

## Duplex-Amplifikationsverfahren zum in situ-Schnellnachweis hygienerelevanter Keime auf flexiblen Endoskopen

### IGF 20900 N

Ziel des Forschungsvorhabens war ein in-situ-Schnellnachweis für hygienerelevante Keime auf inneren und äußeren Endoskopoberflächen entsprechend Anlage 10 der Leitlinie zur Validierung von Endoskopaufbereitungsverfahren.

Der Nachweis einzelner hygienerelevanter Keime beruhte auf der selektiven Markierung mit Aptameren aus DNA, die nach der Markierung durch thermische Denaturierung wieder quantitativ von den Keimen abgelöst und aus dem Endoskop eluiert werden können.

Mittels Durchflusszytometrie konnte ermittelt werden, dass sich unter Einsatz eines Aptamers gegen *Enterococcus faecium* bis zu 40 % der Zellen markieren ließen. Die thermische Ablösung gebundener Aptamere konnte bei 60 °C nachgewiesen werden.

Wiedergewonnene Aptamere konnten durch Hybridisierung an komplementäre DNA-Abschnitte (Oligonukleotide) auf spezifischen Auswertefeldern zum Nachweis einzelner mikrobieller Arten (z.B. *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, etc.) gebunden werden.

Zum Nachweis der gebundenen Aptamere wurden sphärische DNA-Hybrid-Aggregate (SDHA) entwickelt, diese konnten unter Einsatz von Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von 20 nm oder unter Einsatz von carboxylierten Latex-Beads mit einem Durchmesser von 1 µm durch Bindung von Oligonukleotiden mit teilkomplementärer Sequenz zu den nachzuweisenden Aptameren hergestellt werden.

## Duplex amplification method for in situ rapid detection of hygiene-relevant germs on flexible endoscopes

### IGF 20900 N

Aim of the research project was an in-situ rapid detection of hygiene-relevant germs on internal and external endoscope surfaces in accordance with Annex 10 of the guideline for the validation of endoscope reprocessing procedures.

The detection of individual hygiene-relevant germs was based on selective labelling with aptamers from DNA, which can be quantitatively detached from the germs again after labelling by thermal denaturation and eluted from the endoscope.

Using flow cytometry, it could be determined that up to 40 % of the cells could be labelled using an aptamer against *Enterococcus faecium*. Thermal detachment of bound aptamers could be demonstrated at 60 °C.

Recovered aptamers could be bound by hybridisation to complementary DNA segments (oligonucleotides) on specific evaluation fields for the detection of individual microbial species (e.g. *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, etc.).

Spherical DNA hybrid aggregates (SDHA) were developed for the detection of the bound aptamers; these could be prepared using gold nanoparticles with a diameter of 20 nm or using carboxylated latex beads with a diameter of 1 µm by binding oligonucleotides with a partially complementary sequence to the aptamers to be detected.

Fortsetzung auf Seite 2

To be continued on page 2

## Fortsetzung:

### IGF 20900 N

Andere auf der Oberfläche der SDHA immobilisierte Oligonucleotide dienten als Initiatoren zur Auslösung einer hohen Anzahl (1. Amplifikation) von Hybridisierungskettenreaktionen (HCR). Um mittels HCR fluoreszierende Hybridisierungsprodukte auf der Oberfläche der SDHA bilden zu können, wurden spezielle Fluorophor-funktionalisierte metastabile Haarnadel-Oligonucleotide entwickelt, die innerhalb von 10 min die Bildung hochmolekularer und stark fluoreszierender Hybridisierungsprodukte ermöglichen, die sich aus über 500 einzelnen Haarnadel-Oligonucleotiden zusammensetzen (2. Amplifikation), was eine empfindliche visuelle Detektion ermöglicht.

Den zunehmend mit der Aufbereitung von Medizinprodukten betrauten Reinigungs- und Hygieneserviceleistern und den von den medizinischen Einrichtungen selbst betriebenen Aufbereitungseinheiten für Medizinprodukte wird durch das Duplex-Amplifikationsverfahren ein innerbetrieblich und kostengünstig anwendbarer Schnellnachweis zur eigenständigen, innerbetrieblichen Prüfung der Aufbereitungsqualität flexibler Endoskope zur Verfügung gestellt.

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

## Continued:

### IGF 20900 N

Other oligonucleotides immobilised on the surface of the SDHA served as initiators to trigger a high number (1st amplification) of hybridisation chain reactions (HCR).

In order to be able to form fluorescent hybridisation products on the surface of the SDHA by means of HCR, special fluorophore-functionalised metastable hairpin oligonucleotides were developed, which enabled the formation of high-molecular and strongly fluorescent hybridisation products within 10 min, composed of more than 500 individual hairpin oligonucleotides (2nd amplification), thus enabling sensitive visual detection.

The duplex amplification method provides cleaning and hygiene service providers, who are increasingly entrusted with the reprocessing of medical devices, and the reprocessing units for medical devices operated by the medical facilities themselves, with a rapid detection method that can be used in-house and cost-effectively for independent, in-house testing of the reprocessing quality of flexible endoscopes.

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

Das IGF-Projekt 20900 N der Forschungsvereinigung Europäische Forschungsgemeinschaft Reinigungs- und Hygienetechnologie e.V., Campus Fichtenhain II, 47807 Krefeld, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

The IGF-project 20900 N of the research association Europäische Forschungsgemeinschaft Reinigungs- und Hygienetechnologie e.V., Campus Fichtenhain II, 47807 Krefeld, was supported via the AiF within the funding program „Industrielle Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)“ by the Federal Ministry of Economic Affairs and Climate Action due to a decision of the German Parliament.