

Konvergenz-Amplifikation und Fluorow-switch-Detektion zum Nachweis hygiene-relevanter ESKAPE-Erreger

IGF 21186 N

Den zunehmend mit der Flächendesinfektion in medizinischen Einrichtungen betrauten Reinigungs- und Hygieneserviceleistern sollte ein günstiger und innerbetrieblich anwendbarer Schnellnachweis zur Kontrolle des Hygienestatus von desinfizierten Oberflächen zur Verfügung gestellt werden. Durch den Nachweis ergeben sich einerseits wirtschaftliche Vorteile für Reinigungs- und Hygieneserviceleister, andererseits wird hierdurch die Hygiene in medizinischen Einrichtungen verbessert und das Risiko nosokomialer Infektionen gemäß § 23 Infektionsschutzgesetz (IfSG) reduziert. Das Ziel war daher ein kultivierungsunabhängiger Nachweis für die simultane Detektion aller sechs nosokomialen ESKAPE-Erreger (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp.).

Der simultane Nachweis einzelner Zellen beruht auf der isothermalen Konvergenz-Amplifikation spezifischer DNA-Zielsequenzen, die ein einheitliches Produkt (Amplikon) als Summenparameter erzeugt. Dessen Nachweis erfolgt durch einen immobilisierten Fluorow-switch, bei dem das Amplikon die Konformation des Fluorow-switch derart verändert, dass er von der gequenchten (switch off) zu einer fluoreszierenden Konformation schaltet (switch on).

Während der Projektbearbeitung konnten geeignete Zielsequenzen in der 16S rDNA identifiziert und die Konvergenz-Amplifikation erfolgreich entwickelt werden. Durch die Verknüpfung aller Amplifikationsschritte in einer einzigen Reaktion gelang der Nachweis von Zielsequenzkonzentrationen von 2 nM und ermöglichte die Amplifikation von einzelsträngigen Zielsequenzen sowie von kurzen doppelsträngigen PCR-Produkten. Die Differenzierung von DNA lebender und inaktivierter ESKAPE-Erreger durch Behandlung mit Propidiummonoazid (PMA) wurde erfolgreich demonstriert.

Convergence amplification and fluorow-switch detection for the determination of hygiene-relevant ESKAPE pathogens

IGF 21186 N

Since cleaning and hygiene service providers are increasingly entrusted with surface disinfection in medical facilities they should be provided with an inexpensive rapid test device for checking the hygiene status of disinfected surfaces in-house. On the one hand, the detection results in economic advantages for cleaning and hygiene service providers, and on the other hand it improves hygiene in medical facilities and reduces the risk of nosocomial infections in accordance with § 23 of the German Infection Protection Act (IfSG). The goal was therefore to develop a cultivation-independent test for simultaneous detection of all six nosocomial ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.).

The simultaneous detection of individual cells is based on an isothermal convergence amplification of specific DNA target sequences, which produces a uniform product (the amplicon) as a sum parameter. The amplicon itself is detected by an immobilised fluorow-switch in which it changes the conformation of the fluorow-switch in such a way that it switches from a quenched (switch off) to a fluorescent conformation (switch on).

During the project, suitable target sequences were identified in the 16S rDNA and the convergence amplification was successfully developed. By combining both amplification steps in a single reaction, the detection of target sequence concentrations of 2 nM was achieved. The method enabled the amplification of single-stranded target sequences as well as short double-stranded PCR products. Differentiation between DNA of living and inactivated ESKAPE pathogens was successfully demonstrated by applying a propidium monoazide (PMA) treatment.

Fortsetzung auf Seite 2

To be continued on page 2

Fortsetzung:

IGF 21186 N

Der Fluoroswitch wurde modellhaft auf Basis von ssDNA mit terminalen Fluorophoren und Quenchern entwickelt. Dieses Modell wies eine gute Eignung als Fluoroswitch auf. Die Konformationsänderung bei Bindung des Amplikons, die Immobilisierung und die Regeneration durch RNasen konnten experimentell nachgewiesen werden. Zudem gelang die Charakterisierung der Schaltkinetik zwischen OFF- und ON-Zustand. Auch die Kopplung von Goldnanopartikeln (GNP) an ssDNA war erfolgreich und demonstrierte das Quenching von Fluorophoren durch den NSET-Effekt.

Die Forschungsergebnisse zeigen, dass ein Schnelldiagnostiktest von ESKAPE-Erregern durch eine Konvergenz-Amplifikation und nachgeschaltete Fluoroswitch-Detektion möglich ist, sofern die Zugänglichkeit genomischer DNA, z.B. durch eine geeignete Probenvorbereitung, gewährleistet ist.

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

Continued:

IGF 21186 N

The fluoroswitch was developed as a model based on ssDNA with terminal fluorophores and quenchers. This model allowed the in-detail characterisation of its on/off switching kinetics and proved very good suitability as a fluoroswitch. Its conformational change upon binding the amplicon, its immobilisation and its regeneration by RNase treatment could be all demonstrated experimentally. In addition, the coupling of gold nanoparticles (GNP) to ssDNA was successful and it demonstrated the quenching of fluorophores by the NSET effect.

The research results show that rapid detection of ESKAPE pathogens is possible by convergence amplification and downstream fluoroswitch detection, if the accessibility of genomic DNA for amplification is guaranteed, e.g. by a suitable sample preparation.

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

Das IGF-Projekt 21186 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:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

The IGF-project 21186 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.