

Amplifikations-spektroskopisches Verfahren auf Basis aggregachromer Farbstoffe zur Überprüfung der viruziden Wirkung von Waschverfahren

IGF 20696 N

Textilien aus dem Gesundheits- und Sozialwesen können mit Krankheitserregern kontaminiert sein, welche auf den Textilien mehrere Wochen persistieren können. Zur Aufbereitung von Textilien aus diesen Bereichen werden in textilen Dienstleistungsbetrieben nahezu ausschließlich Verfahren eingesetzt, in denen neben vegetativen Bakterien inklusive Mykobakterien und Pilzen sowie deren Sporen (Wirkungsbereich A) auch Viren (Wirkungsbereich B) abgetötet bzw. inaktiviert werden. Die Überwachung desinfizierender Waschverfahren erfolgt durch Prozesskontrollen mittels Bioindikatoren. Die Bioindikatoren müssen von externem Fachpersonal in Speziallaboren ausgewertet werden. Weitere gravierende Nachteile sind die hohen Kosten und die lange Dauer des kulturellen Nachweisverfahrens (ca. 2-3 Tage).

Vor diesem Hintergrund wurde ein automatisierbares Verfahren zur Auswertung phagenkontaminierter Bioindikatoren entwickelt, bei dem phagenspezifische Nukleinsäuresequenzen (Zielsequenzen) isothermal amplifiziert und anschließend mit einem aggregachromen Farbstoff markiert wurden. Zur Vervielfältigung phagenspezifischer Nukleinsäuresequenzen erwies sich die Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation (LAMP) als geeignet. Phagenspezifische Gene wurden identifiziert und Primer wurden softwareunterstützt designed. Agenzien wurden erprobt und Verfahrensparameter optimiert. Zur Vervielfältigung phagenspezifischer Nukleinsäuresequenzen mittels LAMP war weder eine vorherige Isolation des Genoms aus dem Phagen noch eine Freilegung der Zielsequenzen mittels Restriktionsendonukleasen notwendig. Zur Isolation infektiöser Phagen von Bioindikatoren nach desinfizierender Aufbereitung erwiesen sich immobilisierte, bakterielle Wirtszellen als geeignet. Am Ende des Replikationszyklus wurden die Phagen durch Lyse automatisch aus den Wirtszellen freigesetzt, so dass auf die Dosierung von Lyseagenzien verzichtet werden kann. Eine Immobilisierung der Wirtszellen konnte auf einer goldbeschichteten Oberfläche erfolgen; dazu erwies sich die Interaktion zwischen der bakteriellen Zelloberfläche und Goldgruppen als ausreichend.

Amplification spectroscopic method based on aggregachromic dyes for testing the virucidal effect of washing processes

IGF 20696 N

Textiles from the healthcare and social sectors may be contaminated with pathogens that can persist on the textiles for several weeks. For reprocessing of textiles from these areas, textile service companies use almost exclusively processes in which, in addition to vegetative bacteria, including mycobacteria and fungi and their spores (efficacy spectrum A) as well as viruses (efficacy spectrum B) are killed or inactivated. The monitoring of disinfectant washing processes is currently carried out in textile service companies by process controls using bioindicators. The bioindicators must be evaluated by external experts in specialized laboratories. Further serious disadvantages are the high costs and the long duration of the cultural detection procedure (approx. 2-3 days).

Therefore, an automatable process was developed for evaluating phage-contaminated bioindicators, in which phage-specific nucleic acid sequences (target sequences) were amplified isothermally and then labelled with an aggregachromic dye. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) proved to be suitable for replicating phage-specific nucleic acid sequences, Phage-specific genes were identified and primers were designed using a standard software. Agents were tested and process parameters optimized.

The reproduction of phage-specific nucleic acid sequences by LAMP did not require prior isolation of the genome from the phage or exposure of the target sequences by restriction endonucleases. Immobilized, bacterial host cells were found to be suitable for isolating infectious phages from bioindicators after disinfecting treatment. At the end of the replication cycle, the phages were automatically released from the host cells by lysis, so that the dosage of lysis agents is not required. The host cells could immobilize on a gold-layered surface; the interaction between the bacterial cell surface and gold groups was sufficient.

Fortsetzung auf Seite 2

To be continued on page 2

Fortsetzung:

IGF 20696 N

Amplifizierte Zielsequenzen ließen sich durch Hybridisierung mit komplementären, immobilisierten Fängeroligonukleotiden (Selektionsmatrix) vom Reaktionsansatz abtrennen. Werden Fängeroligonukleotide mit peptidischem Rückgrat (PNA) verwendet, kann der synthetisierte kationische Initiator direkt elektrostatisch an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der Zielsequenzen (negativ geladen) gebunden werden; der Initiator startet die Polymerisation des aggregachromen Farbstoffs. Ein geeigneter Initiator ließ sich aus Cholinchlorid und α -Bromoisobutyrylbromid synthetisieren.

Zur Entwicklung eines polymerisierbaren, aggregachromen Farbstoffs wurde Tetraphenylethylen (TPE) als Grundstruktur ausgewählt: Mittels Suzuki-Kupplung wurde Bromtriphenylethylen mit 4-Hydroxyphenylboronsäure zu TPE-OH umgesetzt, aus dem durch nukleophile Substitution mit Acrylsäurechlorid das TPE-Acrylat synthetisiert wurde. Unter Zusatz des Aktivators Kupfer(II)-bromid und des Reduktionsmittels Natriumdithionit ließ sich das TPE-Acrylat mittels SARA-ATRP (engl. Supplemental Activator and Reducing Agent - Atom Transfer Radical Polymerization) polymerisieren. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Polymerisation des TPE-Acrylats konnte fluorimetrisch nachgewiesen werden. Die polymerisationsinduzierte Emission des am Zucker-Phosphat-Rückgrat der Zielsequenzen gebundenen, aggregachromen Farbstoffs ließ sich fluoreszenzmikroskopisch detektieren.

Der Nachweis der vollständigen Inaktivierung aller Phagen auf einem Bioindikator war mit dem neu entwickelten Verfahren auf Basis der isothermalen Amplifikation phagenspezifischer DNA-Sequenzen mittels LAMP und der nachfolgenden Markierung amplifizierter Zielsequenzen mit dem entwickelten polymerisierbaren aggregachromen Farbstoff fluoreszenzmikroskopisch möglich.

**Der Forschungsbericht ist auf Anfrage beim
wfk - Cleaning Technology Institute erhältlich.**

Continued:

IGF 20696 N

Amplified target sequences could be separated from the reaction approach by hybridization with complementary immobilized trap oligonucleotides (selection matrix). When trap oligonucleotides with a peptide backbone (PNA) are used, the synthesized cationic initiator can directly be electrostatically bound to the sugar-phosphate backbone of the target sequences (negatively charged); the initiator starts the polymerization of the aggregachromic dye. A suitable initiator was synthesized from choline chloride and α -bromoisobutyryl bromide.

To develop a polymerizable aggregachromic dye, tetraphenylethylene was selected as the basic structure: Bromtriphenylethylene with 4-hydroxyphenylboronic acid was converted by Suzuki coupling to TPE-OH, from which the TPE-acrylate was synthesized by nucleophilic substitution with acrylic acid chloride.

With addition of the activator copper(II) bromide and the reducing agent sodium dithionite, the TPE-acrylate was polymerized by SARA-ATRP (Supplemental Activator and Reducing Agent - Atom Transfer Radical Polymerization). The increase in fluorescence intensity during polymerization of the TPE acrylate was demonstrated fluorometrically. The polymerization-induced emission of the aggregachromic dye bound to the sugar-phosphate backbone of the target sequences could be detected by fluorescence microscopy.

Detection of complete inactivation of all phages on a bioindicator was possible by fluorescence microscopy using the newly developed method based on isothermal amplification of phage-specific DNA sequences by LAMP and subsequent labeling of amplified target sequences with the developed polymerizable aggregachromic dye.

**The research report is available on request from the
wfk - Cleaning Technology Institute**

Das IGF-Projekt 20696 N der Forschungsvereinigung Forschungskuratorium Textil e.V., Reinhardtstraße 14-16, 10117 Berlin, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

The IGF-project 20696 N of the research association Forschungskuratorium Textil e.V., Reinhardtstr. 14-16, D-10177 Berlin, was supported via the AiF within the funding program „Industrielle Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)“ by the Federal Ministry of Economic Affairs and Energy (BMWi) due to a decision of the German Parliament.