

- 1 Schematische Darstellung des ImmuSticks.
- 2 Fluoreszenzphotometrische Auswertung an Agarose Beads gebundene TLR4 mit Liganden, s. Abb. 3.

IMMUSTICK – ANGEBORENES IMMUNSYSTEM ALS TESTSTREIFEN

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Ansprechpartner

Dr. Anke Burger-Kentischer
Telefon +49 711 970-4023
anke.burger-kentischer@
igb.fraunhofer.de

Dr.-Ing. Christina Kohl
Telefon +49 711 970-4183
christina.kohl@igb.fraunhofer.de

www.igb.fraunhofer.de

Herausforderung Sepsis

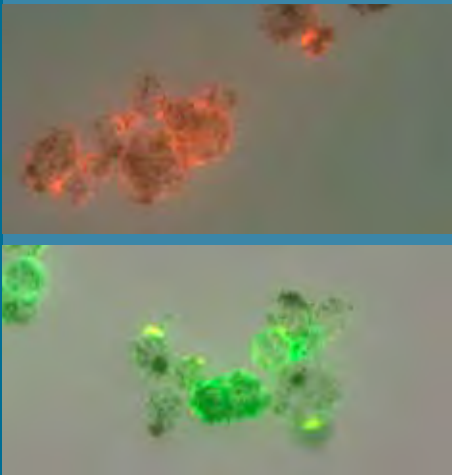
Schätzungen zufolge sterben jährlich weltweit rund 18 Millionen Patienten an den Folgen einer Sepsis. Verursacht wird dies durch Pyrogene – Bakterien, Viren oder Pilze oder deren Rückstände, die in den Blutkreislauf des Patienten gelangen. Die Pyrogene (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs), werden von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Pattern Recognition Receptors, PRRs), erkannt, welche die Produktion von fieberinduzierenden Botenstoffen einleiten.

Die herkömmliche Sepsisdiagnostik kostet wertvolle Zeit und ist auf vermehrungsfähige Erreger beschränkt. Um zu verhindern, dass Pyrogene über Medizinprodukte und Pharmaka in den Blutkreislauf gelangen, müssen diese auf Pyrogenfreiheit untersucht werden. Derzeit sind vier kommerzielle Nachweissysteme zugelassen. Diese

sind entweder sehr aufwendig oder auf bestimmte Pyrogene limitiert.

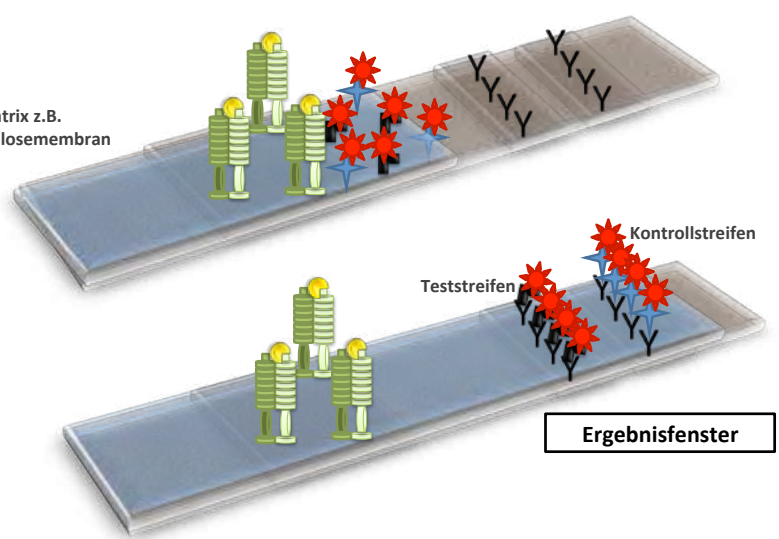
Pyrogennachweis mit Immunrezeptoren

Aus diesem Grund arbeitet das Fraunhofer IGB seit einigen Jahren an der Entwicklung alternativer In-vitro-Testsysteme, die auf dem Einsatz der PRRs beruhen. Unter den PRRs stellen die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) die größte und bekannteste Familie dar. Eine sensitive und universell adaptierbare In-vitro-Methode ist der vom Fraunhofer IGB patentierte PAMP-Assay (DE 10 2006 031 483; EP 2 041 172). Das Testsystem basiert auf mammalischen Zelllinien, welche TLR stabil exprimieren und die An- oder Abwesenheit von Pyrogenen spezifisch mithilfe eines Reportergens anzeigen. Allerdings setzt auch dieses Verfahren ein gut ausgerüstetes Labor sowie Know-how im Umgang mit Zellkulturen voraus.



3

Feste Matrix z.B.
Nitocellulosemembran



4

ImmuStick – Der »Schwangerschaftstest« für Pyrogene

Mit dem ImmuStick entwickeln wir ein unkonventionelles, neuartiges Nachweissystem für Pyrogene, das PRRs als Biosensoren einsetzt, ohne den Einsatz von Tierversuchen oder zeitlich und apparativ aufwendigen und damit teuren Bluttests. Basierend auf dem Prinzip immunchromatographischer Tests wie dem Schwangerschaftstest werden Pyrogene einfach mit einem Teststreifen nachgewiesen. Dabei setzen wir immobilisierte Rezeptordomänen individueller PRRs als Bindemoleküle für das entsprechende Pyrogen ein. Enthält eine aufgetragene Probe das entsprechende Pyrogen, so wird ein markierter Ligand freigesetzt, der die Präsenz des Pyrogens anzeigt (Abb. 1).

Funktionsweise des ImmuSticks

Die Analytlösung gelangt vom Probeaufgabebereich über Kapillarfluss in den Biosensorbereich mit immobilisierten TLR4-Rezeptoren, an welchem markierte Liganden für einen Nachweis der Pyrogene gebunden sind. Weiter befinden sich hier markierte Kontrollmoleküle. Im Bereich des Ergebnisfensters sind Antikörper als Fängermoleküle auf einer Trägermatrix immobilisiert.

Die Detektion des Pyrogens basiert auf einem klassischen, kompetitiven Immunoassay. Nach Benetzung des Teststreifens mit der Analytlösung verdrängt das hierin enthaltene Pyrogen (TLR4-Ligand LPS; gelb) die markierten, schwächer bindenden

markierten Liganden (schwarz-rot). Diese wandern gemeinsam mit den Kontrollmolekülen (blau-rot) zum Ergebnisfenster, in welchem spezifische Antikörper gegen die markierten Liganden als Fängermoleküle (Y) immobilisiert sind. Binden die Antikörper ihr Antigen (den markierten Liganden oder das Kontrollmolekül), resultiert das Aufbringen einer pyrogenhaltigen Probelösung in zwei farbigen Testlinien im Ergebnisfenster. Die Kontrolllinie verifiziert einen funktionellen Ablauf des Tests (Abb. 2).

Anwendungsspezifische Weiterentwicklung

Die prinzipielle Machbarkeit haben wir für TLR4 zum Nachweis von Lipopolysacchariden (LPS) gezeigt. Das Testsystem kann modular um weitere Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (TLR, NOD-like Rezeptoren, C-Typ-Lektin-Rezeptoren) erweitert werden, um das Pyrogenspektrum gezielt anzupassen. Ausgerüstet mit verschiedenen PRRs kann der ImmuStick die gesamte Breite an PAMPs schnell, einfach und direkt vor Ort nachweisen.

Einsatzgebiete

Der ImmuStick eignet sich zum gesetzlich geforderten Nachweis der Pyrogenfreiheit von biologischen Produkten und, über Probenahmen, von medizinischen Geräten. Ein Einsatz zur Klassifizierung von Sepsis-Erregern direkt am Patienten ist ebenfalls denkbar. Da einige PRRs auch spezifisch Allergene erkennen, bietet der ImmuStick

zudem Potenzial für die Bestimmung von Allergenen.

- Pyrogen-Diagnostik für Medizintechnikprodukte (FDA-Richtlinie)
- Pyrogen-Diagnostik von Pharmazeutika, Kosmetika und Lebensmitteln
- REACH-Klassifizierung für Chemikalien
- Sepsisdiagnostik
- Detektion von Allergenen in Medizintechnik, Pharmaindustrie und Lebensmitteltechnik

Vorteile

Der ImmuStick ist die Weiterentwicklung eines In-vitro-Immunoassays zu einem auch für den Laien anwendbaren Teststreifen. Die Verwendung von Rezeptoren des humanen angeborenen Immunsystems erlaubt, alle Pyrogenklassen zu erfassen.

- Sehr schnelle Diagnostik (< 10 min)
- Einfacher, kostengünstiger und reproduzierbarer Soforttest
- On-site-Verfahren ohne apparativen Aufwand
- Keine Fachkenntnisse notwendig

- 3 *Fluoreszenzmikroskopie von an Agarose Beads gebundener TLR4: Verdrängung eines schwach an TLR4 bindenden Liganden (rot) durch LPS (grün).*
- 4 *Funktionsweise des ImmuSticks nach Probenaufgabe (Pyrogen in gelb).*