

**„Single tube“ Test zur simultanen Detektion von
parasitären Mehrfachinfektionen mittels
Durchfluss-Zytometrie**

Dr. Andrea Kreidenweiss

Institut für Tropenmedizin

Universität Tübingen

Ko-Infektionen in Subsahara Afrika

- *neglected tropical diseases* (Schistosomiasis, intestinale Helminthosen, Onchozerkose, Leishmaniose, u.a):: niedrige Mortalitätsrate aber hohe Morbiditätsrate
- Kinder und Schwangere
- geographische Überlappung der Parasitosen
- Mehrfachinfektionen sind häufig
- kaum berücksichtigt in Klinik und Forschung
- Klinik: Krankheitsverlauf, unbekannte Nebeneffekte, etc.
- Forschung: Immunantwort, etc.
- erfordert breites diagnostisches Repertoire

„Single tube“ Test

Ziel: Entwicklung eines relativ einfachen diagnostischen Tests, zum simultanen Nachweis von

- verschiedener Parasitenspezies

*Schistosomen (S. haematobium, S. mansoni),
Plasmodien (P. falciparum, nicht-falciparum Arten)
und Ascaris lumbricoides*

- in einer einzigen Patientenprobe (geringen Volumens)

Serum, 25µl

- in einem Reaktionsgefäß

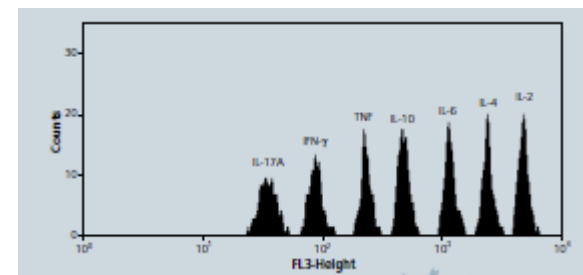
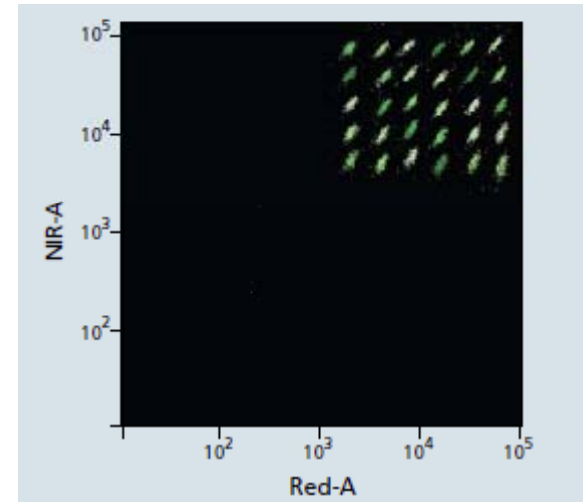
FACS-Röhrchen

Prinzip des „single tube“ Tests

Sandwich-Immunoassay basierend auf kleinen fluoreszierenden Kügelchen (Polystyrene, 7,5 μm , sog. *beads*), die im Durchfluss-Zytometer analysiert werden

Prinzip des „single tube“ Tests

1. *beads* in unterschiedlicher intrinsischer Fluoreszenzintensität
2. *capture*-Antikörper (Erreger-spezifisch)
3. Multiplexen
4. Serum (enthält Erreger-Antigene)
5. Detektionsantikörper (PE)
6. Analyse im FACS-Gerät



Strategie

- direktes Nachweisverfahren – indirekter Test
- direkter Test (Nachweis von Erregerantigenen) wird favorisiert:

aktueller Infektionsstatus

falsch-positive Ergebnisse reduziert

⇒ Grundlage: gutes *capture/detection* Antikörperpaar (ELISA)

Schistosomen

(S. haematobium, S. mansoni)

Strategie	Nachweis von
Direkter Test:	Circulating cationic antigen (CAA)
Indirekter Test:	Antikörper gegen <ul style="list-style-type: none">• crude soluble egg antigen (SEA)• purified egg antigen (CEF6)

Malaria

(*P. falciparum* und nicht-falciparum Arten)

Strategie	Nachweis von
Direkter Test:	<ul style="list-style-type: none">• plasm. Laktat-Dehydrogenase (pLDH)• Aldolase• (Histidin-reiches Protein 2 (HRP2))
Indirekter Test:	Antikörper gegen <ul style="list-style-type: none">• rohe Parasitenextrakte .

Ascaris lumbricoides

Strategie	Nachweis von
Direkter Test:	?
Indirekter Test:	Antikörper gegen • gereinigtes somatisches Antigen (pSAg) ✓

Alternative: Antikörperherstellung

Gewinnung der Antigene zur Immunisierung:

- Parasitenextrakte (roh oder aufgereinigt)
- Herstellung Epitope spezifischer Antigene mittels TNT (z.B. Wheat Germ) und anschließende Aufreinigung

Arbeitspakete

Etablierung des Tests in Tübingen

- Etablierung der Einzeltests
 - Identifizierung der Antikörperpaare bzw. Beschichtungsantigene (Herstellung?)
 - Optimierung der Testparameter (Sensitivität, Spezifität)
- Multiplexen der Einfachtests (schrittweise)
- Validierung des Tests mit Kulturproben (*P. falciparum*, *S. mansoni*) und anonymisierten Proben von Patienten der tropenmedizinischen Ambulanz bzw. der afrikanischen Kooperationspartner in Gabun und Togo

Gabun – Lambaréné – Albert Schweitzer Hospital



Togo – Sokodé – Centre Hospitalier Régional



Arbeitspakete

Validierung des Tests in Gabun und Togo

- Prospektive Studie zum Vergleich der Sensitivität und Spezifität des Tests mit der klassischen Diagnostik
- Anwendbarkeit in der klinischen Diagnostik

Anwendungsfelder des Tests

- Untersuchungen zur Immunreaktion bei polyparasitären Infektionen
- Epidemiologische Untersuchungen zu polyparasitären Infektionen bei Schulkindern und Erwachsenen
- Therapieverlaufskontrolle in anti-Helminthen Programmen
- Erweiterung des Test hinsichtlich anderer Parasitosen und Patientenproben (Vollblut, Urin, Stuhl)