

Schnelltest für virale Barrierewirkung von OP-Textilien durch Tandem-DNAzym Hyperamplifikation

IGF 21961N

Die Aufbereitung von Mehrweg-Operationstextilien stellt für textile Dienstleister ein wichtiges und wirtschaftlich interessantes Marktsegment dar. Im Rahmen der Aufbereitung muss nachgewiesen werden, dass die OP-Textilien den Anforderungen internationaler Prüfnormen gerecht werden. Aufgrund aktueller Entwicklungen im Bereich der Normung werden zukünftig weitere Prüfungen notwendig, welche bei der Aufbereitung von Mehrweg-OP-Textilien zusätzlich durchzuführen sind. Die EN 13795 wird zukünftig durch die ISO-Norm 20384 ersetzt und um eine Prüfung der Barrierewirkung von OP-Textilien gegenüber Viren ergänzt.

Die Prüfmethode entspricht ASTM F 1671 unter Verwendung des Prüfvirus Phi-X174 und sieht eine komplexe mikrobiologische Auswertung durch externe Fachlabore vor. Diese wird mit einer Bearbeitungszeit von mindestens zwei Werktagen und dementsprechend mit hohen Kosten verbunden sein. Es besteht daher die dringende Notwendigkeit, einen einfach durchführbaren Schnelltest zur Kontrolle der viralen Barriereigenschaften von OP-Textilien zu entwickeln, der es ermöglicht, normäquivalente Kontrollen innerbetrieblich eigenständig durchzuführen und die anfallenden Prüfkosten substantiell zu reduzieren.

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines Schnelltests für die viralen Barriereigenschaften von OP-Textilien äquivalent zur Prüfung nach ASTM F1671. Der Schnelltest basiert auf dem Ersatz des normativen Prüfvirus Phi-X 174 durch Goldnanopartikel (Surrogat-GNP), deren Oberfläche mit Initiator-DNA funktionalisiert ist. Penetrierte Surrogat-GNP werden in einer Prüflösung aufgefangen, binden an Matrizen-DNA und lösen eine Verstärkungskaskade (RCA) aus, welche zur Bildung einer hohen Anzahl von Tandem-DNAzymen mit 2 enthaltenen DNase-Funktionen (DNase A und DNase B) führt.

Rapid testing of viral barrier efficacy of surgical textiles by tandem DNAzyme hyperamplification

IGF 21961N

The reprocessing of reusable surgical textiles represents an important and economically interesting market for textile service providers. Within the scope of reprocessing, it must be verified that surgical textiles meet the requirements of international testing standards. Due to current developments in the field of standardisation, additional tests will be necessary in the future which have to be applied on reprocessed reusable surgical textiles. EN 13795 is currently being replaced by the ISO standard 20384 and supplemented by testing surgical textiles on their barrier efficacy against viruses.

The corresponding method of testing is based on ASTM F 1671 which uses the test virus Phi-X174 but necessitates complex and time-consuming microbiological evaluation by external specialist laboratories. This will involve a processing time of at least two working days and consequently high costs. Therefore, there is an urgent need to develop an easy-to-perform rapid test to verify the viral barrier properties of reusable surgical textiles and to carry out standard-equivalent checks in-house while substantially reducing the testing costs incurred.

The aim of the project was to develop a rapid test for viral barrier properties of surgical textiles equivalent to the test according to ASTM F1671. The rapid test is based on the replacement of the normative test virus Phi-X 174 by gold nanoparticles (surrogate-GNP) whose surface is functionalised with initiator-DNA. Penetrated surrogate GNP are collected in a test solution, bind to matrix DNA and trigger an amplification cascade (RCA), which leads to the formation of a high number of tandem-DNAzymes with 2 contained DNase functions (DNase A and DNase B).

Fortsetzung auf Seite 2

To be continued on page 2

Fortsetzung:

IGF 21961 N

Durch die DNase A werden die einzelnen Tandem-DNAzyme aus dem linearen RCA-Produkt freigesetzt und weitere RCA-Reaktionen an freien zirkulären DNA-Matrizen initiiert („Hyperamplifikation“). Die DNase B katalysiert die Spaltungen von Indikator-DNA auf der Oberfläche von dispergierten Goldnanopartikeln (Indikator-GNP); dies führt zur Aggregation der Indikator-GNP, was zu einer Farbänderung der Prüflösung von rot nach blau aufgrund des Oberflächen-Plasmonresonanz-Effekts führt.

Zur Realisierung des Surrogatsystems wurden mit Initiator DNA ausgerüstete Gold Nanopartikel (GNP) mit definierten Abmessungen von 30 nm entwickelt, welche den normativen Prüfvirus Phi-X174 ersetzen. Die Initiator-DNA wurde so designt, dass sie zusammen mit der entwickelten Matrizen-DNA eine RCA auslöste, wodurch die Tandem-DNAzym-Einheiten in großer Anzahl produziert wurden. Pro codierendem Matrizen-Molekül ließen sich ca. 1.000 Einheiten generieren. Um die Tandem-DNAzym-Einheiten aus dieser repetitiven Sequenz zu lösen, wurde die DNase A so entwickelt, dass sie die eigene Sequenz bindet und schneidet, was erfolgreich nachgewiesen werden konnte.

Eine gleichzeitige Synthese durch RCA und Spaltung der gebildeten Tandem-DNAzym-Einheiten durch DNase A konnte aufgrund notwendiger unterschiedlicher Pufferbedingungen noch nicht erzielt werden, erscheint jedoch zukünftig durch Entwicklung alternativer Puffersysteme umsetzbar, so dass eine hohe Zahl von Tandem-DNAzym-Einheiten mit dem enthaltenen DNAzym B synthetisiert werden kann.

Das DNAzym B wurde so designt, dass es die sogenannte Substrat-DNA schneidet. Diese wurde auf Indikator-GNP gebunden, so dass diese Indikator-GNP in Dispersion stabilisiert wurden und damit ihre typische rote Farbe aufwiesen. Indikator-GNP ohne DNA agglomerierten unter den Reaktionsbedingungen, was zu dem signalgebenden Farbumschlag nach blau führte. Für die Messungen der Penetration der Surrogatpartikel durch die OP-Textilien wurde eine Apparatur (Funktionsmuster) entwickelt, die das Prüftextil aufnahm.

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

Continued:

IGF 21961 N

DNase A releases the individual tandem DNA enzymes from the linear RCA product and initiates further RCA reactions on free circular DNA matrices ("hyperamplification"). DNase B catalyses the cleavages of indicator-DNA on the surface of dispersed gold nanoparticles (indicator-GNP); this leads to aggregation of the indicator-GNP, resulting in a colour change of the test solution from red to blue due to the surface plasmon resonance effect.

For realising the surrogate system, Initiator-DNA equipped nanoparticles (GNP) with defined dimensions of 30 nm were developed to replace the normative test virus Phi-X174. This initiator-DNA was designed to start an RCA together with the developed matrix-DNA which led to the production of a large number of tandem DNAzyme units. For each matrix molecule around 1,000 units have been generated. To release the individual tandem DNA units from this repetitive sequence the DNase A was developed with a cleavage site in its own sequence. The activity of DNase A has been verified.

Simultaneous synthesis by RCA and DNase A mediated cleavage of the tandem DNAzyme units could not yet be achieved due to the different buffer conditions required, but appears to be feasible in the future by developing alternative buffer systems so that a high number of tandem DNAzyme units can be synthesised with the DNAzyme B contained.

The DNAzyme B was designed to cut the so-called substrate DNA. This was bound to indicator-GNP so that these indicator-GNP were stabilised in dispersion and thus displayed their typical red colour. Indicator-GNP without DNA agglomerated under the reaction conditions, which led to the signalling colour change to blue. To measure the penetration of the surrogate particles through the surgical textiles, an apparatus (functional sample) was developed to hold the test textile.

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

Das IGF-Projekt 21961 N der Forschungsvereinigung Forschungskuratorium Textil e.V., Reinhardtstraße 14-16, 10117 Berlin, wurde 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 21961 N of the research association Forschungskuratorium Textil e.V., Reinhardtstr. 14-16, D-10177 Berlin, was supported 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.