

PhD defence Francisco Morales Yanez

Development of innovative nanobody-based strategies to improve the diagnosis of human toxocariasis

05 jul 2019 14:00

Vrije Universiteit Brussel - Elsene



Dit is de omschrijving

Supervisors

- Prof. Dr. Katja Polman (Institute of Tropical Medicine)
- Prof. Dr. Serge Muyldermans (Vrije Universiteit Brussel)

Abstract in English:

Human toxocariasis (HT) is a zoonotic disease caused by the infection of the larval stage of the dog roundworm *Toxocara canis*. Currently, laboratory diagnosis of HT relies on the ELISA-based detection of specific immunoglobulins against the *T. canis* excretory/secretory (TES) antigen (Ab TES-ELISA). TES is a mix of highly glycosylated proteins that the parasite releases into the tissues during the migration of larval stages in the human host. The most important drawback of the Ab TES-ELISA is its inability to distinguish between active and past infections. Moreover, cross-reactivity with other helminths is frequent. This is particularly important in tropical regions, where polyparasitism is frequent. In this PhD thesis, we introduce a sensitive and specific nanobody-based sandwich ELISA (Nb-ELISA) to detect TES antigen with a limit of detection of 0.650 ng/ml in serum spiked with TES. This Nb-ELISA employs bivalent biotinylated nanobodies as capturing agent and nanobodies chemically coupled to horseradish peroxidase for detection. The Nb-ELISA was able to detect TES in mice sera taken 3 days after they were experimentally infected with *T. canis* eggs. Even higher sensitivity was achieved by converting the ELISA into an electrochemical magnetosensor assay, whereby the reaction takes place on the surface of streptavidin-precoated paramagnetic beads. In this configuration, the assay had a limit of detection of 10 pg/ml in serum spiked with TES. This assay was evaluated in serum samples from children of remote rural communities in the province of Esmeraldas (Ecuador). We found that 38% (33/84) of the sera were positive for TES antigen. Positivity was significantly correlated with eosinophilia. Additionally, the test showed no cross-reactivity with other helminths. To our knowledge, this is the most sensitive and specific immunoassay to diagnose HT currently available. As the electrochemical assay provides evidence of active *Toxocara* infections, it has great potential to significantly improve HT diagnosis. It also provides opportunities to develop point of care diagnostic systems for other diseases where high sensitivity and specificity are required. This research highlights the impressive versatility of nanobodies for the development of innovative immunoassays.

Abstract in Dutch:

Humane toxocariasis (HT) is een zoönotische ziekte veroorzaakt door de infectie met larven van de hondspoeiworm *Toxocara canis*. De huidige laboratoriumdiagnostiek van HT is gebaseerd op de detectie van specifieke immunoglobulinen tegen *T. canis* excretory-secretory (TES) antigenen met ELISA (Ab TES-ELISA). TES is een mix van sterk geglycosyleerde eiwitten die de parasiet in de weefsels vrijgeeft tijdens de migratie van de larvale stadia in de menselijke gastheer. Het belangrijkste nadeel van deze assay is dat het geen onderscheid maakt tussen actieve en vroegere infecties. Bovendien is er veel kruisreactiviteit met andere helminthen. Dit laatste is met name een probleem in de tropen, waar polyparasitisme vaak voorkomt. In dit proefschrift introduceren we een gevoelige en specifieke nanobody-gebaseerde sandwich-ELISA (Nb-ELISA) om TES antigenen te detecteren met een detectielimiet van 0,650 ng/ml serum (*spiked* met TES). Deze Nb-ELISA maakt gebruik van bivalente gebiotinyleerde nanobodies om de antigenen te capteren en aan 'horseradish peroxidase' gekoppelde nanobodies voor detectie. Met deze Nb-ELISA was het mogelijk om TES te detecteren in muizensera 3 dagen nadat deze experimenteel waren geïnfecteerd met *T. canis* eieren. Een nog hogere gevoeligheid werd bereikt door de ELISA om te zetten in een elektrochemische magnetosensor assay, waarbij de reactie plaatsvindt op het oppervlak van paramagnetische 'beads' die vooraf gecoat worden met streptavidine. In deze configuratie had de test een detectielimiet van 10 pg/ml serum (*spiked* met TES). Deze test werd geëvalueerd in serumstalen van kinderen van afgelegen rurale gemeenschappen in de provincie Esmeraldas in Ecuador. We vonden dat 38% (33/84) van de serumstalen positief waren voor TES

antigeen. Een positieve test was significant gecorreleerd met eosinofilie. Bovendien toonde de test geen kruisreactiviteit met andere wormen. Dit is, voor zover we kunnen nagaan, de meest gevoelige en specifieke immunoassay voor de bepaling van HT die momenteel beschikbaar is. Omdat de elektrochemische assay actieve *Toxocara*-infecties detecteert, heeft deze een enorm potentieel om de diagnose van HT significant te verbeteren. Deze aanpak biedt ook mogelijkheden voor de ontwikkeling van diagnostische systemen voor andere ziekten waarbij een hoge gevoeligheid en specificiteit vereist zijn. Dit onderzoek benadrukt de indrukwekkende veelzijdigheid van nanobodies voor de ontwikkeling van innovatieve immunoassays.