

Schlussbericht

Infectotest FKZ 161B0861B

„KMU-Innovativ-23: Infectotest – One-Stop-Plattform für die hochsensitive Multispezies-Diagnostik von Malaria am Point-of-Care“

Laufzeit des Vorhabens: 16.09.2019 – 15.03.2024

I. Kurze Darstellung

I.1. Aufgabenstellung

Die Zendia GmbH hatte im Vorprojekt dank einer BMBF-Förderung erfolgreich ein erstes Funktionsmuster für die Point-of-Care-Diagnostik für den Erreger *Plasmodium falciparum* generiert.

Das damalige Infectotest-System arbeitete mit Vollblut aus der Fingerbeere und beruht auf der immunomagnetischen Anreicherung und Immunfluoreszenzfärbung von *Plasmodium falciparum* in einem einfachen mikrofluidischen Chip, der direkten Visualisierung mittels eines kostengünstigen Fluoreszenzmikroskopes mit integrierter Bildauswertung und der eHealth-Datenverarbeitung mittels eines Smartphones.

Die Infectotest®-Diagnostik ermöglicht einen neuartigen diagnostischen Schnelltest am Point-of-Care für den spezifischen, sensitiven und quantitativen Nachweis von einzelnen Erregern innerhalb weniger Minuten. Die Infectotest®-Technologie ist zudem breitenwirksam anwendbar. Sie lässt sich nicht nur zum Nachweis von Malaria, sondern auch einer Vielzahl weiterer intrazellulärer Parasiten einsetzen. Die Grundlagen der Infectotest®-Technologie wurden als Proof-of-Concept am Beispiel von *P. falciparum* etabliert.

Zielsetzung dieses Vorhabens war es, auf Basis der Infectotest®-Technologie ein hochempfindliches Multi-Erreger-Diagnosesystem zum hochspezifischen Nachweis von *P. falciparum* und *P. vivax* zu realisieren, um eine hochsensitive Multispezies-Diagnostik für die genannten Erreger bereitzustellen und außerdem erstmalig zuverlässig Malaria bei Schwangeren und asymptomatische Infektionen am Point-of-Care zu diagnostizieren.

Kern der geplanten Arbeiten im Vorhaben waren:

- Erhöhung der Sensitivität und Verringerung der Messzeit des Infectotests für *P. falciparum* und nachfolgend *P. vivax*
- Erarbeiten eines Verfahrens für die zeitlich begrenzte Kultur von *P. vivax* aus Patientenproben
- Generierung einer Methode zur Lyse von *P. vivax*
- Auswahl geeigneter parasitärer Antigene und spezifischer monoklonaler Antikörper für *P. vivax*
- Erarbeitung eines Multiplex-Nachweises im Immune Fluorescence Assay (IFA) für *P. falciparum* und *P. vivax*
- Erstellung eines Multiplex-Diagnosesystems mit Mikrofluidik, homogenem IFA, 2-Kanal-Messgerät und 2-Spezies-Bildauswertung
- Evaluation des Multiplex-Nachweises und der Multiplex-Diagnostik mit Patientenproben

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Ziel des Start-ups Zendia GmbH ist, den Point-of-Care-Markt für innovative diagnostische Systeme durch die Entwicklung neuer Technologien zu revolutionieren. Selektivität und Spezifität sollten gegenüber existierenden Systemen erhöht werden, ohne mehr Probenvolumen oder mehr Durchführungszeit zu benötigen. Die Einfachheit der Anwendung sollte verbessert, das Fehlbedienungsrisiko hingegen verringert werden, damit die Testung zuverlässig von Laien durchgeführt werden kann. Das Resultat sollte schließlich nicht nur verständlich angezeigt, sondern auch per verschlüsselter drahtloser Übertragungstechnik, z.B. Mobilfunk an medizinisches Fachpersonal übermittelt werden können.

Die Zendia GmbH war Erfinder des zur Anwendung kommenden diagnostischen Messprinzips und außerdem Initiator und Koordinator des beantragten Verbundprojektes. Die avisierte Plattform (Abb. 1) beinhaltete einen Mikrofluidikchip zur Aufnahme eines Tropfen Blut aus der Fingerbeere, einen biochemischen Assay aus Immunocapture der Erreger und ihrer Fluoreszenzmarkierung mittels neuartiger Fluoreszenzmarker, ein Fluoreszenz-Mikroskopie-Modul mit eingebauter Kamera und Software auf einem angekoppelten Smartphone für die Steuerung und Mustererkennung verschiedener Erreger.

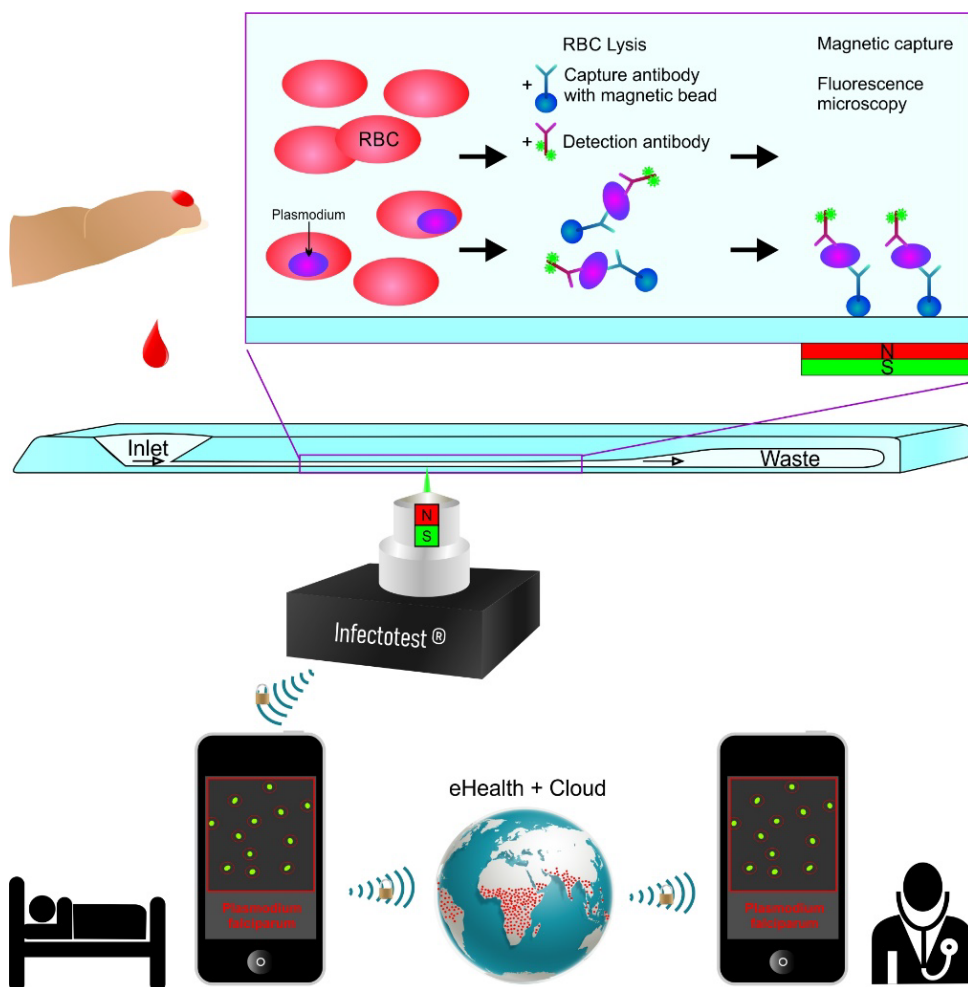


Abb. 2: Version des Infectotest-Schemas bei Projektbeginn

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

| | Monat ab Projektbeginn | | | | | | | | | | | |
|----|------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AP | 3. | 6. | 9. | 12. | 15. | 18. | 21. | 24. | 27. | 30. | 33. | 36. |
| 1 | | | | | M1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | M2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | M3 | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | M4 | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | M5 | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | M6 |
| 10 | | | | | | | | | | | | |

Tab. 1: Balkenplan mit Meilensteinen

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Projekt avisierte u.a. die Erstellung von Funktionsmustern aller Module ohne spezielle Vorarbeiten.

Hinsichtlich der IP setzt die Zendia GmbH auf eine Mischung aus größtmöglichem rechtlichem Schutz und der freien Veröffentlichung ihrer Daten. Mit ihren IP-Rechten schützt Zendia die technologischen Grundlagen des InfectoTests; mit der Veröffentlichung von Daten aus klinischen Leistungsstudien und ähnlichen Daten will das Unternehmen Vertrauen schaffen und Kunden, nationale und internationale Organisationen sowie Zulassungsbehörden von der einzigartigen Leistung des InfectoTest, den Möglichkeiten und seiner allgemeinen Zuverlässigkeit zu überzeugen.

Es waren für die Komponenten und die Infectotest®-Plattform trotz gewissenhaften Recherchen (Freedom-to-operate-Analyse) keine erteilten Schutzrechte Dritter bekannt, die Produktion und Vertrieb im Wege stünden.

Es wurden alle verfügbaren Informations- und Dokumentationsquellen und die enthaltene Fachliteratur eingesetzt (pubmed, ejournals, depatisnet, google etc.).

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Projektbezogene Zusammenarbeit mit Universitäten in Malaria endemischen Gebieten (Uganda, Brasilien) sowie der Charité Berlin und Uniklinikum Frankfurt.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Projektplanung zeigt drei Komponenten auf:

- A) Übertragung des InfectoTest-Prinzips auf andere Malaria-Erreger wie *P. vivax* und *P. berghei*,
- B) Erhöhung der Sensitivität des InfectoTest-Prinzips für *P. falciparum*,

C) Erstellung eines Multiplex-Funktionsmusters zur parallelen Detektion mehrerer Erreger und klinische Validierung und

A) Arbeitspakete 1,2,5,6: Übertragung des InfectoTest-Prinzips auf *P. vivax* bzw. *P. berghei*

P. vivax mit 7,5 Mio. Infektionen verursacht nach *P. falciparum* mit 219 Mio. Infektionen in 2017 am zweithäufigsten Malaria. Deshalb soll ein Multiplex-Infectedtest für diese beiden Erreger erstellt werden.

P. falciparum kann in Laborkultur über viele Generationen vermehrt werden, so dass in vitro Versuche erfolgen können.

Dies ist bis heute bei *P. vivax* nicht möglich. Für Experimente mit *P. vivax* müssen diese also zuerst als Patientenproben erhalten werden. Die Patientenproben mit *P. vivax* sollten von der Tropenmedizinischen Ambulanz im Hause oder in größerer Anzahl von internationalen Kollaborationspartnern in Südamerika und/ oder Südostasien erhalten werden, welches entweder durch persönliche Vorsprache in einer Tropenlinik und/ oder über eine Vermittlung durch die FIND erreicht werden sollte. Herr Prof. Frischknecht hat außerdem während einer Dienstreise in Äthiopien Kontakte zu der Forschungsgruppe von Prof. Asrat Hailu der Addis Abbeba Universität in Äthiopien, wo jährlich 700.000 *P. vivax* Infektionen auftreten und welche mit *P. vivax* arbeiten, hergestellt.

Unter Führung der Uniklinik Heidelberg wurden vorbereitende Arbeiten und Recherchen durchgeführt. So konnte der Ethikantrag überarbeitet und eine Bewilligung erreicht werden, so dass ab 2020 Patientenproben mit Malaria aus der diagnostischen Ambulanz der Parasitologie als auch aus dem Diagnostikzentrum des Uniklinikums erhalten werden sollten. Leider sind auf Grund der Reiseverbote in der Corona-Pandemie keine Malaria-infizierten Patienten in Heidelberg behandelt worden.

Herr Prof. Ferreira, Sao Paulo, Brasilien hat über eigene klinische Studien im Endemiegebiet in Mancio Lima Zugang zu mit *P. falciparum* und *P. vivax* infiziertem Patientenblut. Er hat angeboten, uns in der lokalen Infektionszeit von Januar bis April eine klinische Studie in Mancio Lima und in seinem Labor in Sao Paulo zu ermöglichen und uns fixierte Proben für Immunfluoreszenzen zuzuschicken.

Leider hat die Corona-Pandemie alle Reisen nach Brasilien verhindert und die Zusammenarbeit ausgebremst, da Prof. Ferreira in 2020 zusätzlich an Sars-CoV-2 geforscht hat.

Auf Grund der Corona-Pandemie konnten also jahrelang keine *P. vivax* Patientenproben erhalten werden. Der Erreger *P. berghei* ist als Verursacher der Malaria bei der Maus dem Erreger *P. vivax* recht ähnlich, und konnte in Labormäusen vermehrt werden und die geplanten Experimente konnten somit in der Arbeitsgruppe Frischknecht (UKHD) durchgeführt werden.

Zusätzlich wurde der Erreger *P. knowlesi* analysiert, der ebenfalls eng mit *P. vivax* verwandt ist und für den ein Zellkultursystem etabliert ist.

Beide Erreger konnten mittels Saponin-Behandlung freigesetzt werden und die erzielten Raten wurden mit denen für *P. falciparum* verglichen (Abbildung 1).

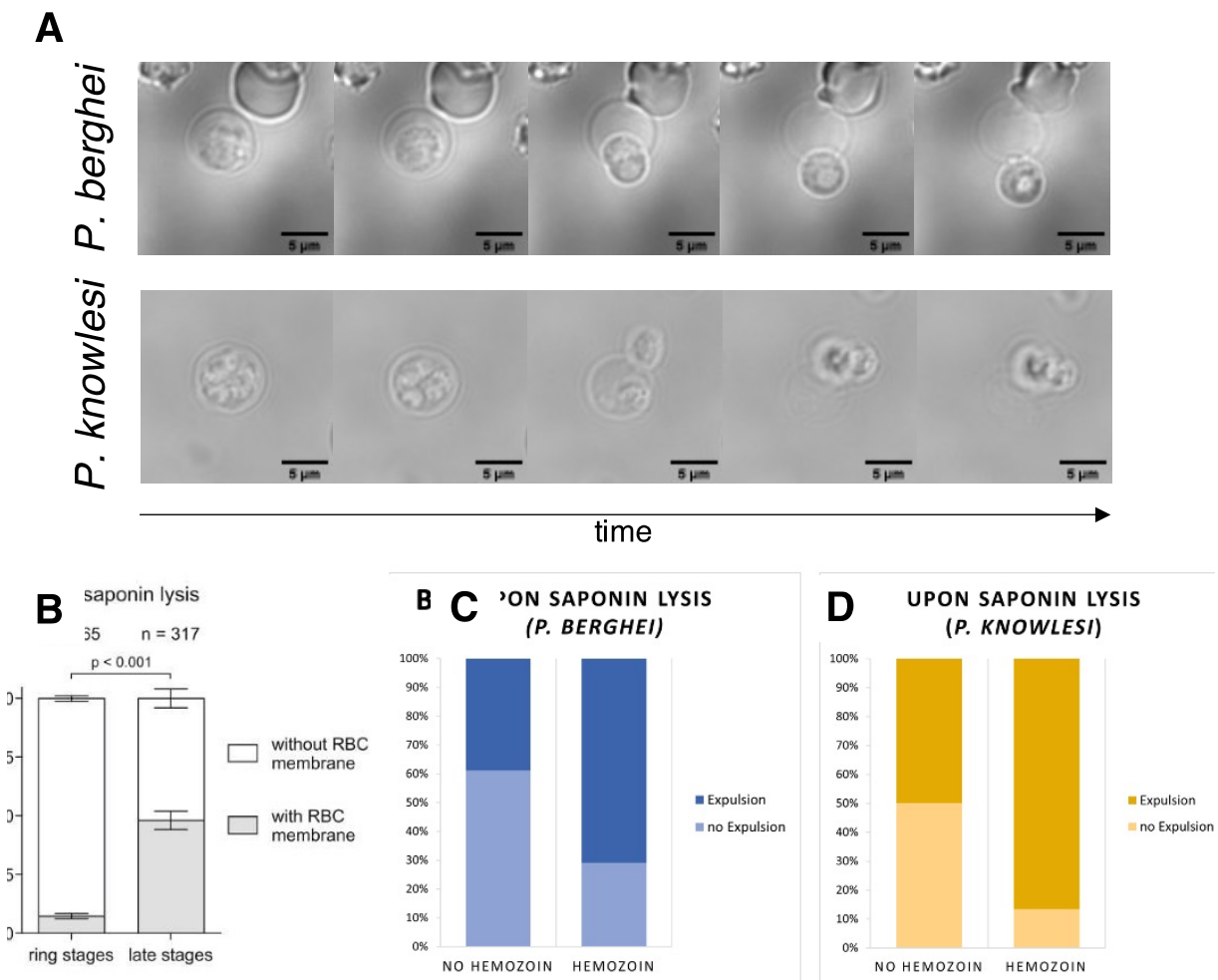


Abb. 1. Saponin-Lyse setzt *P. berghei* und *P. knowlesi* Parasiten frei. A Die Saponin-Lyse von mit *P. berghei* und *P. knowlesi* infizierten roten Blutkörperchen treibt die Parasiten aus der Wirtszelle. B Frühere Befunde zeigten, dass ein Großteil der frühen (Ring-)Stadien von *P. falciparum* bei der Saponin-Lyse ausgestoßen wird (bzw. ohne RBC-Membran). Etwa die Hälfte der späten Stadien wurde nicht ausgestoßen (also mit RBC-Membran). C, D Die Ergebnisse bei *P. berghei* und *P. knowlesi* verhalten sich ähnlich. Bei beiden Spezies werden 40-50 % der frühen Stadien (ohne Hämozoïn) bei der Saponin-Lyse aus der roten Blutzelle ausgestoßen. Interessanterweise wurden auch im Gegensatz zu *P. falciparum* auch die späten Stadien (mit Hämozoïn) bei den meisten beobachteten Ereignissen ausgeschieden.

In AP2 wurde für *P. knowlesi* und *P. berghei* in 2022 erfolgreich ein Lyseverfahren entwickelt. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass sich ebenfalls *P. vivax* mittels Saponin-Lyse freisetzen und detektieren lässt. Dies konnte auf Grund von Mangel an *P. vivax* infizierten Patientenproben nicht abschließend evaluiert werden.

Immunfärbung:

Auf Grund der Corona-Pandemie bestand nur sehr begrenzt Zugang zu *P. vivax* Parasiten, so dass erst mit *P. berghei* und *P. knowlesi* gearbeitet wurde. Es wurden verschiedene Antikörper für eine Fluoreszenzfärbung der Parasiten gefunden. Besonders hilfreich erwies sich hier ein Antikörper, der das exportierte Protein 2 detektiert (Abbildung 2 A). Des Weiteren wurden mittels bioinformatischer Analyse weiteren Kandidatenantigene identifiziert, die im fertigen Test eine Unterscheidung von *P. vivax* und anderen Plasmodium Spezies ermöglichen (Abbildung 2 B).

Es konnte gezeigt werden, dass mit einem Antikörper gegen EXP2 auch *P. knowlesi* und *P. berghei* diagnostiziert werden können. Diese Ergebnisse unterstützten, dass sich *P. vivax* detektieren lässt und dass sich *P. vivax* von anderen Plasmodium Spezies mittels spezifischer Antikörper unterscheiden lässt.

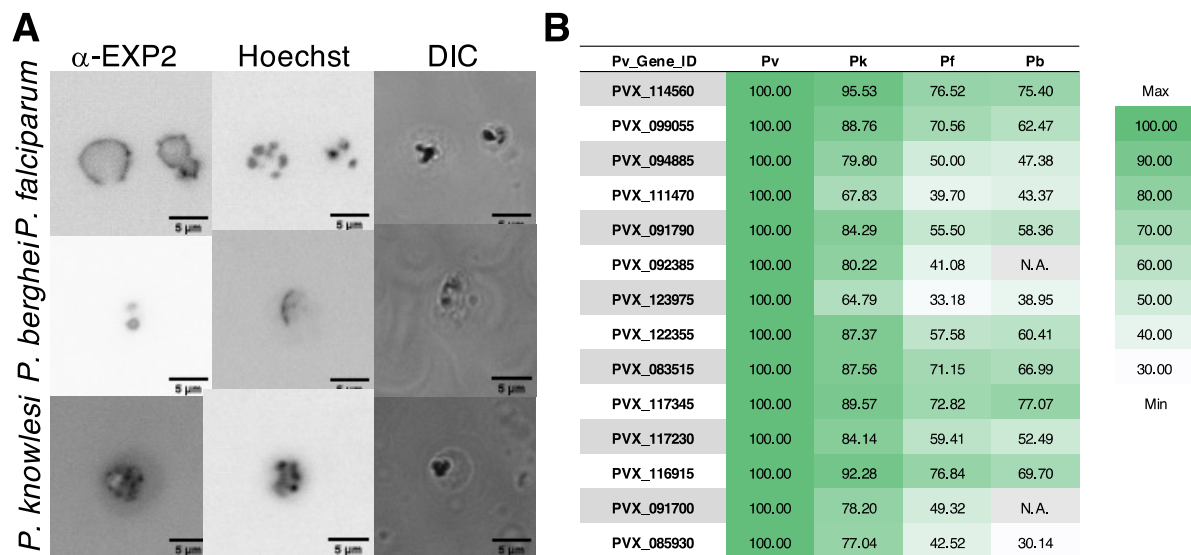


Abb. 2. Anti-EXP2 Antikörper detektieren *P. berghei* und *P. knowlesi*. A Fluorophor-gekoppelte anti-EXP2 Antikörper detektieren EXP2 nach der Saponin-Lyse. Hoechst-Färbung der parasitären DNA bestätigt die Anwesenheit von Parasiten. B Identitätsmatrix identifizierte Antigene die mit der parasitophoren Vakuole assoziiert sind und die *P. vivax* von anderen Plasmodium spp. unterscheiden.

Dieser anti-EXP2-Antikörper zeigte aber bei der Immunfluoreszenz mit *P. vivax* später leider keine erfolgreiche Färbung, so dass andere Antikörper evaluiert wurden.

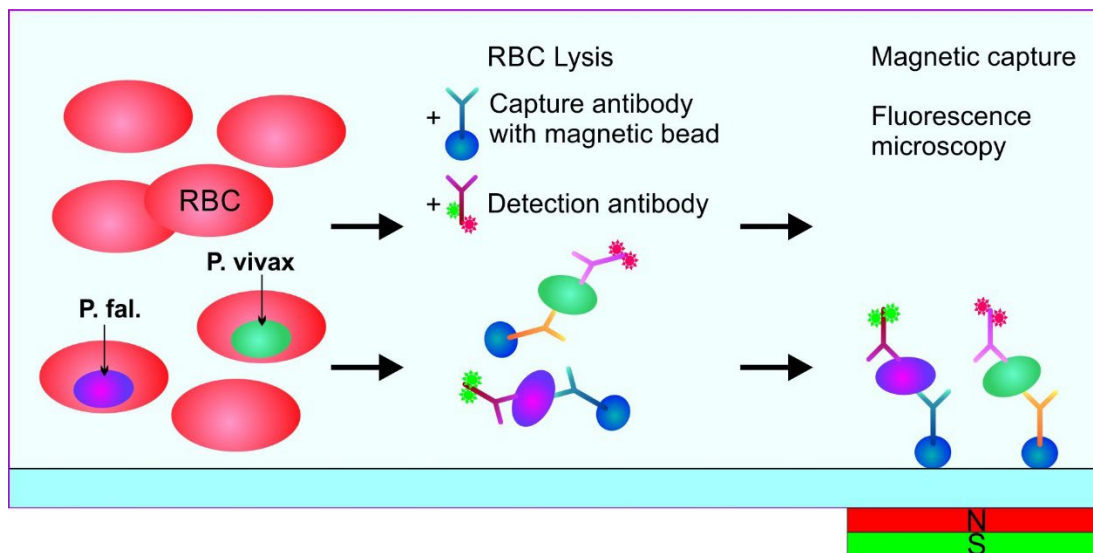
Diese Ergebnisse unterstützen, dass sich *P. vivax* detektieren lässt und dass sich *P. vivax* von anderen Plasmodium Spezies mittels spezifischer Antikörper unterscheiden lässt. Außerdem wurde unsere Hypothese bestätigt, dass *P. berghei* und *P. knowlesi* exzellente Modelle für *P. vivax* darstellen. Mit diesen Modellen konnten auch in Abwesenheit von *P. vivax* Proben bereits wesentliche Fortschritte bei der Entwicklung eines diagnostischen Tests für *P. vivax* gemacht werden.

B) Erhöhung der Sensitivität des InfectoTest-Prinzips für *P. falciparum*

Die bisherige Nachweisgrenze von *P. falciparum* im Infectotest® Funktionsmuster vor Projektbeginn lag bei ~500 Erregern pro μl . Von der WHO für eine hochsensitive Diagnostik gefordert ist jedoch eine Nachweisgrenze von < 10 Erregern pro μl .

Ziel war also die Plasmodien als Einzelzellen auf dem Bildfeld zu immobilisieren und mikroskopisch nachzuweisen, so dass die Nachweisgrenze zuerst für *P. falciparum* gesenkt und später auf *P. vivax* übertragen wird.

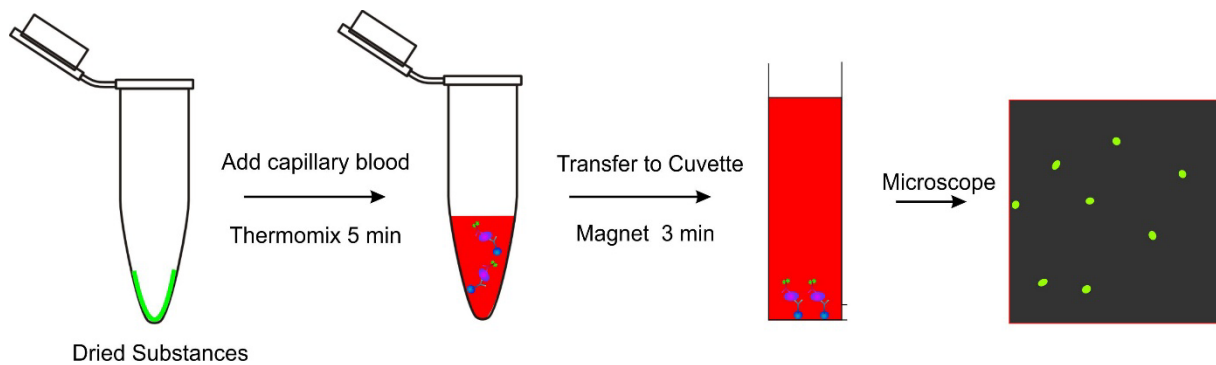
Pro Mikroliter Vollblut sollten also < 10 Erreger im Hintergrund von ~6 Mio. Erythrozyten detektiert werden. Diese werden in einem immunologischen Sandwich mit einem an Magnetpartikel gekoppelten Fängerantikörper gebunden, auf einer Detektionsoberfläche magnetisch gefangen und somit konzentriert und außerdem mit einem Farbe-Antikörper in einem homogenen IFA fluoreszenzgefärbt.



Für die mikroskopische Analyse musste in 2020 ein geeignetes Fluoreszenzmikroskop mit weitgehender Automatisierung BZ-X800E der Firma Keyence Corporation angeschafft werden.

Bisher wurden die Proben in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und inkubiert und dann für das magnetische Fangen und die mikroskopische Detektion in eine Mikroküvette transferiert. Dafür wurde ein mikrofluidischer U-förmiger Chip der Microfluidik ChipShop GmbH verwendet, welcher einen Kanal enthält, der mit zwei Oliven befüllt werden kann.

Der präferierte Chip für ein späteres Produkt soll ja eine Art Mikroküvette enthalten, in die die prozessierte Probe transferiert wird, wofür hier vorerst die Oliven benutzt werden. Die Magnetpartikel mit den gefangenen Erregern werden magnetisch auf der Bodenfläche als Bildfläche immobilisiert und können dort mikroskopiert werden.



Außerdem wurde in Vorbereitung einer klinischen Machbarkeitsstudie mit Patientenproben die Lyophilisierung der Reagenzien in Reaktionsgefäßen etabliert.

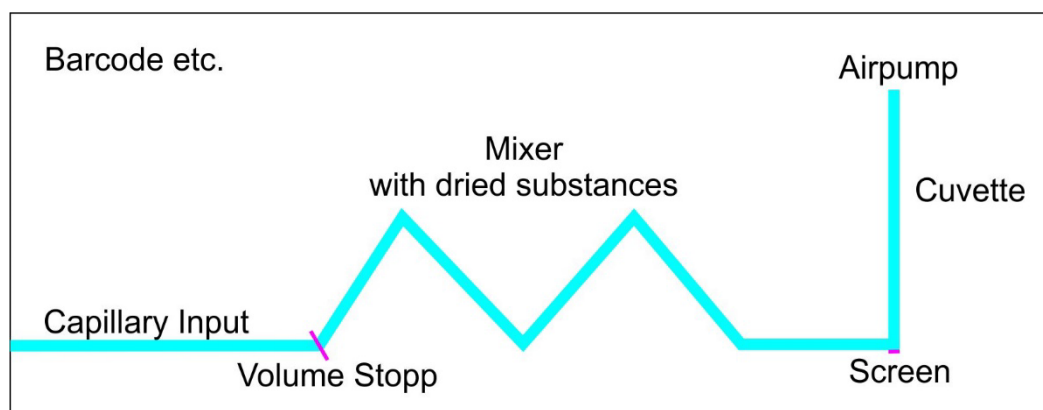
Es zeigt sich jedoch bei weiteren Verdünnungsreihen bis hinunter auf 1 Parasiten auf 6 Mio. Erythrozyten in 1 μl , dass die Genauigkeit der Zellzahlbestimmung und der Verdünnungsschritte nicht ausreicht, um eine exakte Nachweisgrenze anzugeben.

Mit Versuchen zu doppelinfizierten Erythrozyten konnte, mittels FACS-Analysen der Zellzahlen, Evaluation von Zellzählgeräten für Malaria, Etablierung einer automatischen Zellzählung auf dem neuen Keyence Mikroskop und der Etablierung einer qPCR, die Genauigkeit der Zellzahlbestimmung auch in Verdünnungsreihen bis zu einer Parasitämie von 1 p/ μl ausreichend verbessert werden.

Bisher wurden alle flüssigen Reagenzien in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammengeben. Eine Inkubation für 5 min auf einem Thermomixer bewirkt eine Freisetzung der Parasiten aus den infizierten Erythrozyten und die Bildung des Immun-Komplexes nach Überführung in die Mikroküvette zu Fangraten von ca. 30%.

Dieser Liquid-Transfer ist für einen Schnelltest sehr störend.

Aus diesem Grund sollten alle Schritte in einem mikrofluidischem Chip implementiert werden, also das Lösen von eingetrockneten Reagenzien durch Vollblut, sowie Mischen im Chip statt im Thermomixer, sowie magnetisches Fangen und mikroskopische Analyse in einer enthaltenen Mikroküvette.



Für die Mischung im mikrofluidischen Chip als Ersatz für den Thermomixer wurde eine spezielle Mischerstruktur benötigt. Chips mit entsprechenden Mischerstrukturen wie Fischgrättern, Diffusionskanälen und Perlenketten-Strukturen konnten bei Microfluidik ChipShop GmbH erworben werden.

Versuche in linearen Chips, Fischgrät-Mischern und Diffusionskanälen ergaben nur Fangraten von <3 %. Perlenketten-Strukturen erreichten immerhin 10% Fangrate bei mehrmaligem Hin- und Herpumpen, allerdings im Vergleich zu ca. 30% bei Mischen mit dem Thermomixer. Zur Optimierung wurden zahlreiche Versuchsreihen zum Mischen mit Perlenketten-Mischstrukturen durchgeführt. Für ein reproduzierbares Pumpen wurden die mikrofluidischen Pumpen mP6 und mPone der Firma Bartels GmbH eingesetzt und eine Software zur Pumpensteuerung geschrieben, so dass für das Hin- und Herpumpen die Pumpmenge, Anzahl der Pumpvorgänge, Volumen und Anzahl der Richtungsumkehrungen einstellbar ist.

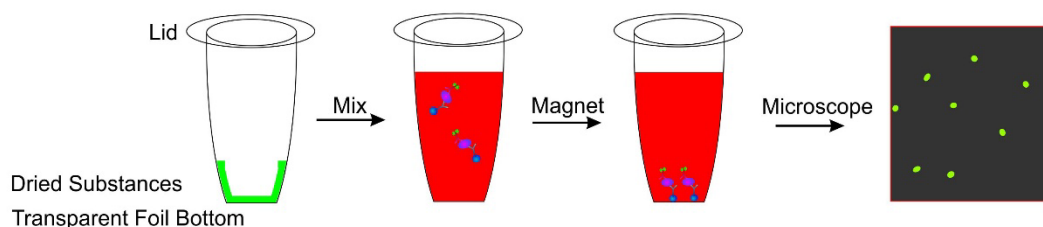
Da nur vereinzelt mit *P. falc.* infiziertes Patientenblut erhalten werden konnte, sollte dies zuerst mit Parasiten aus Kultur gemischt mit Serum und allen Reagenzien evaluiert werden. Die Mischung zeigt ähnliche Viskosität, Hämatokrit etc. Eigenschaften wie infiziertes Patientenblut.

Für entsprechende Versuchsreihen ist eine genaue Bestimmung der Parasitämie sehr wichtig. Es zeigte sich jedoch, dass ihre Bestimmung auf Grund von doppelinfizierten Zellen, ungenauer Zellzählung, Abweichungen beim Pipettieren der viskosen Lösung usw. sehr fehleranfällig ist.

Mit dem in 2020 angeschafften Fluoreszenzmikroskop mit weitgehender Automatisierung BZ-X800 der Firma Keyence Corporation konnte über eine automatisierte Zählung der Erythrozyten in 60 Bildern die Parasitämie der jeweils eingesetzten Kultur viel genauer bestimmt werden.

Es zeigt sich jedoch, dass hierfür eine aufwändige Mischerstruktur und eine genau gesteuerte Pumpe notwendig ist, wodurch ein Chip-Produkt in der Herstellung mindestens \$0,5 kosten würde. Bei einem Marktpreis von \$0,5 bis \$1 scheint dieser Weg nicht lohnend.

Als neuer Lösungsansatz wurde ein Reaktionsgefäß mit optischem Boden angestrebt.



Wir hatten ja schon ein Reaktionsgefäß mit optischem Boden entworfen und mittels 3D Druck gefertigt, in welchem alle Schritte ohne Liquid Transfer erfolgen können.

Es zeigte sich jedoch, dass das Material eine störende Autofluoreszenz aufweist und außerdem beim Lagen-weisen 3D-Druck Stufen in der Schräge entstehen, auf welcher sich die Parasiten beim magnetischen Fangen anreichern und somit für die Detektion verloren sind.

Insgesamt entstand das gewünschte Reaktionsgefäß mit optischem Boden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Mischen zur Aktivierung, das magnetische Fangen als auch der mikroskopische Nachweis funktionierte.

Diese Reaktionsgefäße mit optischem Boden und Deckel wären also für ein Produkt vielversprechend, sofern sie kostengünstig im Spritzguss gefertigt werden können und ein Kunststoff ohne Autofluoreszenz gefunden werden kann.

Für die klinische Validierung wurde mit Malaria infiziertes Patientenblut benötigt.

Es wurden also in Berlin, Frankfurt und Uganda Ethikanträge eingereicht und bewilligt, so dass von der Charité Berlin, der Uniklinik Frankfurt und der Uniklinik Heidelberg ca. zwei Proben Vollblut mit Malaria-Erregern pro Monat erhalten werden konnte.

Es zeigte sich, dass die Parasiten aus Patientenblut im Infectotest gut angereichert und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten. Die Fangraten liegen bei ca. 40 %, d.h. dass von 100 Parasiten im Vollblut 40 Parasiten gefangen und sichtbar gemacht werden.

Für eine weitergehende Evaluation wurde im Mai und Juni 2022 eine klinische Machbarkeitsstudie in Uganda an der Uniklinik Kampala und insbesondere im Endemiegebiet am Krankenhaus „Midas Touch Medical Services“ in Kyenjojo durchgeführt.

Hierfür musste ein transportierbares Mikroskop EVOS M5000 über den Projektpartner Zendia GmbH beschafft werden.

Es konnten ~200 Patientenproben mit Infectotest, RDT, Giemsa-Mikroskopie untersucht und mittels qPCR quantifiziert werden.

Es zeigte sich eine erfolgreiche Testung mit Infectotest mit guter Anreicherung und Sichtbarkeit der Parasiten im Patientenblut und die Möglichkeit zur Quantifizierung der Parasiten durch Auszählen der Punkte in den mikroskopischen Bildern.

Nach Medikamentengabe konnten erste Hinweise auf eine Abnahme der in Infectotest detektierten Parasiten bemerkt werden, was für ein Monitoring des Therapieerfolges im Test auf Medikamentenresistenzen oder Fake-Medikamente nützlich sein wird.

Dieses Konzept sollte für eine weitere Machbarkeitsstudie verfeinert werden, indem ein Kunststoff ohne autofluoreszente Partikel im Spritzguss zu kombinierten Reaktionsgefäßen mit flachem Boden als Sichtfenster für die Mikroskopie verarbeitet werden sollte.

Hierfür konnte die UPT Wodak GmbH für die Herstellung der Reaktionsgefäße gefunden werden. Die ersten gespritzten Funktionsmuster zeigten ein gutes Mischverhalten und gute optische Eigenschaften für die Fluoreszenzdetektion durch den optischen Boden, enthielten allerdings noch eine Schmelzlinie im Boden, die einen blinden Fleck erzeugte. Dieses Problem konnte in der nächsten Generation behoben werden, so dass in 2023 funktionale Reaktionsgefäße für eine weitere Machbarkeitsstudie in Uganda hergestellt werden.

Es wurden 250 Patientenproben von Malaria-Patienten untersucht, bei denen die Malaria-Parasiten erfolgreich mit InfectoTest nachgewiesen werden konnten.

Es zeigten sich in dieser zweiten Studie in Uganda jedoch zwei Probleme: 1. Autofluoreszenz durch die Patientenproben und 2. Für eine Bestimmung der Sensitivität zu hohe Parasitenspiegel.

1. Infectotest funktionierte mit Fluoreszenzdetektion im grünen Wellenlängen-Bereich. In diesem Bereich wurden leider autofluoreszente Störsignale durch Blutproteine, bei der Blutentnahme erhaltene Hautzellen, Staub und Verunreinigungen in den Plastikchips beobachtet werden.

Die Autofluoreszenz von Blut, Hautzellen und Verunreinigungen wurde weiter untersucht. Es zeigte sich, dass diese Autofluoreszenz in allen sichtbaren Wellenlängenbereichen von UV bis rot auftritt und die Parasiten deshalb nicht eindeutig identifiziert werden können und die Negativkontrollen ohne Parasiten auch Fehlsignale zeigten. Dies führt in der Diagnostik später zu Falsch-Positiven und ist nicht tragbar.

Aus diesem Grund wurden 16 Fluoreszenz-Farbstoffe im NIR-Bereich erfolgreich evaluiert und die Mikroskope entsprechend umgerüstet. Es zeigten sich klare Signale der Parasiten mit keiner bis sehr geringer Autofluoreszenz durch Verunreinigungen und negativen Negativkontrollen.

2. Die symptomatischen Patienten in Uganda zeigen vorwiegend hohe Parasitenspiegel. Ziel war aber die Absenkung der Nachweisgrenze auf < 10 Parasiten pro Mikroliter. Für diese Untersuchung wurden also entsprechende Proben asymptomatischer Träger benötigt. In Endemiegebieten tragen rund 25 % der Menschen den Malaria-Parasiten in sich, bemerken aber keine Symptome. Die Parasitenspiegel sind meist niedriger als in symptomatischen Patienten.

Zur Validierung wurde eine klinische Studie in Mali initiiert. Mali hat im Gegensatz zu Uganda eine saisonale Malariaverbreitung, so dass in der Trockenzeit von November bis Mai keine Mücken und somit keine Neuinfektionen auftreten. Die Parasiten überdauern diese Trockenzeit in asymptomatischen Trägern und zwar mit sinkenden Parasitenspiegeln. Es wurden zahlreiche Patienten mit Parasitenspiegeln im gewünschten Bereich von 1 bis 100 Parasiten pro Mikroliter erwartet, um die Nachweisgrenze zu bestimmen.

Es wurden zwei Studien direkt nach Ende der Fördermaßnahme durchgeführt. Die Ergebnisse sind weiter unten dargestellt.

Parallel zur Entwicklung der Diagnostikstrategie in Probenröhrchen mit optischem Boden statt mit mikrofluidischen Chips, wurden eine Verbesserung der Fangrate und der Nachweisgrenze durch Optimierung des Immun-Sandwiches angestrebt.

Nachdem magnetische Beads, eine effiziente Kopplungsmethode, optimale Magneten bis hin zu einem Verfahren der Lyophilisation aller Reagenzien etc. evaluiert wurden, wurde eine erste Machbarkeitsstudie mit Patienten in Endemiegebieten avisiert. Durch die Corona-Pandemie wurden in Heidelberg nur vereinzelt Malaria-Patienten behandelt und Reisen in Endemiegebiete waren weiterhin erschwert.

Außerdem zeigte sich mit den einzelnen Patientenproben im Vergleich zu Pseudo-Blut mit Serum gesunder Patienten und kultivierten Parasiten eine deutlich niedrigere Fangrate, was zu einer deutlich verschlechterten Sensitivität führen würde. Da eine Machbarkeitsstudie mit Patientenproben Corona-bedingt nicht möglich war, wurden umfangreiche Arbeiten unternommen, welche Faktoren in Patientenblut für diese Interferenz verantwortlich sind und welche Zusätze diese Faktoren eventuell blocken und somit die Fangrate wiederherstellen können.

Dafür mussten erst Plasmaproben von infizierten Patienten beschafft werden.

Von ELISA ist bekannt, dass humane anti-Maus-IgG Antikörper (HAMA) in Patientenblut die diagnostischen Maus-Antikörper blockieren können. Es wurden also 15 kommerziell erhältlichen Interferenz-Blocker wie Mab 33, Fab Blocker usw. auf eine Wirkung getestet.

Da sich außerdem ein gewisser Zusammenhang zwischen hohen CRP-Werten und somit einer starken Entzündungsreaktion mit der Interferenz ergab, untersuchten wir den entscheidenden Faktor. Da die Entzündungsreaktion Faktoren aktiviert, welche an den Fc-Teil auch von Maus-Antikörpern insbesondere als Hexamer auf Zellen binden, untersuchten wir auch, ob wir z.B. mit Referenz-Maus-Antikörper beladenen Beads diese Faktoren hinauswaschen können und das Plasma dann nicht mehr interferiert.

Außerdem binden Entzündungsfaktoren an Gerinnungsfaktoren und führen zur Bildung von Fibrin und somit zur Erhöhung der Viskosität.

Insgesamt zeigt sich, dass die Interferenz multifaktoriell ist.

Eine Wiederherstellung der Fangraten kann durch Zugabe von Plasmin zum Abbau von Fibrin, von kommerziellem Fab-Block als ein Überschuss unspezifischer Antikörper, wodurch die diagnostischen Antikörper geschützt werden, aber auch durch die Verdünnung der Patientenprobe bewirkt werden.

Außerdem wurden die Protokolle zur Kopplung der Antikörper an die magnetischen Beads und an Fluoreszenzfarbstoffe optimiert. Insbesondere durch eine weitere Aufreinigung der Proben mittels Gelfiltration und Dialyse konnte z.B. freier Farbstoff und der Hintergrund in den Bildern minimiert werden.

Die Lyophilisierung wurde in einer Kooperation mit EVIK Diagnostics LCC in Kanada weiter verfeinert.

Diese können alle benötigten Substanzen in 1-2 mm großen Beads lyophilisieren, welche dann einzeln in die mit Spritzguss erzeugten Reaktionsgefäße gegeben werden.

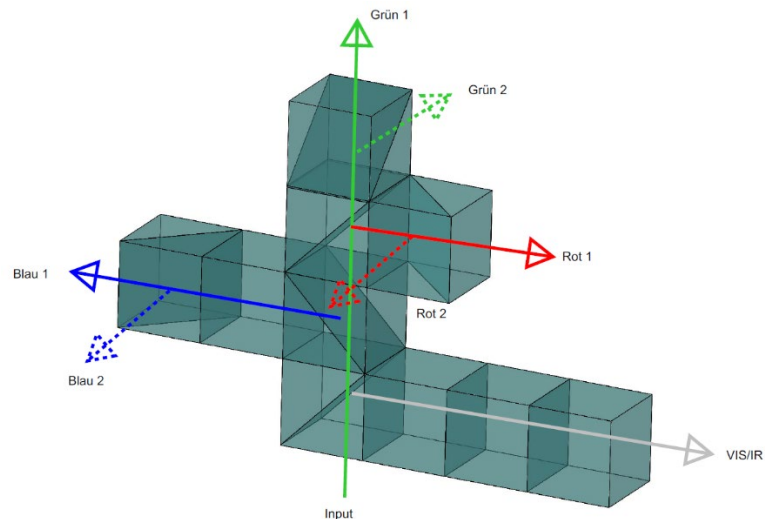
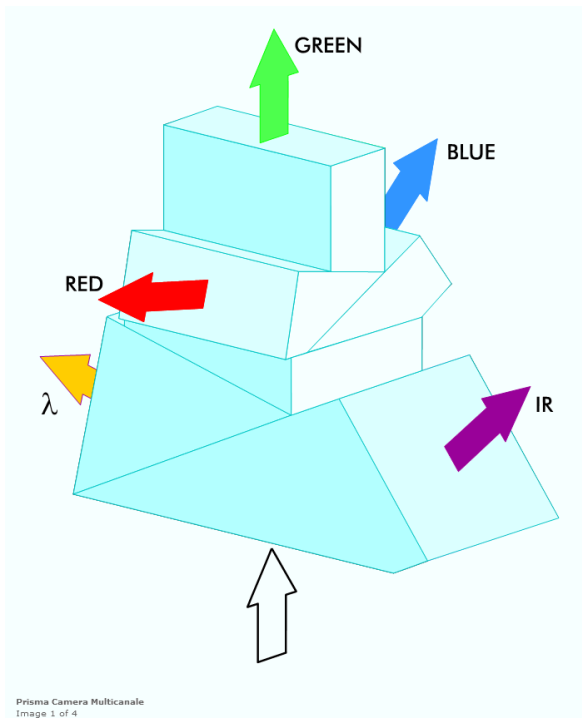
Es wurden Reaktionsansätze mit iRBC aus Kultur unter Variation der Parameter Parasitenzahl, Inkubationsdauer, Zusammensetzung des Reaktionscocktails, eingesetzter MNP, Kopplungsverfahren, Magnetstärken und -dauer usw. zur Verbesserung der Fangrate auf >25%, Nachweisgrenze und Diagnostikdauer auf <15 min durchgeführt.

C) Erstellung eines Multiplex-Funktionsmusters zur parallelen Detektion mehrerer Erreger

Für ein Multiplex-Funktionsmuster zur parallelen Detektion von 2 Erregern sind 2 spektral trennbare Fluoreszenzfarbstoffe notwendig.

Nach Austesten von 20 grünen und 16 Fluoreszenzfarbstoffen im NIR-Bereich wurde ein geeignetes Paar mit ausreichender spektraler Trennung für eine getrennte Detektion von 2 Antikörpern und somit 2 verschiedenen Erregern gefunden.

Außerdem wurde ein Design für eine Kanaltrennung mittels dichroischen Spiegeln entworfen. Dieses erlaubt mit bis zu 3 Kameras die parallele Detektion von bis zu 3 verschiedenen Zelltypen.



II.5. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die weltneuen Projektinhalte wurden soweit möglich in drei Patenten angemeldet und sind somit bestmöglichst vor konkurrierenden Stellen geschützt. Es sind keine Arbeiten auf dem Gebiet des Vorhabens anderer Stellen mit ähnlicher Methode aus Immungängen und Immungfärbung der Erreger bekannt.

Verwertung

Eine Verwertung der Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt wird angestrebt. Der Projektpartner Zendia GmbH arbeitet weiter an der Realisierung und Validierung der bis zum Projektende gewonnenen Resultate.

II.5. Darstellung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 11

Die Ergebnisse wurden im Journal Parasitology Research, Quadt et al., 2020 Dec;119(12):4297-4302 veröffentlicht.



UNIVERSITÄTS KLINIKUM HEIDELBERG

Zentrum für Infektiologie | Parasitologie | INF 324 | 69120 Heidelberg
Wenn unzustellbar, zurück! / If undeliverable, return to sender!

25.10.2025

Infectotest Förderkennzeichen 161B0861B

Kurzbericht

Parasitologie

Zentrum für Infektiologie
Universitätsklinikum Heidelberg

Prof. Dr. Friedrich Frischknecht
W3-Professor für
Integrative Parasitologie

Sekretariat
Sandra Niebel



Im Neuenheimer Feld 324 (Post) /
INF 344, 2. OG (Büro & Labore)
69120 Heidelberg
Fon +49 6221 56-6537
Fax +49 6221 56-5751
freddy.frischknecht@
med.uni-heidelberg.de
www.ukhd.de/parasitologie

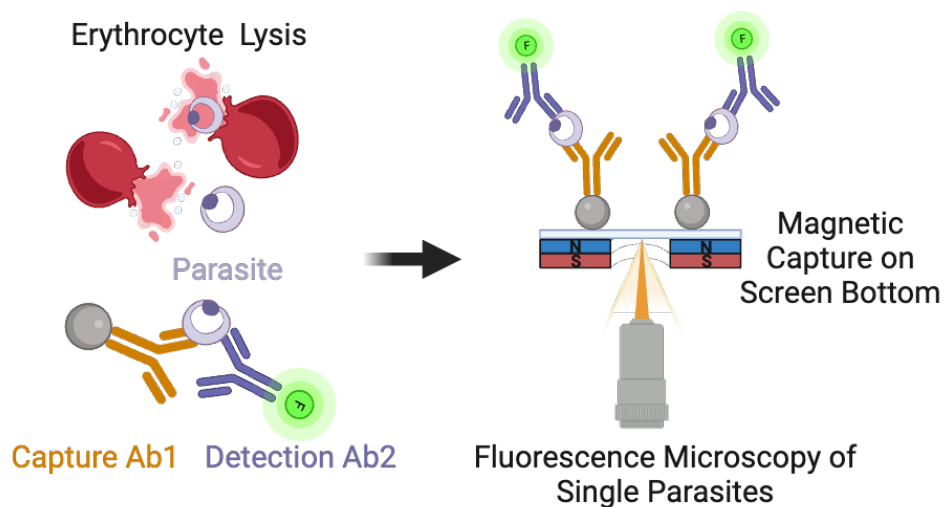


Kurzer inhaltlicher Bericht

Infectotest, FKZ 161B0861A

Ziel des Projektes war die Generierung einer Diagnostik-Plattform für Malaria-Erreger.

Das innovative Infectotest®-Konzept sieht ein Fangen der Erreger in einem Immun-Sandwich vor. Dieser Sandwich besteht aus einem Antikörper, der an Magnetpartikel gebunden ist und einem Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die Erreger werden also magnetisch gefangen und direkt visualisiert:



Die gesamte Diagnostik soll automatisch ablaufen, so dass der Nutzer nur einen Blutstropfen in ein spezielles Probenröhrchen gibt. Dort findet die Ausbildung des Immun-Sandwiches statt und ein magnetisches Fangen über einem Bildfeld. Ein spezielles Mikroskopie-Gerät nimmt Bilder der fluoreszenten Erreger auf und wertet sie quantitativ aus. Der Nutzer bekommt die Bilder mit den eingekreisten Erregern und die Konzentration im Blut gemeldet.. Mit einer Wiederholungsmessung kann festgestellt werden, ob ein Medikament anschlägt oder eine Resistenz vorhanden ist. Die Daten können in eine Cloud geladen werden und statistisch zu Echtzeit-Prävalenzkarten ausgewertet werden, so dass auf einer Landkarte für jeden Ort die Anzahl der Fälle, die Tendenz und Medikamenten-Resistenzen ersichtlich sind.

Es konnten erfolgreich Funktionsmuster erstellt werden. Die Sensitivität des InfectoTest konnte auf eine Nachweisgrenze von ~1 Parasit pro Mikroliter gesenkt werden.

Die Funktionsmuster sollen jetzt nach Projektabschluss zu einer Infectotest®-Diagnostik für Malaria weiterentwickelt werden. Nach der Produktentwicklung bis 2025 soll das Produkt

nach dem Zulassungsverfahren in 2026 auf dem Markt eingeführt werden. Eine Präqualifikation durch die WHO und eine Zusammenarbeit mit der FIND (Foundation for Innovative Diagnostics) wird sehr hilfreich sein.

Konkret wird aus den Projektergebnissen als Produkt eine Infectotest®-Diagnostik entstehen, welche handlich und mobil als Schnelltest am Point-of-Care auch von einem Laien angewendet werden kann, eine in einer automatisierten Messung eine direkte Erreger-Visualisierung bereitstellt und die Parasitämie errechnet, eine 100fach niedrigere Nachweisgrenze als die beiden etablierten Verfahren RDT-Teststreifen oder Giemsa-Mikroskopie bei gleichen Kosten erlaubt. Außerdem wird sie als weitere Zusatzfunktionen die Feststellung einer Medikamentenresistenz durch eine quantitative Kontrollmessung, die online-Konsultation eines Arztes und ortsdefinierte Prävalenzkarten in Echtzeit erlauben.