Gen-spezifischen Amplifikates. Die Proben wurden vor Anreicherung, nach 2d, 3d und 5d mittels NALFIA untersucht (positives Testergebnis [„pos.“ / „+“], negatives Testergebnis [„neg.“ / „-“], nicht analysiert [n.a.]). Dabei werden die NALFIA-assoziierten Ergebnisse in den Nachweis auf *Alicyclobacillus* spp. („acb“), auf *Alicyclobacillus acidoterrestris* („aat“) und auf Guaiacol-bildende *Alicyclobacillus* spp. („gp“) unterteilt.

Informationen Probenstet			Kultivierung (gemäß IFU No.12) und Bestätigungsanalytik				NALFIA											
Nr.	Matrix	filtrierbar	IFU No. 12	Guaiacol	MALDI	16S-Seq.	nach 0d			nach 2d			nach 3d			nach 5d		
							acb	aat	gp	acb	aat	gp	acb	aat	gp	acb	aat	gp
26	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
27	Pfirsichsaft Konzentrat	yes	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
28	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	+	-	-	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-
29	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-	+	-	-
31	Orangensaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+
33	Pfirsichpüree	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
34	Mehrfrucht Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
35	Pfirsichpüree	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-
36	Apfelsaft Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
37	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
38	Apfelsaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	Apfelsaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	Apfelsaft Konzentrat	nein	pos.	pos.	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
42	Smoothie	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	-	-
43	Apfelsaft Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-
44	Smoothie	ja	pos.	pos.	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	Apfelsaft Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
46	Mehrfrucht Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-	-	n.a.	n.a.
47	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-	+	-	-
48	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	+	-	-	+	-	-	+	-	-
49	Mehrfrucht Konzentrat	nein	pos.	pos.	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	Birnensaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 25.3 – Ergebnisübersicht der Vergleichsuntersuchung gemäß DIN EN ISO 16140 (Teil 3). Die Bestätigungsanalytik setzt sich aus enzymatischem Test auf die Fähigkeit der Guaiacol-Bildung, sowie Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS bzw. Sequenzierung eines 16S-Gen-spezifischen Amplifikates. Die Proben wurden vor Anreicherung, nach 2d, 3d und 5d mittels NALFIA untersucht (positives Testergebnis [„pos.“ / „+“], negatives Testergebnis [„neg.“ / „-“], nicht analysiert [n.a.]). Dabei werden die NALFIA-assoziierten Ergebnisse in den Nachweis auf *Alicyclobacillus* spp. („acb“), auf *Alicyclobacillus acidoterrestris* („aat“) und auf Guaiacol-bildende *Alicyclobacillus* spp. („gp“) unterteilt.

Informationen Probenstet			Kultivierung (gemäß IFU No.12) und Bestätigungsanalytik				NALFIA											
Nr.	Matrix	filtrierbar	IFU No. 12	Guaiacol	MALDI	16S-Seq.	nach 0d			nach 2d			nach 3d			nach 5d		
							acb	aat	gp	acb	aat	gp	acb	aat	gp	acb	aat	gp
51	Smoothie	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
52	Birnensaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53	Birnensaft Konzentrat	ja	pos.	neg.	n.d.	<i>A. acidocaldarius</i>	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	-	-
54	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
55	Orangensaft Konzentrat	nein	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
56	Apfelsaft Konzentrat	ja	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
58	Apfelsaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
59	Apfelsaft Konzentrat	nein	pos.	pos.	<i>A. acidoterrestris</i>	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	Birnensaft Konzentrat	ja	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	+	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.

Tabelle 26.1 und 26.2 – Ergebnisübersicht zu den Versuchen zur Inklusivität und Exklusivität des NALFIAs zum Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. (positives Testergebnis [„pos.“], negatives Testergebnis [„neg.“], nicht analysiert [n.a.]). Dabei werden die NALFIA-assoziierten Ergebnisse in den Nachweis auf *Alicyclobacillus* spp. („acb“), auf *Alicyclobacillus acidoterrestris* („aat“) und auf Guaiacol-bildende *Alicyclobacillus* spp. („gp“) unterteilt.

Inklusivität				
Organismus	Beschreibung	acb	gp	aat
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025	Typstamm	pos.	pos.	pos.
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> NCIMB 11725	Typstamm	pos.	neg.	neg.
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> DSM 14558	Typstamm	pos.	pos.	neg.
<i>Alicyclobacillus herbarius</i> DSM 13609	Typstamm	pos.	pos.	neg.
<i>Alicyclobacillus pomorum</i> DSM 14995	Typstamm	pos.	neg.	neg.
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i> DSM 17978	Typstamm	pos.	neg.	neg.
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> DSM 49028	Typstamm	pos.	(pos.)	neg.
25 x <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Praxisisolat	pos.	pos.	pos.
13 x <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	Praxisisolat	pos.	neg.	neg.

Exklusivität				
Organismus	Beschreibung	acb	gp	aat
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	Typstamm	neg.	n.a.	n.a.
<i>Bacillus coagulans</i> DSM 1	Typstamm	neg.	n.a.	n.a.
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36	Typstamm	(pos.)	n.a.	n.a.
<i>Bacillus cereus</i>	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.
<i>Bacillus subtilis</i>	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.
<i>Enterococcus</i> sp.	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.
<i>Enterobacter</i> sp.	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.
<i>Lactobacillus brevis</i>	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.
<i>Pseudomonas</i> sp.	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.
<i>Lactococcus lactis</i>	Praxisisolat	neg.	n.a.	n.a.

Tabelle 27 – Ergebnisübersicht zu einer orientierenden Vergleichsanalyse zwischen Nachweis via Kultivierung gemäß „IFU No. 12“, einer adaptierten (verkürzten) Kultivierungsvorschrift („Kultur 3d“), NALFIA (Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. [„acb“], sowie *A. acidoterrestris* [„aat“] und Guaiacol-bildenden *Alicyclobacillus* spp. [„gp“]) und einer kommerziellen qPCR-Analyse (GeneDisc® Technologies For the Rapid Detection and Identification of TAB Spoilage, PALL Corporation) bei der auf den Anwesenheit von *Alicyclobacillus* spp. („acb“), *A. acidoterrestris* („aat“), *A. acidiphilus* („aap“), *A. cycloheptanicus* („ach“) und *A. herbarius* („ahb“).

Nr.	Matrix	IFU No. 12	Kultur 3d*	NALFIA		Pall (qPCR), C _t				
				acb	aat / gp	acb	aat	aap	ach	ahb
1	Mehrfruchtsaftkonzentrat	pos.	pos.	(pos.)	neg.	27,9	neg.	neg.	neg.	neg.
2	Orangensaft Konzentrat	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3	Smoothie (Stückchen)	pos.	pos.	pos.	neg.	14,2	neg.	neg.	neg.	neg.
4	Apfelsaft Konzentrat	pos.	pos.	pos.	neg.	14,8	neg.	neg.	neg.	neg.
5	Smoothie	pos.	pos.	pos.	neg.	21,6	neg.	neg.	neg.	neg.
6	Orangensaft Konzentrat	pos.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
7	Smoothie	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
8	Fruchtsaft Konzentrat	pos.	pos.	pos.	neg.	16,8	neg.	neg.	neg.	neg.
9	Apfelsaft Konzentrat	pos.	neg.	neg.	neg.	34,9	neg.	neg.	neg.	neg.
10	Apfelsaft Konzentrat	pos.	pos.	pos.	pos.	12	11,8	28,5	neg.	neg.
11	Orangensaft Konzentrat	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
12	Orangensaft Konzentrat	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
13	Orangensaft Konzentrat	pos.	pos.	pos.	pos.	13	12,7	28,2	neg.	neg.
14	Birnenpüree	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	37,3	neg.	neg.	neg.
15	Orangensaft Konzentrat	pos.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
16	Mehrfruchtsaft Konzentrat	neg.	pos.	pos.	neg.	15,2	neg.	neg.	neg.	neg.
17	Apfelsaft Konzentrat	pos.	pos.	pos.	neg.	16,3	neg.	neg.	neg.	neg.
18	Apfelsaft Konzentrat	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
19	Smoothie	neg.	pos.	pos.	neg.	21,7	neg.	neg.	neg.	neg.
20	Smoothie	neg.	pos. (1 KBE)	(pos.)	neg.	27,7	neg.	neg.	neg.	neg.

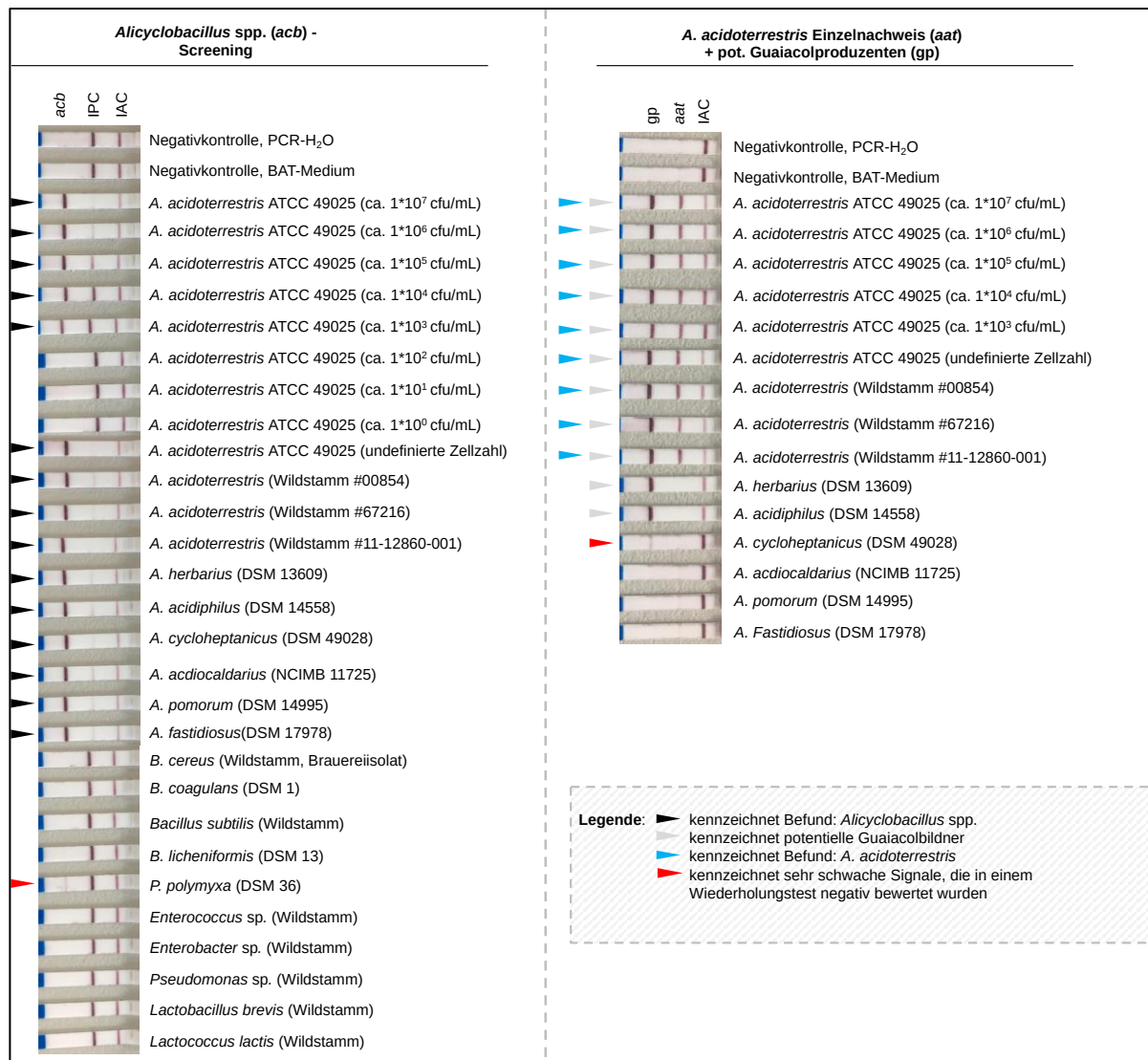


Abbildung 73 - Nachweis Performance des kommerziellen NALFIAs zum Nachweis von Alicyclobacillus spp. aus Fruchtsaftkonzentraten. Diese Übersicht beinhaltet repräsentative Analysen zur Sensitivität und Spezifität (Inklusivität und Exklusivität). Signal für den Nachweis von Alicyclobacillus spp. („acb“), A. acidoterrestris („aat“) und Guaiacol-bildende Alicyclobacillus spp. („gp“) und für die Funktionalität der PCR (interne PCR-Kontrolle „IPC“), für die Funktionalität des LFDs (Immunoassay-Kontrolle „IAC“).

8.3.2. Zusatz: Identifikation relevanter bierschädigender Bakterien (*singleplex* PCR und post PCR-Hybridisierung)

Tabelle 28 - Einfluss der Faltungshelfer auf die Hybridisierungseffizienz beim Nachweis sieben relevanter Bierschädiger. Jede mögliche Helferkombination wurde in mindestens 3 unabhängigen Versuchen überprüft. Die abgebildeten Zahlenwerte entsprechen der relativen Signalintensität (RSI) der jeweiligen T-Linie. Dabei wurde für jeden Test, die Signalstärke der Hybridisierungen ohne Helfer als Referenz genutzt.

Helfer-kombi.	<i>L. brevis</i> (RSI)	<i>L. lindneri</i> (RSI)	<i>L. backi</i> (RSI)	<i>L. collinoides</i> (RSI)	<i>P. damnosus</i> (RSI)	<i>L. rossiae</i> (RSI)	<i>L. casei</i> (RSI)
-H	100,0 ± 33,9	100,0 ± 6,7	100,0 ± 21,7	100,0 ± 20,9	100,0 ± 2,7	100,0 ± 9,5	100,0 ± 11,3
H1	168,6 ± 6,1	127,3 ± 2,8	226,2 ± 33,1	124,0 ± 3,5	131,6 ± 5,2	125,1 ± 4,7	101,2 ± 8,1
H2	126,3 ± 9,7	107,4 ± 7,8	283,5 ± 32,3	130,9 ± 23,7	203,8 ± 11,0	80,2 ± 5,4	100,1 ± 5,4
H3	162,7 ± 1,6	159,7 ± 7,4	427,0 ± 50,7	59,1 ± 15,2	140,1 ± 4,5	89,0 ± 31,8	69,6 ± 12,2
H4	173,7 ± 27,8	145,2 ± 4,8	395,9 ± 43,5	76,9 ± 16,7	68,7 ± 7,7	108,1 ± 18,8	134,1 ± 13,6
H1,2	152,4 ± 20,4	118,0 ± 5,1	294,2 ± 57,8	132,7 ± 40,3	199,2 ± 11,1	73,6 ± 13,0	71,6 ± 7,1
H1,3	184,2 ± 10,3	163,7 ± 8,0	407,9 ± 63,5	130,9 ± 41,0	186,1 ± 0,9	119,1 ± 6,8	75,4 ± 13,3
H1,4	201,6 ± 11,3	142,6 ± 13,7	363,5 ± 24,4	101,6 ± 31,4	104,9 ± 2,9	136,2 ± 2,2	126,6 ± 4,9
H2,3	176,8 ± 4,7	137,3 ± 2,6	363,8 ± 40,9	251,3 ± 24,3	231,1 ± 10,1	112,6 ± 3,4	91,4 ± 16,2
H2,4	201,2 ± 28,0	147,7 ± 7,5	568,9 ± 24,5	263,0 ± 17,5	208,6 ± 12,7	104,9 ± 6,2	161,2 ± 15,9
H3,4	218,7 ± 44,7	172,4 ± 2,8	766,5 ± 134,5	193,5 ± 23,8	158,8 ± 22,5	129,8 ± 7,5	154,4 ± 20,6
H1,2,3	166,0 ± 45,4	145,9 ± 13,0	450,1 ± 102,4	114,5 ± 32,5	131,8 ± 47,2	94,9 ± 8,9	83,7 ± 10,9
H1,2,4	179,2 ± 13,0	142,5 ± 16,7	577,0 ± 78,0	96,6 ± 32,7	170,7 ± 26,6	76,4 ± 12,5	123,6 ± 33,0
H1,3,4	215,9 ± 18,6	188,6 ± 7,4	885,1 ± 37,3	126,6 ± 45,2	191,6 ± 10,8	122,5 ± 11,1	144,4 ± 39,3
H2,3,4	226,1 ± 8,1	156,0 ± 6,0	785,8 ± 33,6	188,5 ± 38,3	230,1 ± 16,3	123,3 ± 3,6	138,0 ± 35,2
H1,2,3,4	223,0 ± 3,5	161,9 ± 8,3	802,0 ± 57,7	127,2 ± 34,5	207,5 ± 6,7	119,8 ± 2,1	110,6 ± 30,2

	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Lbr</i>		H2	p	H3	
<i>Lli</i>	H1		p	H3	H4
<i>Lba</i>	H1		H3	p	H4
<i>Lpco</i>		p	H2		H4
<i>Pda</i>		p	H2	H3	
<i>Lro</i>	H1		p		H4
<i>Lca</i>		H2		p	H4

Abbildung 74 - Positionierung der verwendeten Helfer für die Identifikationstests. R1 bis R5 stehen für die Regionen 1-5, in die das 124 bp große PCR-Produkt unterteilt werden kann. Die hellgrauen Kästchen symbolisieren die jeweils verwendeten Helfer (H1-H4) und die dunkelgrauen Kästchen symbolisieren die jeweiligen Sondenbindestellen (p) in den gekennzeichneten Bereichen des PCR-Produktes. Die gepunkteten Kästchen symbolisieren Regionen, die weder durch Helfer, noch durch Sonde hybridisiert werden.

Tabelle 29 – Ergebnisübersicht zur Vergleichsanalyse „Identifikation bierschädigender Bakterien“ an Praxisproben. Dabei wurde an Anreicherungen in NBB-B® mittels ETNA-Extraktion DNA „isoliert“. Originalproben entstammen Voranreicherungen aus drei verschiedenen Großbrauereien. Zwei PCRs wurden durchgeführt (1. *singleplex* PCR für den Identifikationsnachweis relevanter bierschädigender *Lactobacillus* spp. und *Pediococcus* spp., 2. *singleplex* PCR zur Amplifikation eines 23S-spezifischen Produkts). Das 23S-spezifische PCR-Produkt wurde via AGE überprüft, aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die daraus resultierende Sequenz wurde mit Hilfe des NCBI Blast® *tools* analysiert, sodass eine Speziesidentifikation vorgenommen werden konnte. Das PCR-Produkt aus dem Identifikationsnachweis wurde via Agarosegelelektrophorese (AGE) überprüft und mit den verschiedenen Hybridisierungscocktails zur Speziesidentifikation inkubiert und anschließend via Lateral Flow Analyse überprüft. Die Ergebnisse aus NALFIA und Sequenzierung wurden in dieser Tabelle gegenüber gestellt.

Nr.	NCBI BLAST Ergebnis			AGE	NALFIA (LBPC-Ident)	
	Speziesidentifikation	query cover [%]	identity [%]		Ergebnis	Nebenreaktion
1	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	100	+	<i>L. brevis</i>	
2	<i>Lactobacillus rossiae</i>	99	96,58	+	<i>L. rossiae</i>	
3	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	100	+	<i>L. brevis</i>	
4	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	100	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
5	<i>Lactobacillus rossiae</i>	99	96,58	+	<i>L. rossiae</i>	
6	<i>Lactobacillus backii</i>	99	99,5	-	neg.	
7	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	100	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
8	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	100	+	<i>L. brevis</i>	
9	<i>Leuconostoc citreum</i>	99	100	-	neg.	
10	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	100	+	<i>L. brevis</i>	
11	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	100	+	<i>L. brevis</i>	
12	<i>Leuconostoc citreum</i>	99	100	-	neg.	
13	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	100	+	<i>L. brevis</i>	
14	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	99	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
15	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	99	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
16	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	99	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
17	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	99	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
18	<i>Leuconostoc citreum</i>	99	100	-	neg.	
19	<i>Lactobacillus backii</i>	100	99,26	+/-	<i>L. backii</i>	
20	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	100	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
21	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	100	100	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
22	<i>Lactobacillus backii</i>	100	99,74	+/-	<i>L. backii</i>	
23	<i>Lactobacillus backii</i>	100	99,75	(+)	<i>L. backii</i>	
24	<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	99	99,75	+	<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>

8.3.3. Zusatz: Nachweis viraler Karpfenpathogene (*duplex PCR und post PCR-Hybridisierung*)

8.3.3.1. KHV-Nachweis

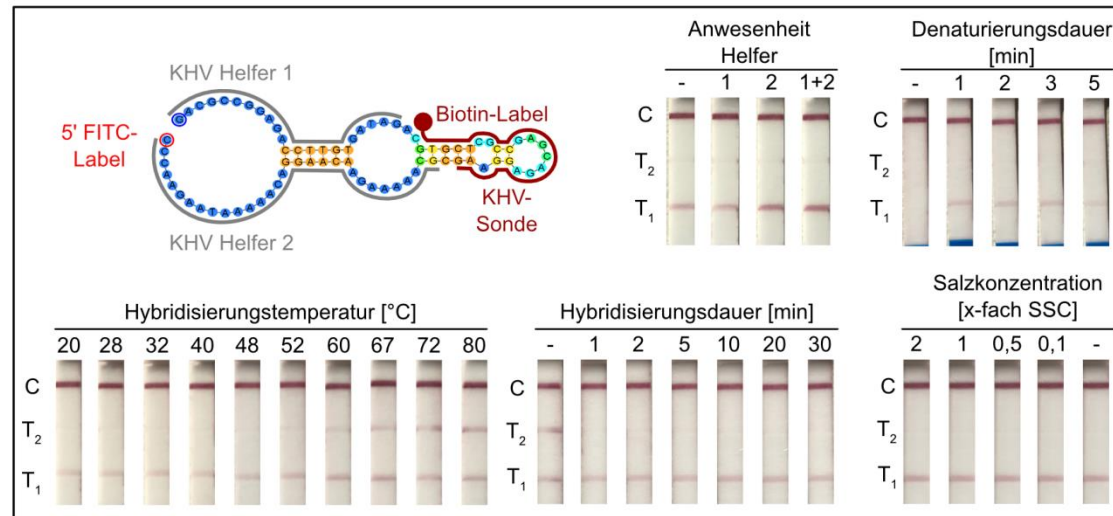


Abbildung 75– Optimierung der Hybridisierungsreaktion für den KHV-Nachweis. Die Sekundärstruktur des zu hybridisierenden PCR-Produktes (Einzelstrang), sowie die Helfer- und Sondenbindestellen sind dargestellt. Die Sekundärstruktur wurde mit nach Matthews *et al.* (2004) bei 60°C errechnet. Experimentell wurde der Einfluss der Anwesenheit der Helfer (10 pmol je Hybridisierung), der Denaturierungsdauer, Hybridisierungsdauer und –temperatur, sowie der Salzkonzentration untersucht. Standard-Hybridisierungsparameter wurde wie folgt definiert: Denaturierung – 60 sek bei 95°C; Hybridisierung 300 sek bei 50°C; LFA mittels MGH2 im Thermocycler bei 50°C; Sondenkonzentration (KHV 109p (rc) Biotin): 1 pmol je Hybridisierung; Salzkonzentration: 2xSSC; Volumen: 50 µL je Hybridisierung. Dokumentation der Streifen erfolgte nach 300 sek LFA.

Tabelle 30 – Ergebnistabelle zur Vergleichsuntersuchung von NALFIA und qRT-PCR zum Nachweis des Cyprinid Herpesvirus-3. Diese Tabelle ist die Grundlage für die Übersichtstabelle im Ergebnisteil mit den dazugehörigen errechneten statistischen Parametern.

Organ	Fisch-ID	NALFIA						qRT-PCR			
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	C _t #1	C _t #2	C _t #3	Genkopien / µL
Kieme	UI-36-Ki	pos.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	38,47	38,4	7,19E+00
Kieme	UI-37-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	33,48	33,45	33,3	2,16E+02
Kieme	UI-41-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	39,25	37,35	38,57	8,53E+00
Kieme	UI-44-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	36,45	36,13	37,68	2,45E+01
Kieme	UI-45-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	33,46	33,19	32,88	2,55E+02
Niere	IA-43-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	36,81	38,01	36,45	1,95E+01
Niere	IB-44-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	36,41	37,04	37,84	1,91E+01
Niere	IA-57-Ni	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	38,19	38,56	neg.	7,54E+00
Niere	IB-50-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	38,6	37,03	37,75	1,21E+01
Niere	IB-48-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	31,69	31,71	31,51	7,16E+02
Kieme	IA-7-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	29,36	29,39	29,25	3,65E+03
Kieme	IA-33-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	26,89	27,02	27,17	1,78E+04
Kieme	IA-44-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	28,21	27,71	27,39	1,09E+04
Kieme	IB-35-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	33,6	34,14	33,86	1,65E+02
Kieme	IB-38-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	30,56	30,63	30,54	1,51E+03
Niere	IA-39-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	30,54	30,98	30,68	1,41E+03
Niere	IA-26-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	30,42	30,42	30,96	1,34E+03
Niere	IB-32-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	32,33	32,62	32,55	4,17E+02
Niere	UI-35-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	34,88	34,49	35,27	8,32E+01
Niere	IB-55-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	32,18	32,25	31,69	4,43E+02
Kieme	IA-8-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	23,37	23,19	23,15	1,82E+05
Kieme	IA-10-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	26,22	26,35	26,2	2,40E+04
Kieme	IA-12-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	19,84	19,76	20,03	1,73E+06
Kieme	IA-27-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	27,41	27,49	27,34	1,11E+04
Kieme	IA-28-Ki	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	25,24	25,21	25,15	4,87E+04
Niere	IA-7-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	33,54	33,66	33,58	1,75E+02
Niere	IA-8-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	27,22	27,23	27,54	1,17E+04
Niere	IA-11-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	32,9	33,42	33,04	2,43E+02
Niere	IA-16-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	28,27	27,93	28,24	6,78E+03
Niere	IA-17-Ni	pos.	pos.	pos.	n.a.	n.a.	n.a.	26,31	26,91	26,94	1,79E+04
Kieme	D08-Ki	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Kieme	D10-Ki	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Kieme	D13-Ki	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	38,37	neg.	neg.	7,63+00
Kieme	D14-Ki	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Kieme	D15-Ki	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Niere	D08-Ni	pos.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Niere	D09-Ni	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Niere	D10-Ni	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Niere	D13-Ni	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.
Niere	D14-Ni	neg.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.

Tabelle 31 - Ergebnisse und statistische Kennwerte aus der Vergleichsuntersuchung zum Nachweis von KHV. Aufgeführt sind positive Übereinstimmungen (PA), negative Übereinstimmungen (NA), positive Abweichungen (PD) und negative Abweichungen (ND). Errechnet wurde neben der diagnostischen Sensitivität und Spezifität, auch der Konkordanzindex.

Organ	Methode	PA	NA	PD	ND	diagn. Sens.	diagn. Spez.	Konkordanz-index
Kieme	qRT-PCR	44	14	1	1	97,8	93,3	0,91
	PCR-LFA	43	15	0	2	100,0	88,2	0,98
Niere	qRT-PCR	44	15	0	1	100,0	93,8	0,99
	PCR-LFA	42	14	1	3	97,7	82,4	0,89
Kieme & Kieme	qRT-PCR	88	29	1	2	98,9	93,5	0,95
	PCR-LFA	85	29	1	5	98,8	85,3	0,93

8.3.3.2. CEV-Nachweis

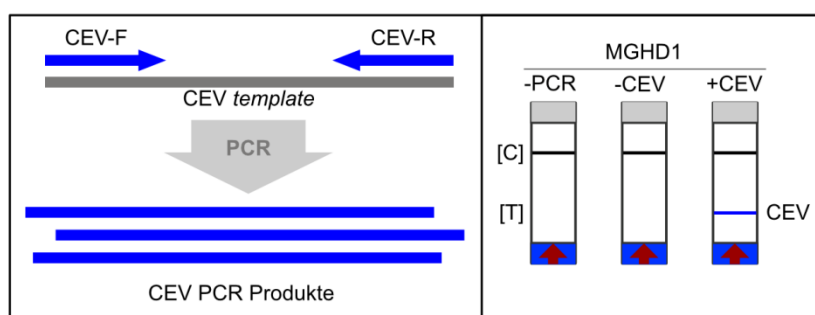


Abbildung 76 – CEV-Nachweisstrategie *singleplex* PCR. Blaue Pfeile symbolisieren die markierten Primer. Das daraus entstehende beidseitig markierte PCR-Produkt ist auf dem Universalteststreifen MGHD auf Höhe der Testlinie detektierbar.

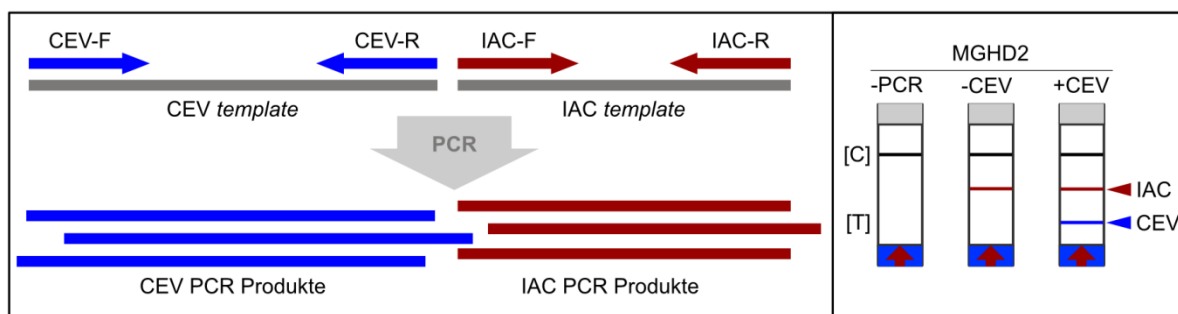


Abbildung 77 – CEV-Nachweisstrategie: *duplex* PCR. Blaue Pfeile symbolisieren markierte CEV-Nachweisprimer. Rote Pfeile symbolisieren markierte IAC-Kontrollprimer. Die unterschiedlich, beidseitig markierten PCR-Produkte sind auf Höhe der T1 (CEV-PCR-Produkt) und auf Höhe der T2 (IAC-PCR-Produkt) auf dem Universalteststreifen MGHD2 detektierbar.

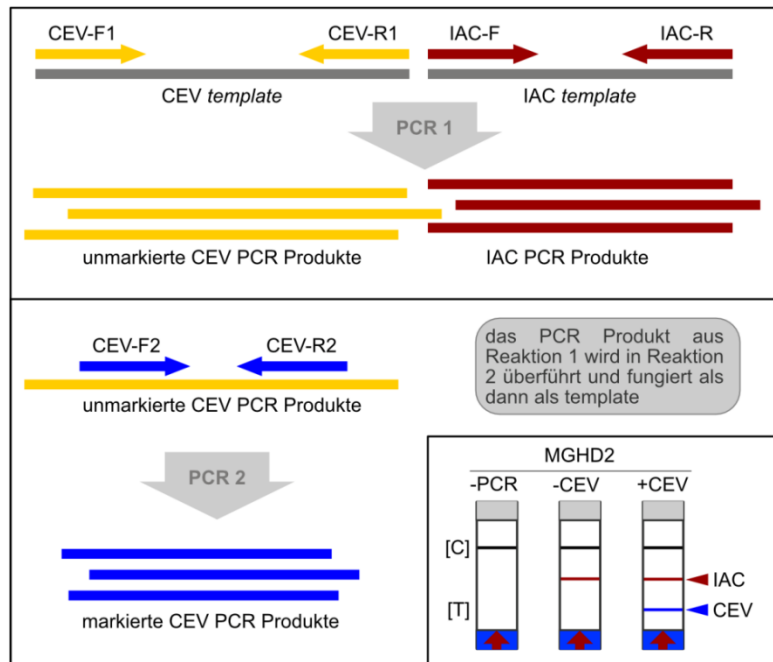


Abbildung 78 - CEV-Nachweisstrategie: duplex, nested PCR. Gelbe Pfeile symbolisieren nicht-markierte CEV-Nachweisprimer. Blaue Pfeile symbolisieren markierte CEV-Nachweisprimer. Rote Pfeile symbolisieren markierte IAC-Kontrollprimer. Hier werden zwei nacheinander geschaltete PCRs durchgeführt, wobei in PCR 2 das Produkt aus PCR 1 gegeben wird. Die unterschiedlich, beidseitig markierten PCR-Produkte sind auf Höhe der T1 (CEV-PCR-Produkt) und auf Höhe der T2 (IAC-PCR-Produkt) auf dem Universalteststreifen MGHD2 detektierbar.

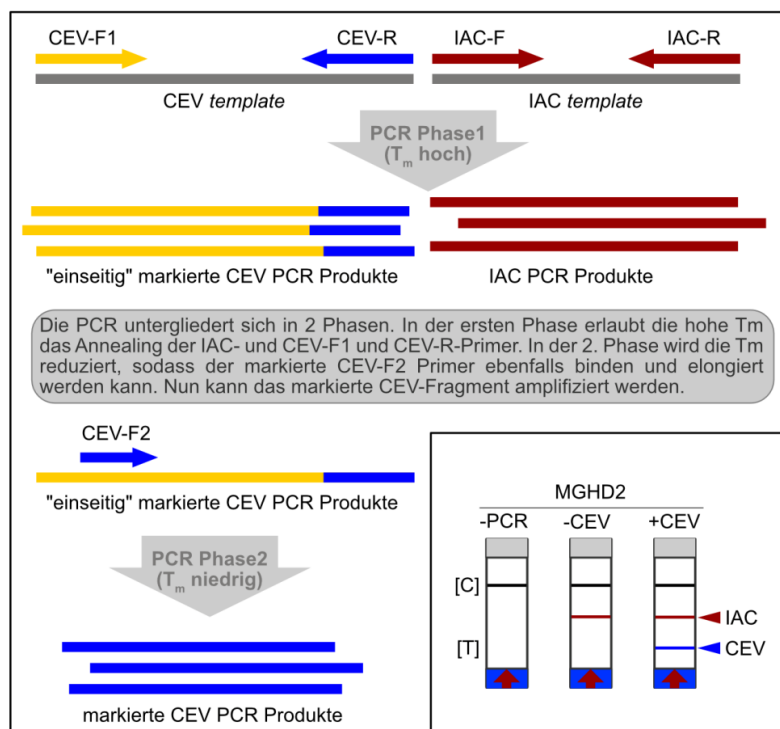


Abbildung 79 - CEV-Nachweisstrategie: *one pot*, semi nested PCR. Der gelbe Pfeil symbolisiert einen nicht-markierten CEV-Nachweisprimer. Blaue Pfeile symbolisieren markierte CEV-Nachweisprimer. Rote Pfeile symbolisieren markierte IAC-Kontrollprimer. Die Reaktion untergliedert sich in zwei Phasen, wobei in der ersten Phase bei erhöhter Annealingtemperatur lediglich IAC-Primer, CEV-Primer F1 (unmarkiert) und CEV-Primer-R (markiert) annealen. Erst in der zweiten Phase der Reaktion bei niedrigerer Annealingtemperatur kann der zweite markierte CEV-Primer F2 binden. Die unterschiedlich, beidseitig markierten PCR-Produkte sind auf Höhe der T1 (CEV-PCR-Produkt) und auf Höhe der T2 (IAC-PCR-Produkt) auf dem Universalteststreifen MGHD2 detektierbar.

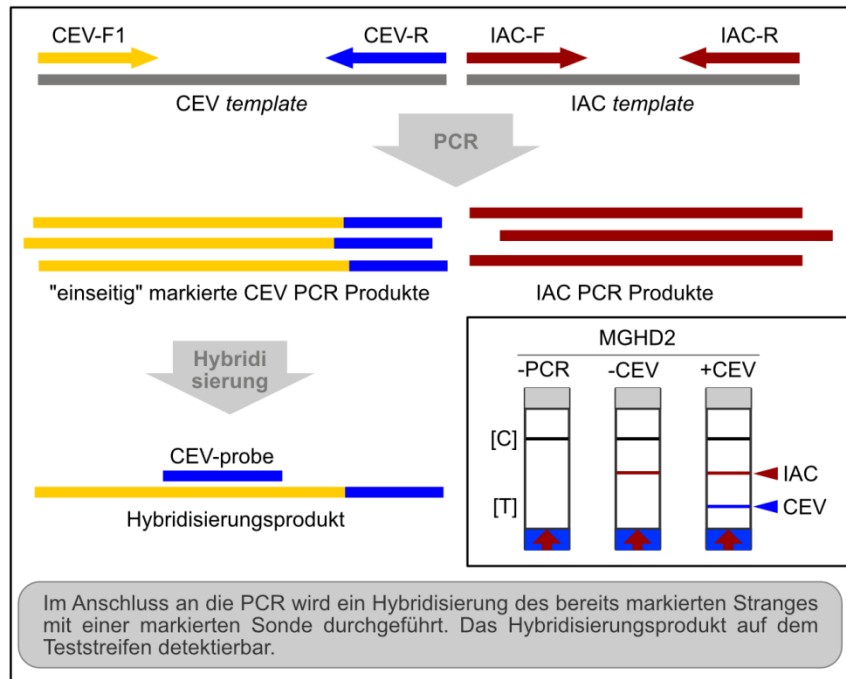


Abbildung 80 - CEV-Nachweisstrategie: *duplex* PCR mit post PCR-Hybridisierung. Der gelbe Pfeil symbolisiert einen nicht-markierten CEV-Nachweisprimer. Der blaue Pfeil symbolisiert den markierten CEV-Nachweisprimer. Rote Pfeile symbolisieren markierte IAC-Kontrollprimer. In der nachgeschalteten post PCR-Hybridisierung wird die markierte CEV-Amplikon-spezifische Sonde an das einseitig markierte PCR-Produkt hybridisiert. Die unterschiedlich, beidseitig markierten PCR-/Hybridisierungsprodukte sind auf Höhe der T1 (CEV-Hybridisierungsprodukt) und auf Höhe der T2 (IAC-PCR-Produkt) auf dem Universalteststreifen MGHD2 detektierbar.

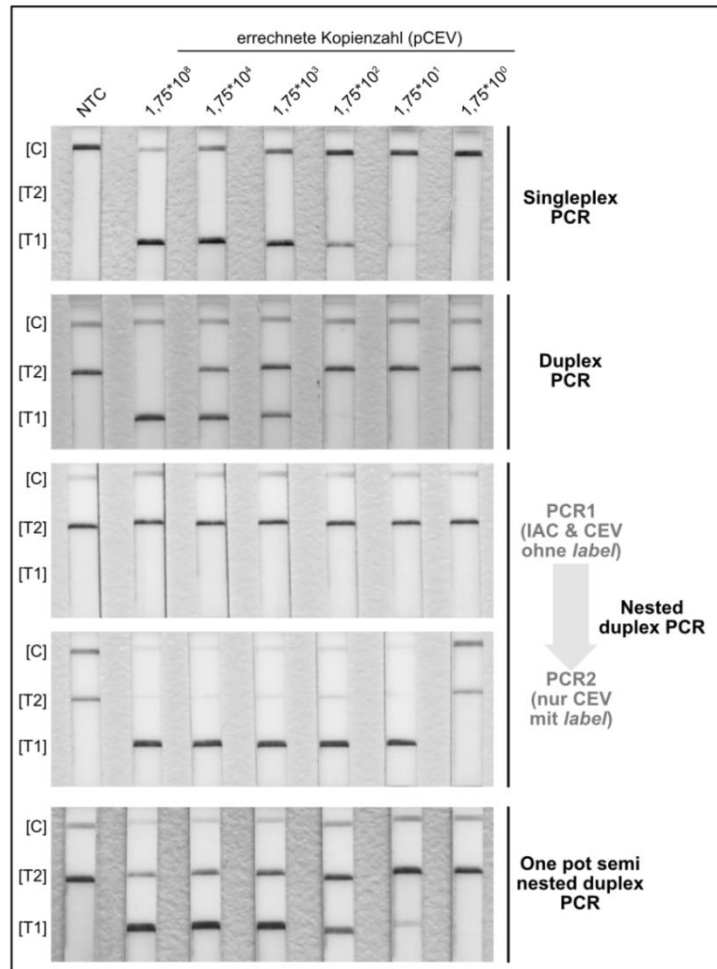


Abbildung 81 - Verschiedene Nachweisstrategien zur Detektion des Carp Edema Virus (CEV). Sensitivitätsanalyse mit Hilfe vier verschiedener Detektionsstrategien: *singleplex* PCR, *duplex* PCR mit interner Amplifikationskontrolle (T1 – CEV; T2 – IAC), *nested duplex* PCR mit interner Amplifikationskontrolle, einer *one pot semi nested duplex* PCR mit IAC. Der exakte Nachweismechanismus jeder Strategie ist im Anhang ausführlich erklärt.

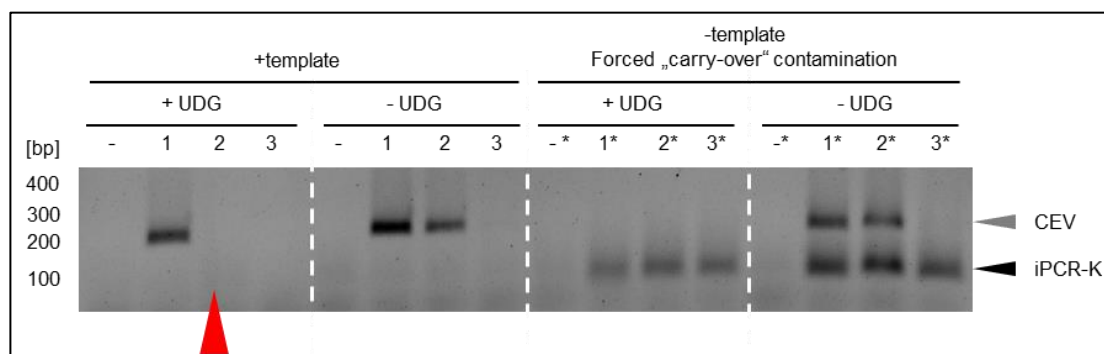


Abbildung 82 - Implementierung der Uracil-DNA-Glycosylase- ein Funktionalitätstest. [-] Negativkontrolle – PCR-H₂O, [1] 1*10⁻⁸ Verdünnung Kontrollplasmid pCEV, [2] 1*10⁻⁹ Verdünnung Kontrollplasmid pCEV, [3] 1*10⁻¹⁰ Verdünnung Kontrollplasmid pCEV, [*] forcierte „carry-over“ Kontamination aus Vorläuferreaktion [-,1,2,3] ohne direkte *template*-Zugabe.

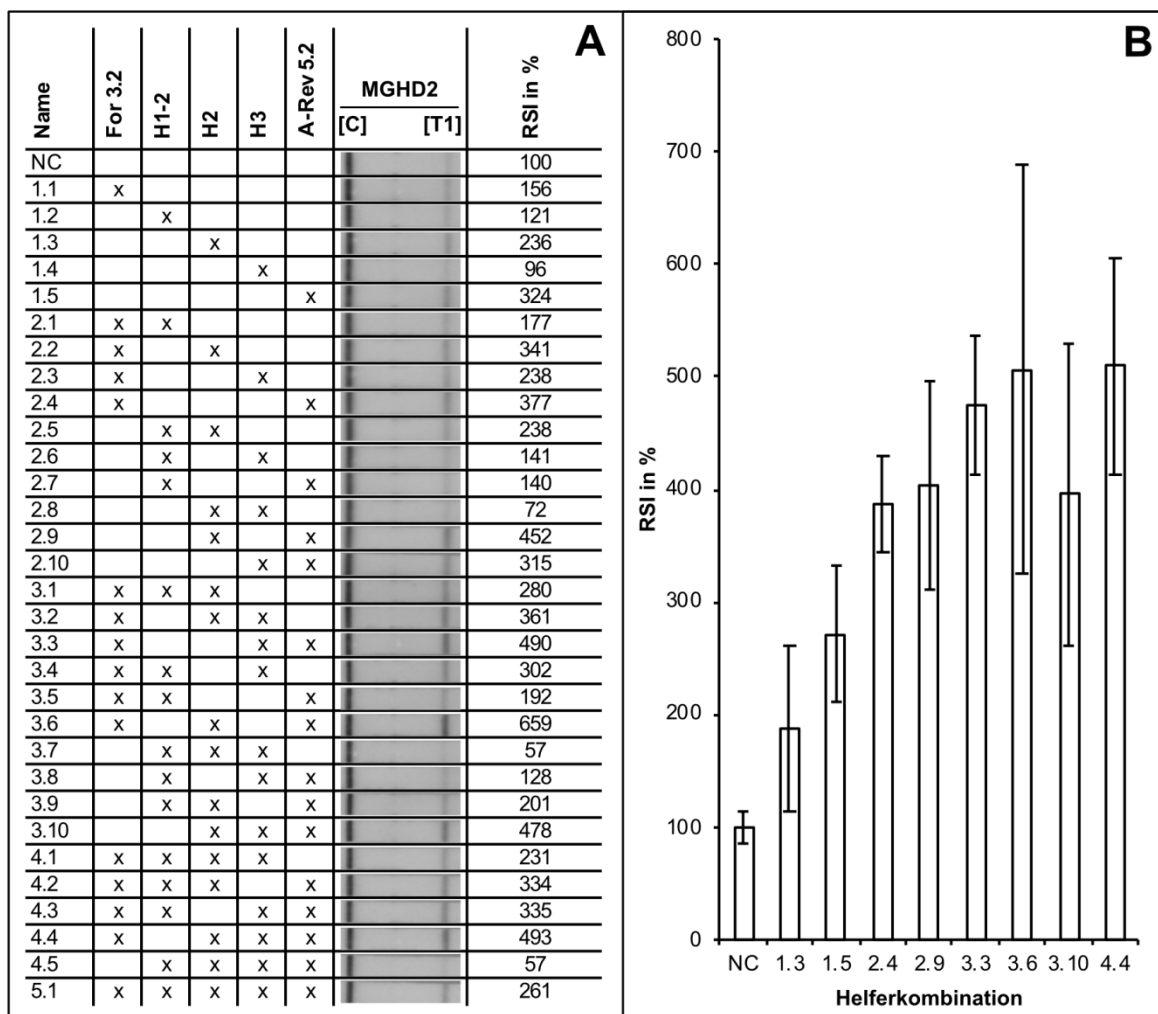


Abbildung 83 – Einfluss der Faltungshelfer auf die Nachweisbarkeit des CEV-PCR-Produktes B mit der Sonde: CEV probe 1 Biotin. **(A)** Fünf verschiedene Helfer wurden für diese Analyse genutzt und deren Einfluss in Einfachbestimmung auf die T-Linienintensität untersucht. Dargestellt ist die verwendete Helferkombination, das dazugehörige Bild des Teststreifens und der ermittelte Wert der relativen Signalintensität der T-Linie (RSI in %), wobei die Hybridisierungsreaktion ohne Helfer als Referenz (100%) betrachtet wurde. **(B)** Acht Helfer-Kombinationen wurden zusätzlich in Dreifachbestimmung untersucht und die Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

Tabelle 32 – Spezifitätsanalyse des CEV-Nachweis. Verwendet wurden isolierte Nukleinsäuren der untersuchten Organismen. Diese orientierende Analyse wurde in Einfachbestimmung durchgeführt.

Organismus / template	NALFIA-Ergebnis
Carp Edema Virus (CEV)	positiv
Koi Herpesvirus (KHV)	negativ
infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)	negativ
spring viremia of carp virus (SVCV)	negativ
viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)	negativ
pike fry rhabdovirus (PFRV)	negativ
Chlamydomonas reinhardtii	negativ
Francisella noatunensis subsp. orientalis	negativ
Bacillus cereus	negativ
Staphylococcus aureus	negativ
Pseudomonas koreensis	negativ
Aeromonas hydrophila	negativ

Tabelle 33 – Orientierende Sensitivitätsanalyse des CEV-Nachweis. Genutzt wurde ein Kontrollplasmid pCEV.

template	C _{template} (Kopien je µL)	NALFIA-Ergebnis
pCEV	ca. 6*10 ²	positiv (3/3)
pCEV	ca. 6*10 ¹	positiv (3/3)
pCEV	ca. 6*10 ⁰	positiv (2/3)
pCEV	ca. 6*10 ⁻¹	negativ (0/3)

Tabelle 34 – Orientierende Vergleichsuntersuchung des CEV-Nachweis mit der etablierten qPCR. Quantitative Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. C_t-Wert und sich daraus ergebende *template*-Konzentration wird als Mittelwert angegeben. NALFIA-Analysen wurden teilweise in Mehrfachbestimmung durchgeführt („positive Resultate / Gesamtanzahl der Analysen je Probe“). Verwendet wurde isolierte DNA aus Kiemenabstrichen einer CEV-positiven Karpfenpopulation. Die Proben wurden freundlicherweise von Landes-Umwelt-Amt Sachsen zur Verfügung gestellt.

Nr.	Proben-Bezeichnung	NALFIA-Ergebnis	C _t -Wert	C _{template} (Kopien / µL)
1	CEV-LUA 66214 Nr.1	positiv (1/1)	27,0	4,80E+04
2	CEV-LUA 66214 Nr.6	positiv (1/1)	25,7	9,60E+04
3	CEV-LUA 25327 Nr.7	positiv (3/6)	27,9	2,85E+04
4	CEV-LUA 25327 Nr.9	positiv (1/1)	29,0	1,57E+04
5	CEV-LUA 45807 Nr.2	positiv (1/1)	26,2	7,42E+04
6	CEV-LUA 15640 Nr.4	positiv (5/6)	28,1	2,63E+04
7	CEV-LUA 55918 Nr.1	negativ (0/6)	28,0	2,73E+04
8	CEV-LUA 25819 Nr.1	positiv (1/1)	24,7	1,70E+05
9	CEV-LUA 20512 Nr.1	positiv (3/6)	28,8	1,70E+04
10	CEV-LUA 20512 Nr.3	positiv (5/6)	29,3	1,30E+04

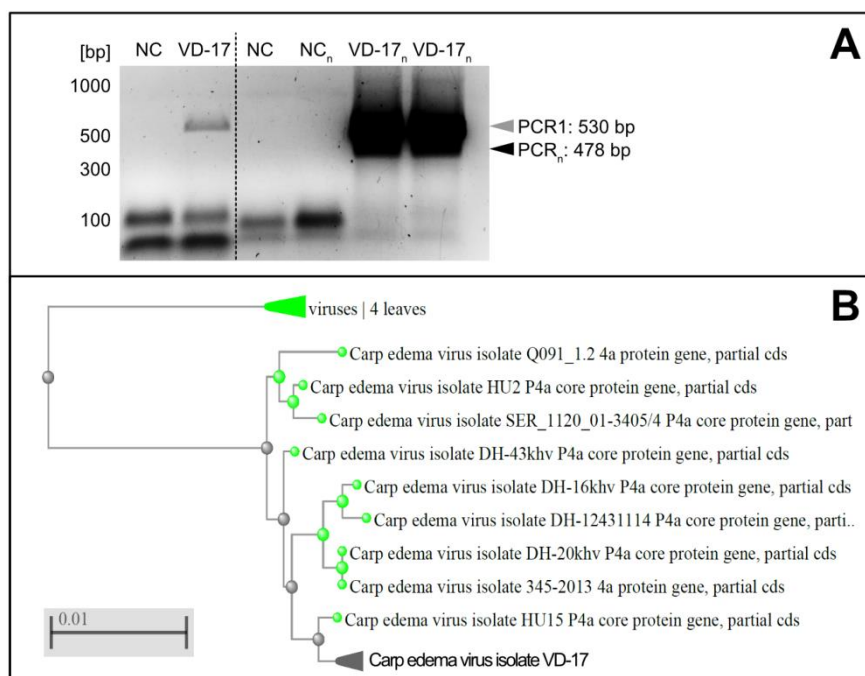


Abbildung 84 – Identifizierung / Bestätigung des vermeintlichen CEV-Isolats „VD-17: CEV-LUA 55918 Nr.1“. (A) CEV-spezifische Amplifikate aufgetrennt via AGE. Analysiert wurden PCR-Produkte aus einer CEV-spezifischen nested PCR (CEFAS CEV for 1 und rev 1; CEFAS CEV for 2 und rev 2). Das PCR-Produkt der nested PCR wurde aufgereinigt und sequenziert. (B) Phylogenetischer Stammbaum verbildlicht die Verwandtschaft des vermeintlichen CEV-Isolats „VD-17“ zu anderen publizierten CEV-Isolaten basierend auf der Sequenz des Amplifikats aus der nested PCR (Abschnitt des Gens, das für das Protein 4a codiert, 424 bp). Der Referenzbalken symbolisiert die Substitutionen pro Position.

8.3.3.3. KHV-/ CEV-multiplexing

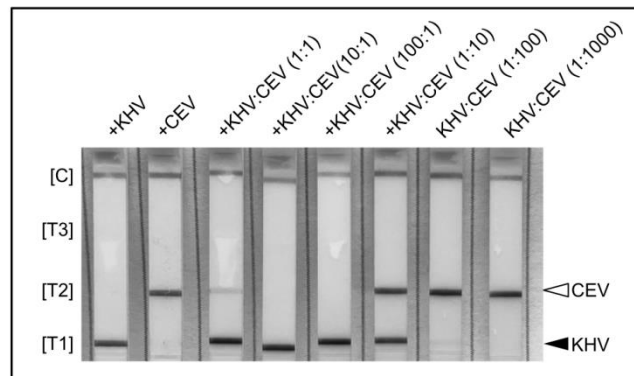


Abbildung 85 – Nutzbarkeit eines Nachweis-spezifischen Teststreifens für die *multiplex*-Detektion von KHV und CEV. Dabei wurden KHV- und CEV-spezifische Sonden immobilisiert (T1 und T2). Unter der Verwendung von Helfern und der etablierten post PCR-Hybridisierung gelang die deutliche Erkennung von CEV- und KHV-Amplikons. Über den Streifen sind die genutzten Amplikate in den jeweiligen Mischungsverhältnissen aufgeführt.

8.3.4. Zusatz: Reporter-basierte RNase H2-abhängige AMPlifikation kombiniert mit Lateral Flow Analysis

8.3.4.1. Rep-rhPCR-LFA zur Identifikation von *L. lindneri*:

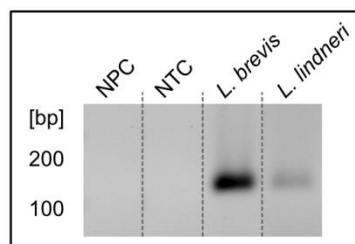


Abbildung 86 – PCR-Produkte aus dem *proof-of-concept* Versuch zur Funktionalität der Reporter-basierten RNase H2-abhängigen PCR. Dabei wurde eine no-PCR-Kontrolle (NPC), eine no-template-Kontrolle (NTC), *L. brevis* (ca. $1 \cdot 10^6$ cfu je mL) und *L. lindneri* (ca. $1 \cdot 10^4$ cfu je mL) mitgeführt. Die dargestellten PCR-Produkte wurden via AGE aufgetrennt anschließend visualisiert.

Tabelle 35 – Shapiro Wilks Test zur Überprüfung der Normalverteilung der Werte innerhalb einer Stichprobe (NPC, NTC, LBr, LLi). Sofern $W > W_{\text{kritisch}}$, unter Berücksichtigung des jeweiligen p-Wertes, wird die Nullhypothese (Normalverteilung der Stichprobe) angenommen.

Probenset / Stichprobe	NPC	NTC	LBr	Lli
Stichprobenumfang (n)	12	12	11	12
Mittelwert	14,78	13,1	14,74	5,1
Standardabweichung (SD)	5,08	3,12	4,67	1,07
Teststatistik (W)	0,91	0,93	0,91	0,94
W_{kritisch} bei p-Wert: 0,01	0,81	0,81	0,79	0,81
W_{kritisch} bei p-Wert: 0,05	0,86	0,86	0,85	0,86
W_{kritisch} bei p-Wert: 0,001	0,88	0,88	0,88	0,88

Tabelle 36 - Errechnete p-Werte mittels Student's t-Test, bei dem jeweils die Mittelwerte zweier Stichproben verglichen wurden. $p > 0,05$ wird als nicht signifikant unterschiedlich gewertet. $p < 0,05$ wird als signifikanter Unterschied gewertet. $p < 0,005$ wird als sehr signifikanter und $p < 0,0005$ wird hoch signifikanter Unterschied betrachtet. N/A bedeutet nicht analysiert. Verwendet wurde der Student's t-Test, ungepaart, Vergleich zweier Stichproben mit abweichender Varianz.

Stichprobe	NPC	NTC	LBr	LLi
NPC	N/A	0,1707955	0,4914796	0,0000156
NTC	0,1707955	N/A	0,1704713	0,0000005
LBr	0,4914796	0,1704713	N/A	0,0000174
LLi	0,0000156	0,0000005	0,0000174	N/A

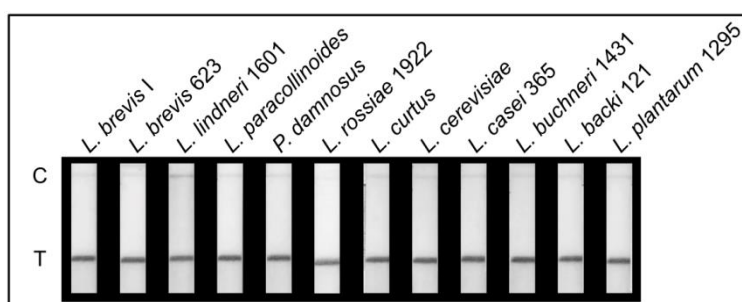


Abbildung 87 – Spezifitätsanalyse, Lateral Flow Analyse der Reaktionsprodukte der Rep-rhPCR zur Identifikation von *L. lindneri*.

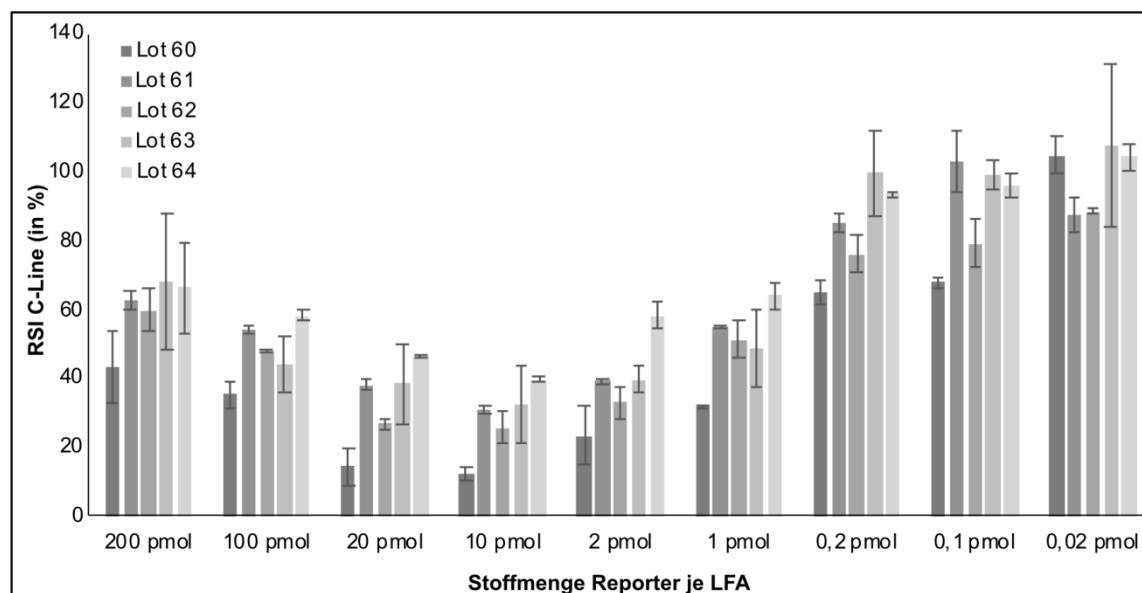


Abbildung 88 - Inter-Lot-Variabilität des MGHHD für Reporter-basierte Analysen. Untersucht wurden die MGHHD-Lots 0060 bis 0064 mit identischem Probenmaterial. Hierbei handelte es sich um Biotin- und 6-FAM-markierte einzelsträngige DNA-Moleküle. Genutzt wurden unterschiedlichen Mengen des „Reporters“ je LFA. Nach drei-minütiger LFA erfolgte die Dokumentation und anschließende Quantifizierung der C-Linien-Intensität. Im Säulendiagramm wurde die relative Signalintensität der C-Linie dargestellt. Als Referenz (100%) wurde der MGHHD ohne Reporter genutzt. Die Ergebnisse liegen einer Dreifachbestimmung zugrunde.

8.3.5. Zusatz: Nachweis der Faktor V Leiden Mutation

8.3.5.1. FVL – post PCR Hybridisierung

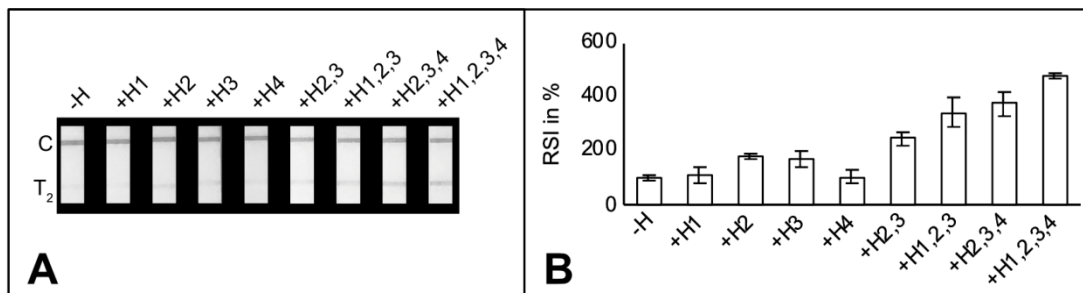


Abbildung 89 – Einfluss der Faltungshelfer auf die Nachweisbarkeit des FVL-WT-Amplifikats. (A) Repräsentative Teststreifen unter Verwendung verschiedener Faltungshelferkombinationen. (B) Säulendiagramm zum Einfluss der Faltungshelfer – diesen Ergebnissen liegt eine Dreifachbestimmung zugrunde. Dargestellt ist die relative Signalintensität in %, wobei die T-Linienintensität der Kontrolle ohne Helfer als Referenz (100%) genutzt wurde.

8.3.6. Zusatz: NALFIA-assoziierte Limitationen

8.3.6.1. High Dose Hook Effect

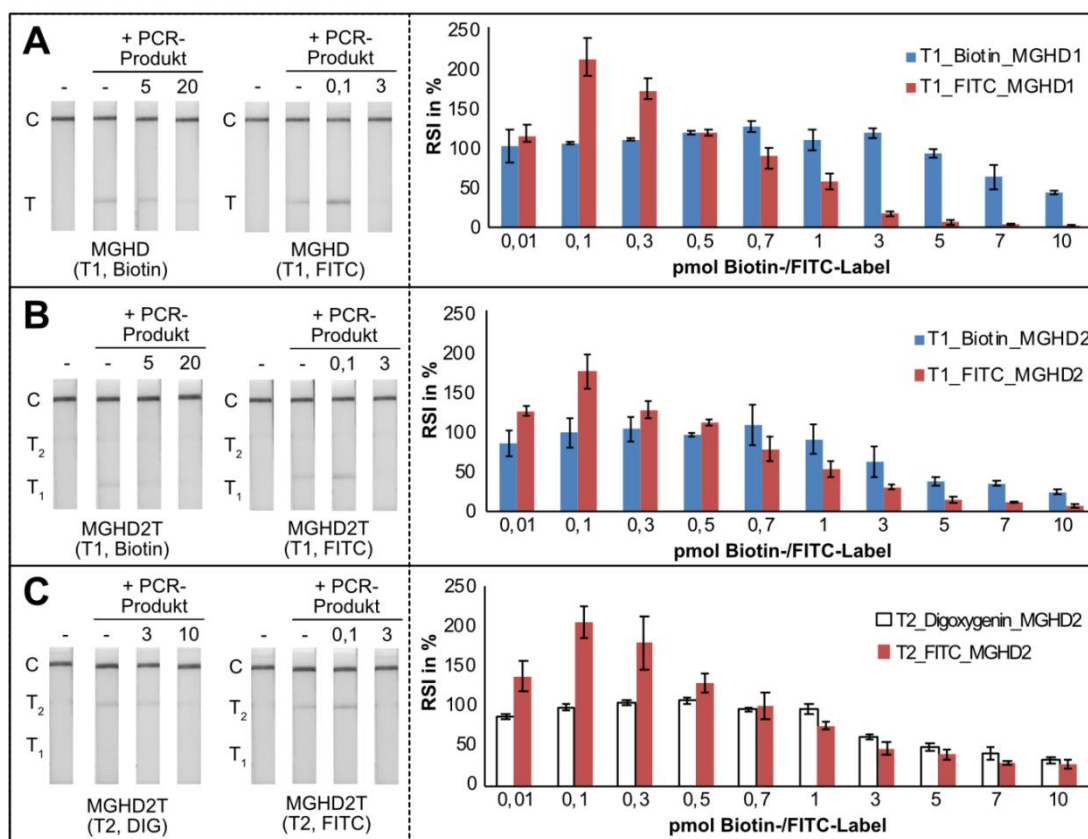


Abbildung 90 – Untersuchung zur Ermittlung des *high dose hook* Effekts für die in der Arbeit verwendeten Universalteststreifen. Verwendet wurde für die LFA ein dual-markiertes PCR-Produkt in konstanter Konzentration (Biotin-FITC / DIG-FITC), sodass ein auf dem Testlinien deutlich sichtbares, aber schwaches Signal erzeugt wurde. Nach Zusatz einzelner markierter Oligonukleotide in definierten Mengen wurde die Änderung der Signalstärke beobachtet. Zur Errechnung der relativen Signalintensität in % wurde die Signalintensität der Kontrolle (ohne zusätzlich markierte Oligos in der LFA) als Referenz herangezogen. (A) Der einsetzende *hook*-Effekt für Testlinie des MGHD wurde durch Zugabe von Biotin- bzw. FITC-markierten Oligonukleotiden forciert. (B) Der einsetzende *hook*-Effekt für Testlinie 1 des MGHD2 wurde durch Zugabe von Biotin- bzw. FITC-markierten Oligonukleotiden forciert. (C) Der einsetzende *hook*-Effekt für Testlinie 2 des MGHD2 wurde durch Zugabe von DIG- bzw. FITC-markierten Oligonukleotiden forciert.

8.3.6.2. Cross Primer Dimere – universelle Eliminierungsstrategien

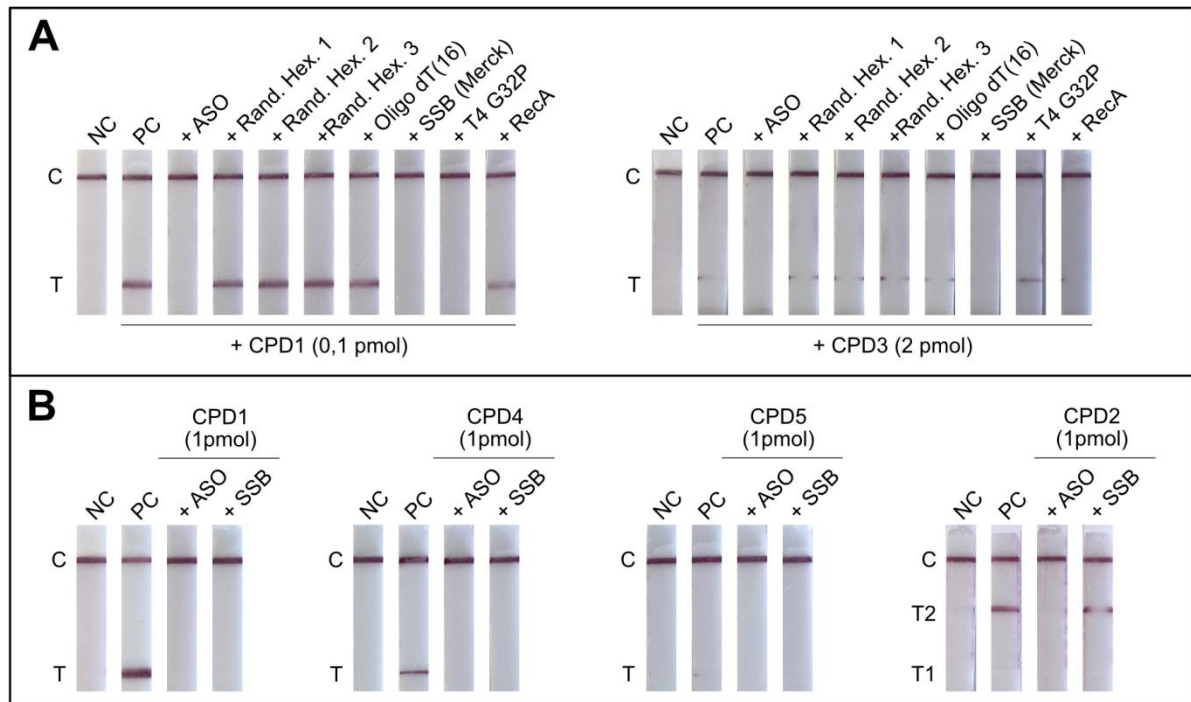


Abbildung 91 – Weitere „tools“ zur Eliminierung von Heterodimeren. **(A)** Unter Verwendung zweier Cross Primer Dimere (CPD1 und CPD3) wurde der Einfluss von CPD-Helfer (ASO), Random Hexamer Primern verschiedener Hersteller (Rand. Hex. 1-3), Oligo dT Primer, einem Einzelstrang-Bindeprotein (SSB, Merck), dem Einzelstrang-Bindeprotein T4 G32P und dem DNA-interagierendem Protein Recombinase A (RecA) untersucht. Lediglich das SSB von Merck und der spezifische CPD-Helfer konnte beide Cross Primer Dimere effizient eliminieren. **(B)** Aus diesem Grund wurde die Eliminierung weiterer CPDs untersucht. (NC-Negativkontrolle, ohne CPD-verursachende Oligonukleotide; PC – Positivkontrolle, mit CPD-verursachenden Oligonukleotiden).

8.3.6.3. Nachweisgeschwindigkeit

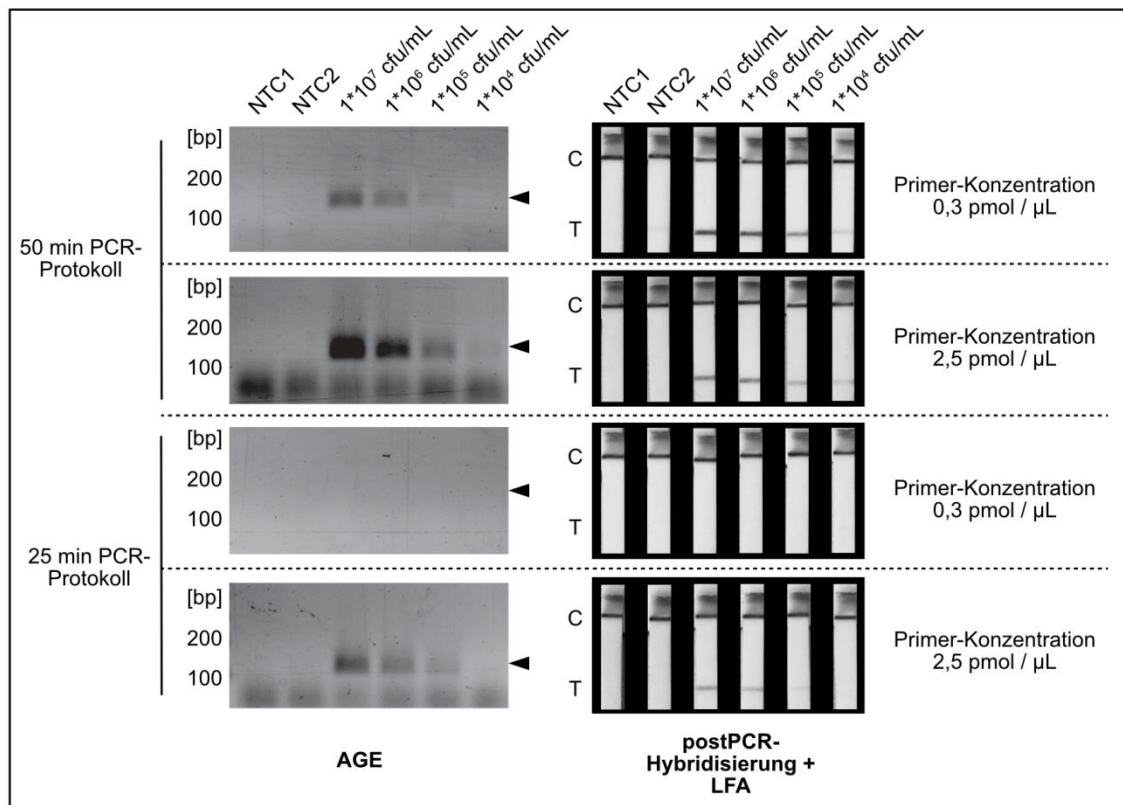


Abbildung 92 – Beschleunigung der PCR durch Steigerung der Primerkonzentration. Verwendet wurde hierbei der Identifizierungsnachweis von *Lactobacillus backi* durch *singleplex* PCR mit anschließender post PCR-Hybridisierung.

8.3.6.4. Einfluss der Temperatur auf die universellen LFDs

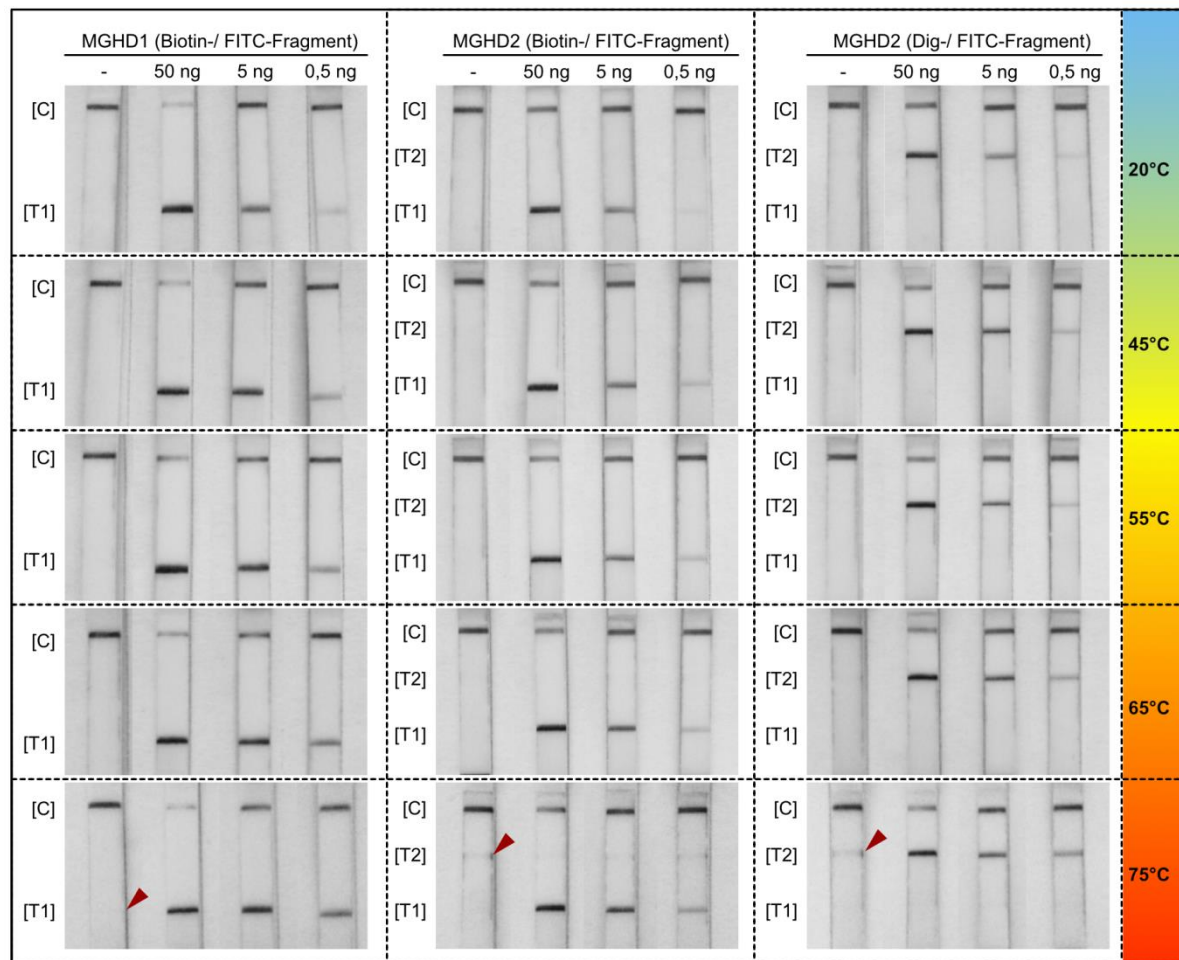


Abbildung 93 – Einfluss der Temperatur auf die Nachweisbarkeit dual-markierter Amplikons. Untersucht wurden aufgereinigte PCR-Fragmente, die entweder Biotin- und FITC-markiert bzw. Digoxigenin- und FITC-markiert wurden mit beiden verwendeten Universal-LFDs. Die LFA wurde bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, wobei alle relevanten Komponenten für etwa 10 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert wurden.

Tabelle 37.1 - Übersicht Limitationen von NALFIAs – Lösungsstrategien, Stellschrauben und Anwendungsbeispiele

Limitation	Stellschrauben	Effekt	exemplarischer Bezug diese Arbeit / Literatur
Cross Primer Dimere / Heterodimere	Temperatur	Auswertung bei höheren Temperaturen via LFA kann zur CPD-Eliminierung beitragen (40-65°C)	Homoplasmie-Test <i>C. reinhardtii</i> , Nachweis CEV
	Demthylsulfoxid (DMSO)	Universalteststreifen tolerieren etwa (X%) DMSO, kann im Laufpuffer zur Eliminierung von CPDs beitragen	Nachweis von <i>L. rossiae</i> über duplex PCR-LFA
	Einfluss Verdünnung	Verdünnung des Amplifikats in Laufpuffer kann zur Eliminierung schwacher CPDs beitragen	Nachweis von <i>L. rossiae</i> über duplex PCR-LFA
	Einfluss Ionenstärke	erhöhte Salzkonzentration können CPDs verstärken	Nachweis KHV
	unmarkierte Oligonukleotide (CPD-Helfer)	Assay-spezifischen Werkzeug zur effizienten Eliminierung von CPDs (Laufpuffermodifikation, Mastermix-spike in)	Nachweis von <i>L. rossiae</i> , Nachweis CEV, alternative IAC CEV-Nachweis, Homoplasmie-Test <i>C. reinhardtii</i> ,
	Assay-Redesign	Durch Adaptierung der Nachweis- oder Label-Strategie (bspw. Sonden-basierter Nachweis anstelle eines Primer-basierten Nachweises) wird Dimerisierung umgangen.	anwendbar für alle NALFIA-assoziierten Nachweismethoden
	Reporter-basierte Methoden	Bei der Nutzung Reporter-basierter Nachweise spielen CPDs kaum eine Rolle	Rep-rhPCR / Rep-rhLAMP
	Primer-Redesign	Alternative Primer-/ Sondensequenzen zu testen, kann Heterodimerisierung vorbeugen.	anwendbar für alle NALFIA-assoziierten Nachweismethoden
	Primer-/ Sonden-Modifikation	Aufwändige Methode zur Adaptierung einzelner Basen innerhalb eines markierten Oligonukleotids. Provozierte Abstoßung unterbindet Dimerisierung.	Siehe RPA-Manual, TwistDx
	Einzelstrang-Bindeproteine (SSB-Protein)	universelles Werkzeug zur Eliminierung von schwachen bis starken CPDs	Eliminierung verschiedenster CPDs
Hybridisierung von Amplifikaten für LFA-Auswertung	unmarkierte Oligonukleotide (Faltungshelfer, Spezifitäts-Helfer)	Manipulation der Faltung des ss Amplifikats (Zugänglichkeit der Sondenbindestelle, Zugänglichkeit der Label), Eliminierung nicht-spezifischer Hybridisierungen	Identifizierung der häufigsten Bier-schädigenden Bakterien, Nachweis der Karpfenpathogene CEV und KHV, Nachweis der Faktor V Leiden Mutation
	Einfluss Ionenstärke	Klassischer Hybridisierungsparameter: erhöhte Salzkonzentration ermöglicht/ verbessert spezifische Hybridisierung (2x bis 4x SSC)	Identifizierung der häufigsten Bier-schädigenden Bakterien, Nachweis der Karpfenpathogene CEV und KHV via PCR und post PCR-Hybridisierung
	Demthylsulfoxid (DMSO)	Senkung spezifischer Hybridisierungstemperatur, Eliminierung / Abschwächung von unspezifischer Hybridisierung	klassischerweise PCR-Additiv. Identifizierung von <i>L. lindneri</i> via PCR + Hybridisierung
	Fragmentlänge des zu hybridisierende Amplifikats	tendenziell neigen kürzere einzelsträngige Amplifikate zu besserer Nachweisbarkeit	CEV-Nachweis
	Sondenbindestelle	Zugänglichkeit der Sondenbindestelle ist ein wesentlicher Faktor für die Hybridisierungseffizienz	Zugänglichkeit der Sondenbindestelle essentiell für die Nachweisbarkeit.
	Temperatur	klassischer Hybridisierungsparameter: nimmt essentiellen Einfluss auf die Spezifität, nimmt Einfluss auf die Struktur des zu hybridisierenden Amplifikats.	Identifizierung bierschädigende Bakterien

Tabelle 37.2 - Übersicht Limitationen von NALFIAs – Lösungsstrategien, Stellschrauben und Anwendungsbeispiele

Limitation	Stellschrauben	Effekt	exemplarischer Bezug diese Arbeit / Literatur
Spezifität, Sensitivität von NALFIA	PCR - Temperaturprotokoll	Zyklenzahl, Nutzung von Temperaturinkrement / -dekrement (<i>Touchdown</i> PCR) sind essentielle Stellschrauben	Touchdown-PCR, <i>one-pot</i> semi nested PCR etc.
	Primer-/ Sondendesign	Das Primerdesign ist essentiell für Amplifikationseffizienz, und Spezifität (ARMS-PCR, LATE-PCR, SHERLOCK, etc)	betrifft alle Nachweisformate (ARMS-PCR)
	Primer/ Sonden-Modifikationen	Spezielle Modifikationen können Einfluss auf die Performance nehmen. Häufig sind definierte Modifikationen wichtiger Bestandteil der Nachweisstrategie	RNase H2-abhängige PCR
	Nutzung multipler Verstärkereffekte	Die Kombination verschiedener Verstärkereffekte kann Spezifität und vor allem die Sensitivität eines Nachweises verbessern.	SHERLOCK, DETECTR, RPA-PCR, nested PCR (CEV-Nachweis)
	Hybridisierung des Amplifikats	die zusätzliche Hybridisierung des Amplifikats erlaubt sensitive Nachweisführung und potentielle Steigerung der Nachweisgenauigkeit	CEV-Nachweis, KHV-Nachweis, Identifikation relevanter Bierschädiger
	Reprh-AMP-LFA	Die Nutzung der RNase H2 zur Reporterdegradierung ist eine Möglichkeit die Spezifität eines Nachweises zu verbessern.	Identifizierung von <i>L. lindneri</i> , Nachweis der Faktor V Leiden Mutation via Rep-rhPCR-LFA
Kontamination (<i>carryover</i>)	geschlossenes LFD	Vermeidung von Kontamination durch spezielles LFD, viel Müll	nicht genutzt, Ustar-Device (Tabelle 1)
	räumliche Trennung der Arbeitsschritte (Einbahnstraßensystem)	beugt <i>carryover</i> Kontamination vor. Umständlich, schwer / nicht umsetzbar für echte POC-Methode	In dieser Arbeit konsequent genutzt
	regelmäßige Dekontamination	Die regelmäßige Reinigung / Dekontamination ist eine Grundlage die Arbeit mit sich wiederholenden Amplifikationsmethoden.	Lüften, Chemisch, UV, etc.
	Implementierung Uracil-DNA-Glycosylase	kompatibel mit PCR, LAMP und MCDA, nimmt Einfluss auf die <i>Assay-Performance</i>	CEV-Nachweis
Geschwindigkeit	<i>Recombinase Polymerase Amplification</i>	Die RPA kann extrem schnell funktionieren. Im Extremfall können 10 Kopien in unter 10 Minuten nachgewiesen werden. Gut LFA-Kompatibilität.	In dieser Arbeit nicht gezeigt, Bsp: Qian <i>et al.</i> , 2020
	<i>Loop isothermal amplification</i>	in unter 30 Minuten kann hochsensitiver Nachweis erfolgen.	Faktor V Leiden-Nachweis
	PCR	Die PCR kann massiv beschleunigt werden. Sensitive LFA-assoziierte Nachweise in unter 30 Minuten sind möglich	Identifikation bierschädigender Bakterien (Anhang)
	Hybridisierung des Amplifikats	einfache universelle Technik, um Amplifikate zu hybridisieren. Dauer: 1-5 min.	Identifizierung bierschädigende Bakterien, CEV, KHV, Faktor V Leiden Mutation

Tabelle 37.3 - Übersicht Limitationen von NALFIAs – Lösungsstrategien, Stellschrauben und Anwendungsbeispiele

Limitation	Stellschrauben	Effekt	exemplarischer Bezug diese Arbeit / Literatur
<i>high dose hook effect</i>	Markierungen limitieren	NALFIAs bieten die Möglichkeit die Anzahl in das LFD eingebrachter Label genau zu steuern	In der ganzen Arbeit genutzt
	Zeitliche Abfolge ändern	Interaktion zwischen Amplifikat und mobiler Phase zeitlich von Interaktion mit mobiler Phase entkoppeln	Daten nicht gezeigt
	Reporter-basierte Methoden	Anzahl der Reporter limitieren, kann unabhängig von anderen Parametern (bspw. Primerkonzentration) sein	Rep-rhPCR-LFA (Nachweis <i>L. lindneri</i> , FVL-SNP)
<i>multiplexing</i>	Hybridisierung des Amplifikats	Die post-Amplifikation Hybridisierung ermöglicht die Charakterisierung des Amplifikationsprodukts mit verschiedenen Sonden.	Identifizierung bierschädigende Bakterien, CEV, KHV, Faktor V Leiden Mutation
	Assay-spezifische LFDs	Assay-spezifische LFDs (z.B. Immobilisierung von Sonden)	KHV, CEV (Anhang)

9. Danksagung

Die vielen Stunden, Tage, Jahre, die nötig waren, um letztlich diese Arbeit verfassen zu können, wäre ohne die Hilfe vieler wichtiger Menschen in meinem Leben nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich an dieser Stelle den wichtigsten Personen danken:

Prof. Dr. Udo Johanningmeier danke ich ganz besonders für das Vertrauen, das er mir trotz des „ungewöhnlichen“ Themas stets entgegen gebracht hat. Diese Unterstützung in schwierigen Zeiten erachte ich nicht als „selbstverständlich“. Auch den anderen **Gutachtern** danke ich für die Zeit, die sie letztlich in diese Arbeit investieren.

Meinem Freund **Dr. Ivo Bertalan** danke ich besonders für den fachlichen Diskurs die vielen kreativen, und lustigen Momente, sowie den großen Beitrag, den er zu dieser Arbeit bewusst und unbewusst beigetragen hat. **Dr. Ralf Dostatni**, der mir die Promotion überhaupt ermöglichte, danke ich für die großartige Unterstützung, die weit über das Fachliche hinausging. **Dr. Martin Schattat** und seiner Gruppe danke ich sehr für die Aufnahme in seine Gruppe und das stets offene Ohr.

Auf meinem Weg sind viele Kollegen zu Freunden geworden. Das Arbeiten mit Ihnen hat einfach Spaß gemacht, wofür ich mich bedanke: **Daniel Schröter, Michael und Annemarie Jordan, Ulrike Gosdzinski, Marlies Wolf, Alexander Liebscher, Laura Gürlich, Mara Scheunemann, Monika Helmchen, Jolina Marx und Rahel Gormanns.** Darüber hinaus bedanke ich mich bei den vielen Projektpartnern, ohne die viele dieser Ergebnisse so nicht hätten generiert werden können: **Dr. Viktor Janz** und **Dr. Sven Geissler** (Berliner Charité), **Dr. Jennifer Schneiderbanger** (TUM, BLQ Weihenstepahn), **Dr. Stephanie Speck** und **Dr. Finn Loose** (Universität Leipzig), **Dr. Burkhard Schütze** (LADR). Ein großes „Dankeschön“ gebührt den Mitarbeitern der Milenia Biotec GmbH, wobei ich **Susanne Mauracher, Lena Bender, Prof. Dr. Gertrud Eberle** und **Dr. Willi Tillmann** besonders hervorheben möchte. Den vielen fleißigen Studenten, die Praktika und Abschlussarbeiten unter meiner Anleitung absolviert haben, gebührt natürlich ebenso Dank: **Tom Wippold, Ann-Kathrin Pohl, Frederick Faust** und **Nathalie Schneider**.

Neben meinen **Freunden**, kann ich meinen Eltern **Horst** und **Ruth Breitbach**, sowie meinem Bruder **Maik Breitbach** nicht genug danken. Sie haben mir das Studium ermöglicht und mich immer auf meinem Weg unterstützt. Gerade in den vergangenen Jahren gilt gleiches für meine „Schwiegereltern“ **Ilona** und **Andreas Pohle**. Mein größter Dank gilt den Menschen, für die ich die Teststreifen sofort fallen lasse. Ich danke meinen Kindern **Janosch Flip Pohle** und **Ellena Grete Pohle**, die keine Ahnung davon haben, welchen Anteil sie an dieser Arbeit haben. Sie zeigen mir Tag für Tag worum es wirklich geht. Zu guter Letzt danke ich der wichtigsten Person in meinem Leben, **Kathrin Pohle**. Sie vermag mich aufzurichten, abzulenken und zu motivieren! Ohne ihren Einsatz, ihre Liebe und Energie wäre es nicht gegangen.

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keinen anderen als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den verwendeten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden von mir als solche kenntlich gemacht. Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich zum ersten Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

André Breitbach

Ort, Datum

Unterschrift

11. Publikationsliste

Publikation I - Rapid detection of periprosthetic joint infection using a combination of 16s rDNA polymerase chain reaction and lateral flow immunoassay: A Pilot Study

Veröffentlicht wurde im Journal „*Bone & Joint Research*“ zur Entwicklung eines NALFIAs (PCR-LFA) zur intraoperativen Erkennung von periprosthetischen Gelenksinfektionen (PJI), bei der eine direkt PCR an Synovialflüssigkeit mit nachgeschalteter Lateral Flow Analyse relevante Bakterien in weniger als 25 Minuten nachweist. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit der Charité in Berlin durchgeführt.

Referenz: Janz, V., Schoon, J., Morgenstern, C., Preininger, B., Reinke, S., Duda, G., Breitbach, A., Perka, C. F., & Geissler, S. (2018). Rapid detection of periprosthetic joint infection using a combination of 16s rDNA polymerase chain reaction and lateral flow immunoassay: A Pilot Study. *Bone & joint research*, 7(1), 12–19. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.71.BJR-2017-0103.R2>

Publikation II - Diagnostic validation of a rapid and field-applicable PCR-lateral flow test system for point-of-care detection of cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3)

Die Ergebnisse im Abschnitt 4.5 wurden in enger Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen (Universität Leipzig) durchgeführt. Die gemeinsam erzielten Ergebnisse wurden im Journal „*PLOS ONE*“ publiziert. Hierbei handelte es sich um eine geteilte Erstautorschaft zwischen Dr. Finn Loose und mir.

Referenz: Loose, F. N., Breitbach, A., Bertalan, I., Rüster, D., Truyen, U., & Speck, S. (2020). Diagnostic validation of a rapid and field-applicable PCR-lateral flow test system for point-of-care detection of cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *PloS one*, 15(10), e0241420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241420>

12. Lebenslauf

Persönliches

Name	André Breitbach
Geburtstag	02.04.1986
Geschlecht	Männlich
Geburtsort	Halle (Saale)
Nationalität	Deutsch

Bildung

seit 2013	Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2006 – 2013	Biologie Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997 – 2005	Abitur am Friedengymnasium in Halle (Saale)
1993 – 1997	Besuch der Karl-Friedrich-Gauß-Grundschule

Beruf

seit 2014	Mitarbeiter im Bereich „Forschung und Entwicklung“, Spezialist für molekularbiologische Applikationen bei der Milenia Biotec GmbH (Gießen),
2013	wissenschaftlicher Mitarbeiter (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Zivildienst

2005 – 2006	Zivildienst in der Sozialstation der Diakonie Halle
--------------------	---