ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية

المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية
---

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 33514 B1

(51) Cl. internationale :
G01N 33/569; C07K 14/44

(43) Date de publication :
01.08.2012

(21) N° Dépôt :
34612

(22) Date de Dépôt :
08.02.2012

(30) Données de Priorité :
13.07.2009 EP 09165282.6 ; 07.12.2009 US 61/267,214

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/EP2010/060058 13.07.2010

(71) Demandeur(s) :
LABORATORIOS LETI, S.L., c/. del Sol 5, Poligono Industrial Norte E-28760 Tres Cantos Madrid (ES)

(72) Inventeur(s) :
SOTO-ÁLVAREZ, Manuel ; RAMÍREZ GARCÍA, Laura ; COELHO, Eduardo Antonio Ferraz ; ALONSO-BEDATE, Carlos

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

(54) Titre : **DIAGNOSTIC D'UNE MALADIE PARASITAIRE TELLE QUE LA LEISHMANIOSE À L'AIDE D'UN EXTRAIT DE PROTÉINE RIBOSOMIQUE (RPE)**

(57) Abrégé : L'INVENTION PORTE SUR UN PROCÉDÉ DE DIAGNOSTIC DE LEISHMANIOSE À L'AIDE D'UN RPE.

MA 33514B1

41

بسم الله الرحمن الرحيم

تشخيص مرض طُفيلي مثل داء الليشمانيّات باستخدام مستخلص بروتيني ريبوسومي
Diagnosis of a parasitic disease such as Leishmaniasis using Ribosomal Protein Extract (RPE)

الملخص

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لتشخيص داء الليشمانيّات باستخدام RPE.

MA 33514B1

N°34612
du 08.02.2012

01 AOUT 2012

33514

-1-

تشخيص مرض طُفيلي مثل داء الليشمانيَّات باستخدام مستخلص بروتيني ريبوسومي
Diagnosis of a parasitic disease such as Leishmaniasis using Ribosomal Protein Extract (RPE)

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع بطريقة لتشخيص مرض طُفيلي مثل داء الليشمانيَّات باستخدام RPE.

الوصف العام للاختراع

داء الليشمانيَّات الحشوي الكلبي (CVL) هومَرَضٌ هام حَيَوانيٌّ المَصْدَر يزداد انتشاره يوما بعد يوم في البلاد الواقعة حول حوض البحر المتوسط، وفي الشرق الأوسط، وأمريكا اللاتينية (20). ينتج هذا المرض الخطير عن ليشمانيا الأطفال في منطقة البحر المتوسط، والشرق الأوسط ودول آسيا والليشمانيَّة الشاغاسية في أمريكا اللاتينية (20، 21). نتيجة لعلاقات نمطها الجيني، فإن كلا النوعين اللذين يسببان CVL في القارات المختلفة يمكن اعتبارهما متطابقين (26).

عند حدوث العدوى يمكن أن تُظهر الكلاب أشكالا مختلفة من هذا المرض؛ حيث يكون بدون أعراض، أو بأعراض قليلة أو مع ظهور أعراض (4). ينتج عن الإصابة ذات الأعراض الموت ومظاهرها الإكلينيكية تشمل تغييرات جلدية مثل الثعلبة، والتهاب الجلد، وتقعُّر الأظافر (3، 11)، وكذلك المظاهر الحشوية أيضا مع بعض التغييرات الكلوية والكبدية والدماغية (18، 28). بعض الكلاب المصابة تبقى بدون أعراض أو تظهر عليها أعراض خفيفة، وتُصنَّف على أنها قليلة الأعراض (4). لا يمكن اعتبار CVL مجرد مرض بيطري لأن الكلاب المصابة (حتى تلك التي لا تظهر عليها أعراض) هي الخزان الرئيسي الداخلي للطُفيل لحالات العدوى البشرية (1). لذلك، للحد من انتقال العدوى بالليشمانيا من الكلاب إلى البشر من الضروري تشخيص الليشمانيَّات في الكلاب في أقرب وقت ممكن.

سمح وجود الأجسام المضادة النوعية المضادة لليشمانيا في الكلاب المصابة التي لاتظهر عليها الأعراض أو التي تظهر عليها أعراض قليلة أو التي تظهر عليها الأعراض (4، 9، 34) باستحداث اختبارات مصليَّة بما في ذلك اختبار الجسم المضاد بالفلورة المناعية (IFAT)، وبقعة وسترن، واختبار الرسم اللوني المناعي، واختبار الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) (هناك مراجعة لهذا الأموضوع في المرجع رقم (23)). اتضح أن تشخيص CVL باستخدام اختبارات ELISA استنادا إلى مولدات ضد الليشمانيا الخام الذائبة (SLA) يتمتع بحساسية عالية ولكن له خصوصية منخفضة نظرا للعلاقة الخاصة بمولد الضد بين الليشمانيَّة والكائنات الأوّلية الأخرى الناقلة للمرض (16). كاستراتيجية لتطوير اختبار تشخيصي مصلي نوعي لـــ CVL، تم الحصول على مولدات ضد طُفيليَّة مختلفة مثل البروتينات معاودة الارتباط (5، 10، 24). مع ذلك، نتيجة للتغيُّر الكبير الذي تمت ملاحظته في الاستجابة الخلطية للكلاب المصابة تجاه مولدات ضد طُفيليَّة مختلفة (19، 31)، قد يتطلب التشخيص الجيد الذي يستند إلى البروتينات معاودة الارتباط وجود خليط من البروتينات معاودة الارتباط أو استخدام بروتينات خيمرية تحتوي على مولدات ضد طُفيليَّة حشوية غير ذات صلة (6، 31، 36). التشخيص النوعي لـــ CVL يمكن استحداثه باستخدام أجزاء طُفيليَّة خام يتم تحليلها بواسطة بقعة وسترن أو مستحضرات تتم تنقيتها من الطُفيل (8، 17). على سبيل المثال، تم استحداث اختبار ELISA المستند إلى مولد ضد ليشمانيا قابل للذوبان (SLA) (27، 31). مع ذلك، لا يعتبر اختبار SLA هذا ذو خصوصية كافية لتشخيص أنواع الليشمانيَّة عديمة الأعراض. بالإضافة إلى ذلك، فإن الأمصال من مرضي مصابين بأمراض طُفيليَّة غير داء الليشمانيَّات سوف تعطي تفاعلا إيجابيا زائفا مع الاختبار المعتمد على SLA.

لذلك، تظل هناك حاجة إلى طريقة تشخيص مُحسَّنة لمرض طُفيلي مثل داء الليشمانيَّة، لا يكون بها كل هذه العيوب الموجودة في الطرق الحالية.

الكشف عن الاختراع

في هذا العمل، نوضح أن RPE، وعلى وجه الخصوص RPE الخاصة بالليشمانيَّة (LRPE) يمكن استخدامها بطريقة مفيدة لتشخيص مرض طُفيلي مثل الليشمانيَّة : طريقة التشخيص الجديدة هذه تتمتع بخصوصية أكثر من كل طرق التشخيص المعروفة مثل الطرق التي أساسها SLA- حسبما توضحه الأمثلة. تسمح هذه الطريقة الجديدة بالتشخيص قبل ظهور أعراض داء الليشمانيَّات وهو أمر حاسم في منع أو تقليل انتقال الليشمانيا من الكلاب إلى البشر.

سيتم شرح الاختراع بمزيد من التفصيل فيما يلي.

الاستخدام

في سمة أولى، يتم تقديم استخدام مستخلص بروتيني ريبوسومي (RPE) لتشخيص مرض طُفيلي في مريض.

حسبما هو معرف هنا، يمكن الحصول على مستخلص بروتيني ريبوسومي بتنفيذ الخطوات التالية باستخدام خلية طُفيليَّة تسبب مرضا طُفيليا عند وجودها في مريض:

ا- خلط خلية طُفيليَّة مع محلول مُنظِّم يستخدم للحل،

ب- عمل طرد مركزي للخليط الذي تم الحصول عليه للحصول على مستخلص عُصاري خلوي،

ج- تحضير المستخلص البروتيني الريبوسومي من المستخلص العُصاري الخلوي الذي تم الحصول عليه.

في الخطوة أ، من المُفضَّل أن يعني تعبير "طُفيل" حيوانا أوَّليا. الطُفيليات المُفضَّلة سيتم تعريفها لاحقا. من الأفضل، أن يكون الحيوان الأوَّلي في مرحلة عدم وجود جسم خلوي. يمكن للفرد المتمرس التوصُّل إلى عدد الخلايا المتطفِّلة التقريبية المطلوبة لتجهيز كمية معيَّنة من RPE. نمطيا لتحضير 500 ميكروجرام من RPE، سوف يستخدم المرء 3×10^9 خلية متطفلة. المحلول المُنظِّم للحل هو محلول منظم، يكسر جزءا على الأقل من الخلايا المتطفلة. تعبير "جزء على الأقل" يُفضَّل أن يعني 50٪ من الخلايا، أو على الأقل 60٪، 70٪، 80٪، 90٪ أو 100٪.

يشتمل محلول الحل المُنظِّم على مخفض غير أيوني للتوتر السطحي. تم الحصول على نتائج جيدة باستخدام Nonidet P 40 ويطلق عليه (NP40) كمخفض غير أيوني للتوتر السطحي. مع ذلك، يمكن استخدام المخفضات غير الأيونية للتوتر السطحي. هناك محلول حل مُنظِّم مستخدم هو كالتالي (المحلول المُنظِّم أ) : 10 ملي مولار Tris HCl، رقم هيدروجيني 8.0، 150 ملي مولار NaCl، 1.5 ملي مولار $MgCl_2$ و0.5٪(Roche) NP40 ويُفضَّل إكماله بمثبطات البروتياز مثل PMSF 1 ملي مولار، و Leupeptin 8 ميكروجرام/ مل، و Aprotinin 4ميكروجرام/ مل و Pentatin 8 ميكروجرام/ مل). يتم نمطيا خلط كمية مناسبة من خلايا الطُفيل (10^9 خلية/ مل من المحلول المُنظِّم أ) برفق مع محلول الحل المُنظِّم المذكور باستخدام ماصَّة eppendorf.

في الخطوة ب، يتم استخدام خطوة واحدة على الأقل من الطرد المركزي عند 4°م للخليط الذي تم الحصول عليه في الخطوة أ. عادة ما يتم تنفيذ خطوة طرد مركزي أولى عند 3000g لمدة 2 دقيقة. السائل الطافي الذي يتم الحصول عليه تُفضَّل إعادة طرده مركزيا عند 13000g لمدة 15 دقيقة عند 4°م مرة أو مرتان.

في الخطوة ج، يتم استخدام السائل الطافي الذي يتم الحصول عليه لتحضير RPE حسبما هو مشروح في (45). باختصار، السائل الطافي الذي يتم الحصول عليه يتعرض لطرد مركزي عالي السرعة عند 90000 لفة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة عند 4°م. يُفضَّل أن يكون العضو الدوار المستخدم من نوع Beckman TL100.3. تكون الحبيبات التي يتم الحصول عليها هي حبيبات ريبوسومية خام، يعاد تعليقها في محلول مُنظِّم مناسب مثل المحلول المُنظِّم ب (20 ملي مولار Tris-HCl، رقم هيدروجيني 7.4، 500 ملي مولار $AcNH_4$، 100 ملي مولار $MgCl_4$، 5ملي مولار β-ميركابتو إيثانول) وطردها مركزيا خلال تدرُّج لمصدر غير مستمر (20/40٪) في محلول مُنظِّم مناسب مثل (المحلول المُنظِّم أ) عند 90000 لفة في الدقيقة عند 4°م. هنا مرة أخرى، يكون العضو الدوار المُفضَّل هو TL100.3. تشتمل الحبيبة التي يتم الحصول عليها

ريبوسومات. تُفضّل إذابة هذه الحبيبة في PBS (محلول فوسفات ملحي منظم)، معالج بالموجات فوق الصوتية ومخزن عند -70° م.

البروتينات الريبوسومية هي بروتينات عصارية خلوية محافظة بصورة مناسبة. لذلك، يمكن تحضير RPE حسبما هو معرف هنا، من أي كائن حي سليم النواة، سواء كان نباتا أو حيوانا، سواء كان من الثدييات، أو الزواحف، أو الأسماك، أو الحشرات، أو أي كائن حي آخر به صيغيًّات، مثل الحيوانات وحيدة الخلية. يُفضّل أن يتم الحصول على RPE من كائن حي قريب من المرض، ويُفضّل كائن حي يسبب مرضا طُفيليا في شجرة التطور. لذلك، من الأهمية بمكان كمصدر لـــRPE المطلوب استخدامه لعلاج مرض طُفيلي وجود الكائنات الأوّلية مثل البلازمود وبصفة خاصة أعضاء عائلة المثقبيات، وبصفة خاصة جدا الأنواع المختلفة من الكائنات الأوّلية الليشمانيَّة أو المثقبية. هناك أكثر من 20 نوعا معروفا من الليشمانيَّة، بما في ذلك أنواع الأجناس الفرعية من الليشمانيَّة، بما في ذلك الليشمانيَّة الكبرى المركبة، بما في ذلك الليشمانيَّة الكبرى، الليشمانيَّة الدونوفانية المركبة، بما في ذلك الليشمانيَّة الشاغاسية، والليشمانيَّة الدونوفانية والليشمانيَّة الطِفلية، والليشمانيَّة المكسيكية المركبة، بما في ذلك ليشمانيا الأمازون والليشمانيَّة المكسيكية، بالإضافة إلى أنواع Viannia، المشتملة على الليشمانيَّة البرازيلية المركبة، بما في ذلك الليشمانيَّة البرازيلية والليشمانيَّة البيروفية وليشمانيا جوايانا المركبة، بما في ذلك ليشمانيا جوايانا والليشمانيَّة البناميَّة. نوع المُتَصَوِّرَة ذات الإهتمام الخاص هو المُتَصَوِّرَة المنجلية والمُتَصَوِّرَة النشطة. في نموذج مُفضّل، يتم الحصول على RPE من أحد أنواع الليشمانيا، ويُفضّل الليشمانيَّة الكَبيرَة و/ أو الليشمانيَّة الطفليَّة. في نموذج آخر مُفضّل، يتم الحصول على RPE من نوع المُتَصَوِّرَة. سوف يدرك الفرد المتمرس في هذا المجال أنه يمكن أيضا تحضير RPE بخلط RPE من كائنات حية عديدة محددة حسبما هو محدد هنا. استخدام RPE في الطريقة التشخيصية الخاصة بالاختراع بدلا من استخدام بروتين معين هو أمر جذاب للغاية لأن RPE يحتوي على عدد كبير من مولدات الضد لمحددة. كل واحد من مولدات الضد هذه يمكن أن يدل

على وجود استجابة مناعية في مريض. علاوة على ذلك، هناك خاضعون يستجيبون لمولد الضد أ وليس ب والعكس صحيح. لذلك، RPE كما هو مستخدم هنا يقصد به استخدامه في مجموعة كبيرة من المرضى نظرا لاحتوائه على عدد كبير من مولدات الضد المحددة. في نموذج مُفضّل، يشتمل RPE على بروتين ريبوسومي واحد على الأقل و/ أو مولد ضد واحد على الأقل لبروتين ريبوسومي و/ أو شظية بروتين واحدة على الأقل لبروتين ريبوسومي. في نموذج آخر مُفضّل، RPEيشتمل على اثنين على الأقل من البروتينات الريبوسومية و/ أو اثنين على الأقل من مولدات الضد لبروتين ريبوسومي و/ أو اثنتين على الأقل من شظايا البروتين لبروتين ريبوسومي. شظية البروتين حسبما هو معرف هنا يُفضّل أن تكون شظية تشتمل على الأقل على 2، 3، 5، 7، 10، 15، 20، 25، 30 أو أكثر الأحماض الأمينية المتجاورة لبروتين ريبوسومي مناظر. في أحد النماذج، لا يشتمل RPE حسبما هو معرف هنا على، أو لا يتكون من، البروتين الريبوسومي الحمضي P0 لليشمانيَّة الطفلية و/ أو مولد الضد الريبوسومي LbeF4A من الليشمانيَّة البرازيلية. في نموذج آخر، لا يشتمل RPE حسبما هو معرف هنا على، أو لا يتكون من، قمة لاصقة تنشأ من مولد الضد الريبوسومي الحمضي LcPo من داء الليشمانيَّات الشاغاسية حسبما تم الكشف عنه في الطلب الأوروبي 824 699 (EP 824 699) . والأفضل، ألا يشتمل RPE على، أو يتكون من، الأحماض الأمينية الـ 17 الموجودة في الطرف C من LcPo: الأحماض الأمينية 306-322 من LcPo التي تمثلها المتوالية رقم: 2 في الطلب الأوروبي 824 699(EP 824 699) ، والذي تحدده أيضا المتوالية رقم: 1 في قائمة المتواليات.

تتمثل إحدى ميزات الاختراع الحالي في أنه يسمح بالوصول إلى تشخيص باكر ومحدد لعدد كبير من الأمراض الطُفيلية. من أمثلة المرض الطُفيلي الذي تكون الحالة فيه بهذا الشكل يمكن ذكر داء الليشمانيَّات. في نموذج مُفضّل، يكون المرض الطُفيلي هو داء الليشمانيَّات أو الملاريا. والأفضل، المرض الطُفيلي الذي تتسبب فيه الليشمانيَّة أو نوع المُتَصَوِّرَة. في نموذج آخر مُفضّل، ينتج المرض الطُفيلي عن أنواع مختلفة عن الأنواع التي يتم منها اشتقاق RPE. بصفة

خاصة، يمكن تشخيص داء الليشمانيّات الناتج بواسطة أحد الأنواع من جنس الليشمانيّة باستخدام تركيبة تستند إلى RPE لأنواع أخرى من الليشمانيّة. في أحد النماذج، يتم تشخيص داء الليشمانيّات الذي تسببه الليشمانيّة الكبرى بنجاح بتركيبة تشتمل على RPE من الليشمانيّة الطِفلية. بديلا لذلك، يمكن تشخيص الأمراض الطُفيليّة الأخرى، مثل الملاريا، بنجاح تركيبة أساسها RPE من أنواع أخرى، كأن يكون أساسها RPE من الليشمانيّة الطِفلية.

في سياق الاختراع، الخاضع يعني الإنسان أو الحيوان. الحيوان الذي يدخل ضمن نطاق الاختراع يتضمن الثدييات، ويُفضّل الإنسان أو الكلب. من حيث المبدأ، يمكن تشخيص المرض في أي خاضع باستخدام الاختراع. يمكن تطبيق طريقة التشخيص في كثير من الأحيان عند الضرورة على خاضع ما. يُفضّل أن يكون الخاضع الذي سيتم تشخيص المرض فيه يُشتَبه في خطر إصابته بهذا الطُفيل الذي يسبب المرض الطُفيلي. يمكن أن يعيش الخاضع الذي يُشتَبه في خطر إصابته بالمرض الطُفيلي في منطقة موبوءة أو يقوم بزيارة منطقة يتوطنها المرض. المناطق التي يتوطنها المرض تشمل شمال أفريقيا من الجزائر إلى المملكة العربية السعودية وكينيا والسودان واثيوبيا. وتشمل كذلك جنوب أوروبا : بلدان البحر الأبيض المتوسط اسبانيا وفرنسا واليونان وغيرها. كما تشمل أمريكا الوسطى (كل البلدان)، وأمريكا الجنوبية : البرازيل وفنزويلا وبيرو وبوليفيا وكولومبيا شمال الأرجنتين وباراجواي وأوروجواي، ومن آسيا الوسطى إلى جنوب غرب آسيا : الهند وإيران والعراق ومنغوليا ونيبال وبنجلاديش.

في سياق الاختراع، يُفضّل أن يعني الاستخدام حسبما هو مُعرَّف هنا استخداما معمليا أو خارج الجسم. يُفضّل أن يعني أن الاستخدام المذكور يتم تنفيذه على عيِّنة من الخاضع المذكور. تشمل العينات المُفضّلة الدم، المصل، البلازما، اللعاب، المائع المخي الشوكي أو البول. والأفضل، أن تكون العيِّنة عبارة عن عيِّنة دم أو مصل من الخاضع.

في نموذج مُفضّل يتم التوصّل إلى التشخيص قبل ظهور أعراض المرض الطُفيلي، وما يسمى التشخيص قبل ظهور الأعراض أو التشخيص في شخص لا تظهر عليه أعراض. في هذا

السياق، "قبل ظهور الأعراض" يُفضّل أن يعني يوما واحدا على الأقل، يومين على الأقل، ما لا يقل عن ثلاثة أيام، ما لا يقل عن أربعة أيام، ما لا يقل عن خمسة أيام، ما لا يقل عن ستة أيام، ما لا يقل عن سبعة أيام، ما لا يقل عن ثمانية أيام، ما لا يقل عن تسعة أيام، ما لا يقل عن عشرة أيام، 15 يوما على الأقل، 20 يوما على الأقل، 25 يوما على الأقل ، 30 يوما على الأقل أو أكثر قبل ظهور العرَض الأول. يمكن اختيار العرَض الأول أو أول علامة سريرية مرتبطة بالمرض الطُفيلي مثل داء الليشمانيّات من القائمة التالية : ارتفاع درجة الحرارة وتضخم الطحال، تضخم الكبد، اعتلال العقد اللمفية، والتهاب الملتحمة، والتهاب الجلد، وتقعُّر الأظافر، والتهاب القرنية والملتحمة، والخمول، والدنف. يمكن الكشف عن معظم هذه العلامات ببساطة بواسطة الفحص المادي الخارجي. كل واحد من التهاب الملتحمة، والتهاب الجلد، وتقعُّر الأظافر، والتهاب القرنية والملتحمة هو شكل من أشكال التغيُّر الجلدية.

هناك عرض أوّل مُفضّل يرتبط بداء الليشمانيّات هو اعتلال العقد الليمفية. يمكن الكشف عن هذا العرَض بواسطة الفحص المادي الخارجي مثل الجس.

في نموذج آخر مُفضّل، يتم التوصّل إلى تشخيص قبل ظهور بعض أعراض المرض الطُفيلي المذكور، وهو ما يسمى بالتشخيص في خاضع قليل الأعراض. في هذا السياق، يُفضّل أن يشير تعبير "قليل الأعراض" إلى خاضع لديه ثلاثة أعراض على الأكثر حسبما سبق تعريفه.

في نموذج آخر مُفضّل، يتم التوصّل إلى تشخيص قبل ظهور كل أعراض المرض الطُفيلي المذكور، وهو ما يسمى بالتشخيص في خاضع لا تظهر عليه الأعراض. في هذا السياق، يُفضّل أن يشير تعبير "تظهر عليه الأعراض" إلى خاضع لديه أربعة أعراض على الأقل حسبما سبق تعريفه بما في ذلك صورة تغيُّر الجلد حسبما سبق تعريفه.

سوف يدرك الفرد المتمرس في هذا المجال أن أهم نوع من التشخيص هو التشخيص في مرضَى لا تظهر عليهم الأعراض، لأن ذلك سوف يساعد في منع انتشار المرض وحيث يمكن

مساعدة المرضى الذين لا تظهر عليهم الأعراض وعلاجهم بكفاءة أكثر إذا تم تشخيص المرض لديهم في هذه المرحلة.

الطريقة

في الجانب الثاني يتم تقديم طريقة لتشخيص المرض الطُفيلي في مريض باستخدام RPE، تشتمل الطريقة على تحديد ما إذا كان الجسم المضاد الذي يتعرف على RPE موجودا في عيّنة تم الحصول عليها من هذا الخاضع أم لا. الطريقة المُفضّلة للاختراع كما هو الحال مع الاستخدام المُفضّل يُفضّل تنفيذها في المختبر أو خارج الجسم. سبق تعريف ذلك في هذه الوثيقة. في طريقة مُفضّلة، يوجد RPE في تركيبة. تم تعريف RPE في وقت سابق هنا. في نموذج مُفضّل، يوجد مركب آخر في هذه التركيبة. بدلا من ذلك، يمكن ألا يوجد أي مركب آخر في التركيبة المذكورة.

في نموذج مُفضّل، تُستخدم مركبات أخرى في وقت واحد أو بالتتابع مع RPE من أجل تحسين خصوصية الطريقة. من المفيد على سبيل المثال استخدام مركبات أخرى من شأنها أن تكون قادرة على التمييز بين الخاضع الذي لا تظهر عليه أعراض والخاضع قليل الأعراض، والخاضع الذي تظهر عليه أعراض والخاضع الذي تلقّى اللقاح. الأفضل، ألا توجد هذه المركبات في تركيبة واحدة جنبا إلى جنب معRPE . على سبيل المثال يمكن استخدام مولد ضد آخر غير ذي صلة لطُفيل يسبب هذا المرض الطُفيلي (31) مثل داء الليشمانيّات. ثمة مثال آخر هو استخدام متعدد البروتينات الذي يحتوي على عدة مضادات ضد طُفيليّة (6، 36). المولدات الضد المُفضّلة تشمل هيستون البروتين أو جزء منه أو جزيء الحمض النووي الذي يُرمّز الهيستون المذكور. والأفضل، أن يكون هيستون البروتين هو H2A، H2B، H3 و/ أو H4 حسبما هو مشروح في الطلب الأوروبي 1687023 (EP 1 687 023). هستونات H2A، H2B، H3 وH4 هي بروتينات نووية محافظة بصورة جيدة ومتوالياتها معروفة تماما في هذا المجال، أنظر على سبيل المثال Requena et al., Trends in Parasitol. (2000) 16:246. يُفضّل الحصول

على الهستونات من كائن حي قريب من الكائن الحي المسبب للمرض في شجرة التطور. لذلك، من الأمور ذات الأهمية الخاصة كمصدر للهستونات عند استخدامها في علاج الأمراض الطُفيليَّة مثل داء الليشمانيَّات هي الحيوانات الأوَّلية وبصفة خاصة أعضاء عائلة المثقبيات، مثل المنجليات، وبصفة خاصة جدا الأنواع المختلفة من من الكائنات الأوَّلية المثقبية الليشمانيَّة.

في طريقة تشخيص أكثر تفضيلا، يتم تشخيص المرض الطُفيلي عند وجود كمية يمكن اكتشافها من جسم مضاد يتعرف على RPE و/ أو عندما توجد زيادة في كمية الجسم المضاد المذكور. في خاضع سليم أوخاضع يستخدم للمقارنة، لا يمكن بصفة عامة اكتشاف الجسم المضاد المذكور.

يتم اكتشاف وجود الجسم المضاد المذكور باستخدام طرق للفرد المتمرس في هذا المجال مثل ELISA. الطرق المُفضَّلة للكشف مشروحة في القسم المعنون "الاختبار".

يُفضَّل أن يعني الجسم المضاد الذي يتعرف على RPE جسما مضادا واحدا على الأقل يكون موجودا وقادرا على التعرف على مركب واحد على الأقل موجود فيRPE . المركب المذكور يمكن أن يكون عبارة عن بروتين ريبوسومي أو جزء من بروتين ريبوسومي أو مولد ضد ريبوسومي لبروتين ريبوسومي.

الاختبار

في صورة ثالثة، يتم تقديم جهاز اختبار لاختبار تشخيص المرض الطُفيلي في مريض، حيث يشتمل الجهاز أو الاختبار على RPE. يمكن اكتشاف وجود الجسم المضاد الذي يتعرف بصورة محددة على RPE بأي طرق قياسية معروفة لذوي الخبرة في هذا المجال (أنظر، على سبيل المثال، Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988، والمستخدم كمرجع لنا هنا). تشمل الطرق المناسبة اختبارات الاستشراد الكهربي المشترك بكروماتوجراف الألفة (ACE) واختبار الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم

(ELISA). ويفضل أن يشتمل الاختبار على ELISA. هناك عدة اختبارات سيتم شرحها فيما يلي.

في نموذج مُفضّل، ينطوي اختبار ما على استخدام RPE المُثبَّت على مادة حاملة صلبة للارتباط مع وإزالة الأجسام المضادة من العيِّنة. يمكن عندئذ الكشف عن الأجسام المضادة المرتبطة المذكورة باستخدام عامل كشف يرتبط مع مُعقَّد مولد الضد/ RPE ويحتوي على مجموعة مرسل قابلة للاكتشاف. الكواشف المناسبة تشمل الأجسام المضادة التي ترتبط مع مُعقَّد مولد الضد / ببتيد RPE والخالية من عديد الببتيد الموسوم ب مجموعة مرسل (على سبيل المثال، في الفحص قبل النهائي للمنافسة). بدلا من ذلك، قد يتم استخدام الفحص قبل النهائي للمنافسة، حيث يكون الجسم المضاد الذي يرتبط مع RPE موسوما بمجموعة مراسل ويسمح له بأن يرتبط مع RPEالمُثبَّت بعد حضانة RPE مع العيِّنة. المدى الذي تثبط به مكونات العيِّنة ارتباط الأجسام المضادة الموسومة بـــ RPE يدل على نشاط العيِّنة مع RPE المُثبَّت.

المادة الحاملة الصلبة يمكن أن تكون أي مادة معروفة لذوي الخبرة العادية في هذا المجال الذي ترتبط به RPE. على سبيل المثال المادة الحاملة يمكن أن تكون تجويف اختبار في طبق ذي عيار حجمي دقيق أو غشاء نيتروسليولوز أو أي غشاء آخر مناسب. بديلا لذلك، المادة الحاملة يمكن أن تكون على شكل أقراص أو خرزات، مثل الزجاج، أو الألياف الزجاجية، أو اللاتكس أو مادة بلاستيكية مثل البولي ستيرين أو البولي ڤينيل كلوريد. المادة الحاملة يمكن أن تكون أيضا عبارة عن جسيم مغناطيسي أو مستشعر من ألياف ضوئية، مثل تلك التي تم الكشف عنها على سبيل المثال، في البراءة الأمريكية رقم 5359681 (U.S. Patent No. 5,359,681).

يمكن أن ترتبط RPE بالمادة الحاملة الصلبة باستخدام العديد من التقنيات المعروفة لذوي الخبرة في هذا المجال. في سياق الحالي الاحتراع، فإن مصطلح "يرتبط مع" يشير إلى كل من الاتحاد غير التساهمي، مثل الامتزاز، والالتحاق التساهمي (والذي يمكن أن يكون عبارة عن ارتباط مباشر بين مولد الضد والمجموعات الوظيفية على المادة الحاملة أو قد يكون ارتباطا عن طريق

عامل تكوين روابط متشابكة). يُفضّل حدوث الربط عن طريق الامتزاز مع تجويف في طبق عيار حجمي أو إلى غشاء. في مثل هذه الحالات، يمكن تحقيق الامتزاز عن طريق تلامس RPE، في محلول مُنظِّم مناسب، مع مادة حاملة صلبة لفترة مناسبة من الوقت. يختلف زمن التلامس مع درجة الحرارة، ولكن عادة بين ساعة واحدة ويوم واحد. بشكل عام، يكون التلامس مع تجويف في طبق عيار حجمي دقيق من البلاستيك (مثل البوليستيرين أو البولي فينيل كلوريد) مع كمية من RPE تتراوح بين 10 نانوجرام إلى 1 جم، ويُفضّل أن تكون 100 نانوجرام، كافيا لربط كمية كافية منRPE .

الإلحاق التساهمي لـــ RPE إلى مادة حاملة صلبة يمكن تحقيقه أولا عن طريق تفاعل المادة الحاملة مع عامل ثنائي الوظيفة يتفاعل مع كل من المادة الحاملة والمجموعة الوظيفية، مثل مجموعة الهيدروكسيل أو الأمينو، على عديد الببتيد. على سبيل المثال يمكن أن يرتبط RPE مع مادة حاملة مع وجود طلاء بوليمر مناسب باستخدام البنزوكينون أو عن طريق تكثيف مجموعة ألدهيد على المادة الحاملة مع أمين والهيدروجين النشط على عديد الببتيد (أنظر، على سبيل المثال، Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) at A12-A13.

في نماذج معينة، يكون الاختبار عبارة عن اختبار امتصاص مناعي مرتبط بالانزيم (ELISA). يمكن تنفيذ هذا الاختبار أولا عن طريق تلامس RPE الذي تم تثبيته على مادة حاملة صلبة، وهو عادة تجويف في طبق ذي عيار حجمي دقيق، مع العيِّنة، بحيث ان هذه الاجسام المضادة المحددة لـــ RPE داخل العيِّنة يُسمح لها بالارتباط مع RPE المُثبَّت. تتم عندئذ إزالة العيِّنة غير المرتبطة منRPE المُثبَّت ويضاف عامل كاشف قادر على الربط إلى مُعقَّد الجسم المضاد المثبت وRPE. يتم عندئذ تحديد مقدار عامل الكشف الذي يظل مرتبطا مع المادة الحاملة الصلبة باستخدام الطريقة المناسبة لعامل الكشف المحدد.

بمجرد تثبيت RPE على الحامل، يتم نمطيا سد مواقع ربط البروتين المتبقية على الحامل. يمكن استخدام أي عامل سد مناسب معروف لذوي الخبرة في هذا المجال، مثل زلال المصل البقري

(BSA) أو Tween 20 من (Sigma Chemical Co.,St. Louis,MO) . يتم عندئذ احتضان RPE المُثبَّت مع العيِّنة، ويسمح للجسم المضاد (إذا كان موجودا في العيِّنة) بأن يرتبط مع RPE. يمكن تخفيف العيِّنة باستخدام مادة مخففة مناسبة، مثل محلول فوسفات ملحي مُنظِّم (PBS) قبل الاحتضان. بصفة عامة، يكون زمن التلامس المناسب (أي زمن الاحتضان) هو الفترة الزمنية التي تكفي للسماح بالكشف عن وجود جسم مضاد داخل العيِّنة. من المُفضَّل، أن يكون زمن التلامس كافيا لتحقيق مستوى من الربط لا يقل عن 95٪ من ذلك الذي يتحقق عند الاتزان بين الجسم المرتبط وغير المرتبط. سوف يدرك المتمرسون في هذا المجال أن الوقت الكافي لتحقيق الاتزان يمكن تحديده بسهولة باختبار مستوى الربط الذي يحدث خلال فترة زمنية محددة. عند درجة حرارة الغرفة، تكون فترة احتضان تبلغ حوالي 30 دقيقة كافية بصفة عامة.

يمكن عندئذ إخراج العيِّنة غير المرتبطة بغسل المادة الحاملة الصلبة بمحلول مُنظِّم مناسب، مثل PBS يحتوي على 0.1٪ من Tween 20tom. يمكن عندئذ إضافة عامل الكشف إلى مادة حاملة صلبة. عامل الكشف المناسب هو أي مركب يرتبط مع مُعقَّد الجسم المضاد المُثبَّت – RPEوالذي يمكن الكشف عنه بأي من الوسائل العديدة المعروفة لذوي الخبرة في هذا المجال. من المُفضَّل، أن يحتوي عامل الكشف على عامل ربط (مثل البروتين أ، البروتين ز، الجلوبيولين المناعي، لكتين أو مولد ضد حر) المترافق مع مجموعة مرسل. تشمل المجموعات المرسلة المُفضَّلة الإنزيمات (مثل البيروكسيداز المأخوذ من الجرجار الحار)، الركائز، العوامل المشتركة، المثبطات، الأصباغ، النيوكليدات المشعة، المجموعات المضيئة، المجموعات الفلورية والبيوتين. يمكن تحقيق ترافُق عامل ربط مع مجموعة مرسل باستخدام الطرق القياسية المعروفة لذوي الخبرة في هذا المجال. عوامل الربط الشائعة يمكن شراؤها مترافقة مع العديد من المجموعات المرسلة من أي مصدر (مثل: Zymed Laboratories,San Francisco,CA and Pierce,Rockford,IL).

يتم عندئذ احتضان عامل الكشف مع مُعقَّد الجسم المضاد غير المُثبَّت RPE لفترة من الوقت تكفي للكشف عن الجسم المضاد المرتبط. الفترة الزمنية الكافية يمكن تحديدها بصفة عامة من تعليمات الصانع أو باختبار مستوى الربط الذي يحدث خلال فترة زمنية معينة. تتم عندئذ إزالة عامل الكشف غير المرتبط ويتم الكشف عن عامل كشف الربط باستخدام مجموعة مرسلة.

تعتمد الطريقة المستخدمة للكشف عن المجموعة المرسلة على طبيعة المجموعة المرسلة. بالنسبة للمجموعات المشعة، يعتبر عد الوميض أو طرق الرسم الإشعاعي الذاتي طرقا مناسبة بصفة عامة. يمكن استخدام الطرق المجهرية للكشف عن الأصباغ، يمكن الكشف عن المجموعات المضيئة والمفلورة. يمكن الكشف عن البيوتين باستخدام الأفيدين، المقترن بمجموعات مرسلة مختلفة (عادة مجموعة مشعة أو مفلورة أو إنزيم). المجموعات المرسلة للإنزيم يمكن الكشف عنها بإضافة الركيزة (بصفة عامة لفترة زمنية محددة)، حيث يلي ذلك تحليل مجهري أو تحليل من نوع آخر لنواتج التفاعل.

لتحديد وجود أو غياب جسم مضاد خاص بالمرض الطُفيلي مثل داء الليشمانيَّات في عيِّنة ما، تتم مقارنة الإشارة المكتشفة من المجموعة المرسلة التي تظل مرتبطة مع المادة الحاملة الصلبة بصفة عامة مع إشارة تناظر قيمة قطع محددة مسبقا. في أحد النماذج المُفضَّلة، تكون قيمة القَطْع هي متوسط الإشارة التي تم الحصول عليها عند احتضان RPE المُثبَّت مع عيِّنة من خاضع غير مصاب. بصفة عامة، تُعتَبر العيِّنة التي تولِّد إشارة تفوق قيمة القَطْع المحددة مسبقا بثلاثة أمثال الانحراف المعياري عيِّنة إيجابية (أي نشطة تجاه RPE). في نموذج مُفضَّل بديل، تتحدد قيمة القَطْع باستخدام Receiver Operator Curve، وفقا للطريقة المشروحة لدى Sackett et al., Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine, p. 106-7 (Little Brown and Co., 1985).باختصار، في هذا النموذج، يمكن تحديد قيمة القَطْع من مخطط لأزواج المعدلات الموجبة الحقيقية (أي الحساسية) والمعدلات الموجبة الزائفة (100٪ خصوصية) والتي تناظر كل قيمة قطع ممكنة لنتيجة اختبار التشخيص.

قيمة القَطْع في المخطط الأقرب إلى الركن العلوي الأيسر (أي القيم التي تحتوي على أكبر مساحة) هي أكثر قيم القطع دقة، والعيِّنة التي تولد إشارة أعلى من قيمة القَطْع المحددة بهذه الطريقة يمكن اعتبارها إيجابية. بديلا لذلك، قيمة القَطْع يمكن إزاحتها إلى اليسار بطول المخطط، لتقليل المعدل الموجب الزائف، أو إلى اليمين، لتقليل المعدل السالب الزائف.

في نموذج ذي صلة، يتم تنفيذ اختبار في صورة اختبار التدفق النافذ أو اختبار الشريط، حيث يتم تثبيت RPE على غشاء مثل النيتروسليلوز. في اختبار التدفق النافذ، الأجسام المضادة داخل العيِّنة ترتبط مع RPE عند مرور العيِّنة عبر الغشاء. يرتبط عامل كشف (على سبيل المثال، البروتين أ – ذهب غرواني)، مع مُعقَّد الجسم المضاد– RPE عندما يتدفق المحلول المحتوي على عامل الكشف عبر الغشاء. يمكن عندئذ القيام بالكشف عن عامل الكشف المرتبط على النحو المبين أعلاه. في صورة اختبار الشريط، يتم غمر واحدة من نهايات الغشاء الذي يرتبط به RPE في محلول يحتوي على العيِّنة. ترحل العيِّنة على طول الغشاء من خلال منطقة تحتوي على عامل كشف وإلى منطقة عديد الببتيد المُثبَّت. تركيز عامل الكشف عند RPE يدل وجود الجسم المضاد المحددة لمولد ضد لطُفيل يتسبب في مرض الليشمانيَّات الطُفيلي في العيِّنة. نمطيا، تركيز عامل الكشف في هذا الموقع يولد نمطا، مثل خط، يمكن قراءته بالعين المجردة. عدم وجود مثل هذا النمط يشير إلى نتيجة سلبية. بصفة عامة، يتم اختيار كمية RPE المُثبَّتة على غشاء لإنشاء نمط ملحوظ بصريا عندما تحتوي عيِّنة على الأجسام المضادة بمستوى من شأنه أن يكون كافيا لتوليد إشارة إيجابية في اختبار ELISA، كما نوقش أعلاه. يُفضَّل أن تتراوح كمية RPE التي تم تثبيتها على غشاء من 25 نانوجرام إلى 500 نانوجرام. عادة يمكن أن يتم تنفيذ هذه الاختبارات باستخدام كمية صغيرة جدا (على سبيل المثال، قطرة واحدة) من مصل أو دم الخاضع.

يمكن لأي خاضع أو طبيب استخدام استخدام هذا الجهاز في المكتب أو المنزل، وتكرار استخدام هذا الجهاز أو الاختبار كلما لزم الأمر.

عادة ما تُستخدم جزيئات إضافية في اختبار كعنصر مقارنة إيجابي أو سلبي. يمكن أن تكون عيِّنة مقارنة نمطية إيجابية هي جسم مضاد يتعرف على الجزيء المعروف أنه موجود في العيِّنة المطلوب فحصها. يمكن أن تكون عيِّنة المقارنة النمطية السلبية هي جسم مضاد يتعرف على الجزيء المعروف أنه غير موجود في العيِّنة المطلوب فحصها.

في هذه الوثيقة وعناصر الحماية الخاصة بها، يتم استخدام التعبير " يشتمل على" ومرادفاته بمفهومه الواسع لكي يعني أن البنود التي تلي الكلمة واقعة في نطاقه، ولكن البنود التي لم تذكر على وجه التحديد غير مستبعدة هي الأخرى. بالإضافة إلى ذلك، فإن تعبير "يحتوي على" يمكن بدلا منه استخدام تعبير "يتكون أساسا من" بمعنى أن المنتج، أو جهاز الاختبار بالترتيب اللذين يمثلان طريقة أو استخداما حسبما هو معرف هنا يمكن أن يشتملا على مكوِّن إضافي (مكونات إضافية) وبالتالي خطوة (خطوات) إضافية أكثر من تلك التي تم تحديدها، هذا المكوِّن الإضافي (المكونات الإضافية)، وبالتالي الخطوة (الخطوات) الإضافية لا تُغيِّر الخاصية المتفردة للاختراع.

بالإضافة إلى ذلك، فإن الإشارة إلى عنصر ما بدون استخدام أداة التعريف لا يعني استبعاد احتمال وجود أكثر من عنصر، مالم يقتض السياق بوضوح وجود عنصر واحد فقط. لذلك فإن عدم وجود أداة التعريف يعني عادة "واحدا على الأقل".

كل الإشارات إلى البراءات والمراجع المذكورة في المواصفات الحالية تم تضمينها كمرجع بالإشارة إليها في مجملها.

سيتم الآن شرح الاختراع بالمثال التالي، والذي لايجب اعتباره حاصرا لنطاق الاحتراع.

الوصف التفصيلي

شكل رقم 1: (أ) تم عمل استشراد كهربي للبروتينات الريبوسومية لليشمانيَّة الطِفلية على تدريج خطي 10-14٪ من جيل SDS-PAGE، وتم نقلها إلى غشاء من النيتروسليولوز واحتضانها مع أمصال من كلاب أصحاء (الأعمدة 1-3)، وأمصال من كلاب مصابة طبيعيا بالليشمانيَّة الطِفلية لديها CVL مع ظهور أعراض (الأعمدة 4-13). تم استخدام الأمصال المنفصلة بتخفيف 200:1. (ب) 2D-PAGE من البروتينات الريبوسومية لليشمانيَّة الطِفلية. يوضح اللوح الأيسر وجود جيل مُبقَّع بالفضة. تم نقل جيل مشابه إلى غشاء من النيتروسليولوز واحتضانه مع مجموعة من أمصال CVL (200:1) المستخدمة في (أ). تم استخدام جسم مضاد مترافق مع بيروكسيداز الجرجار الحار IgG مأخوذ من الكلب كعامل ثانوي.

شكل رقم 2: تقييم مقارن للحساسية التشخيصية لــ LRP وSLA. (أ) نشاط ELISA تجاه الأمصال المأخوذة من الكلاب المصابة بــ CVL مع ظهور الأعراض وأمصال للمقارنة بــ LRP وSLA. (ب) نشاط ELISA تجاه الأمصال المأخوذة من الكلاب قليلة الأعراض وCVL بدون أعراض مع LRP وSLA. القيمة المتوسطة لأمصال CVL موضحة. الأعمدة المتكسرة توضح قيمة القَطْع المحددة باعتبارها الكثافة الضوئية المتوسطة مضافا إليها ثلاثة انحرافات معيارية للقيم التي تم الحصول عليها مع أمصال من عينات مقارنة سليمة.

شكل رقم 3: تقييم مقارن للحساسية التشخيصية لــ LRP وSLA. (أ) نشاط ELISA تجاه الأمصال المأخوذة من كلاب مصابة بــ T. gondii أو T. cruzi مع LRP وSLA. (ب) نشاط ELISA تجاه الأمصال المأخوذة من الكلاب التي تم تلقيحها بــ Leishmune® أو Leishtec® مع LRP وSLA. القيمة المتوسطة لأمصال CVL موضحة. الأعمدة المتكسرة توضح قيمة القَطْع المحددة باعتبارها الكثافة الضوئية المتوسطة مضافا إليها ثلاثة انحرافات معيارية للقيم التي تم الحصول عليها مع أمصال من عينات مقارنة سليمة.

الأمثلة

المواد والطرق

الطُفيليات: تمت تنمية الليشمانيَّة الشاغاسيَّة (MOM/BR/1970/BH46) والليشمانيَّة الطِفلية (MCAN/ES/1996/BCN/150, MON-1) عند 24 م في وسط Schneider من (Sigma, St. Louis, MO, USA) مُكمَّل بـ 20٪ ومصل جنين البقر المُخمَّد بالحرارة (Sigma, St. Louis, MO, USA)، و20 ملي مولار L-glutamine، و200 وحدة/ مل من البنسلين، و100 ميكروجرام/ مل من الاستربتوميسين و50 ميكروجرام/ مل من الجنتاميسين عند رقم هيدروجيني 7.4.

تحضير مولد الضد: تم تحضير SLA من السوطيَّات ذات الطور الثابت من الليشمانيَّة الشاغاسية والليشمانيَّة الطِفلية بعد عدة اقتطافات في مزرعة سائلة، كما سبق شرحه (12). باختصار، تم غسل 2×10^8 من السوطيَّات في كل مل، في حجم يبلغ 5 مل، 3 مرات في محلول فوسفات ملحي مُنظَّم بارد معقم (PBS). بعد 6 دورات من التجميد وفك التجميد ثم المعالجة بالموجات فوق الصوتية (Ultrasonic processor, GEX600)، مع 5 دورات كل منها 30 ثانية عند 38 ميجا هيرتز، تمت معالجة المُعلَّق بالطرد المركزي عند 8000 g لمدة 30 دقيقة عند 4 م وتم تجميع السائل الطافي المحتوي على SLA. تم تقييم تركيزات البروتين باستخدام طريقة Bradford (7) وتم تخزين أجزاء متساوية من 500 ميكرولتر عند -70 م.

تم تحضير LRP من طور لوغاريتمي من السوطيَّات من الليشمانيَّة الطِفلية كما سبق شرحه (22). باختصار، تم تجميع 1×10^9 من السوطيَّات، وتم غسلها مرتان في PBS مبرد مسبقا، وتمت إعادة تعليقها في 1 مل من محلول مُنظَّم للحل NP40 (10 ملي مولار Tris HCl، رقم هيدروجيني 8.0، 150 ملي مولار NaCl، 1.5 ملي مولار $MgCl_2$ و0.5٪ NP40) وتم أخذها بالماصة إلى أعلى وإلى أسفل 10 مرات. بعد الحل، تمت معالجة العينات بالطرد المركزي عند 3000g × لمدة 2 دقيقة عند 4 م لتحبيب النواة. تمت معالجة السائل الطافي مرتين بالطرد المركزي عند 13000g × لمدة 15 دقيقة عند 4 م. تم تعريض السائل الطافي العُصاري

الخلوي الذي تمت تنقيته للطرد المركزي بسرعة عالية تبلغ 90000 لفة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة عند 4 °م في جهاز دوار Beckman TL100.3.تمت إعادة تعليق الحبيبة الريبوسومية الخام في المحلول المُنظِّم أ (20 ملي مولار Tris-HCl، رقم هيدروجيني 7.4، 500 ملي مولار $AcNH_4$، 100 ملي مولار $MgCl_2$، 5ملي مولار β-ميركابتو إيثانول) وطردها مركزيا خلال تدرُّج لمصدر غير مستمر (40/20٪) في المحلول المُنظِّم أ عند 90000 لفة في الدقيقة عند 4 °م في جهاز دوَّار TL100.3.

عينات المصل. تم جمع عينات من المصل في أسبانيا والبرازيل. تم جمع عينات من مصل الدم CVLمن اسبانيا من 28 من الكلاب التي ظهرت عليها أعراض في منطقة إكستريمادورا. تم تقييم الحيوانات المصابة بالليشمانيَّة الطفلية إكلينيكيا وتحليليا في قسم الطُفيليات في كلية الطب البيطري، جامعة إكستريمادورا، كاسيريس، أسبانيا. اعتبرت الحيوانات ذات أعراض عند وجود ثلاثة أو أكثر من الأعراض التالية: فقدان الوزن، الحاصَّة، اعتلال العقد الليمفية، تقعُّر الأظافر، تضخم الكبد، التهاب الملتحمة، والتهاب الجلد التقشري على الأنف، وطرف الذيل والأذن. وكانت جميع الأمصال إيجابية عند اختبارها بواسطة الفلورة المناعية غير المباشرة، ووجود الأشكال السوطية للطُفيل أكدته الملاحظة المباشرة في العقد اللمفاوية والمأبضية وقبل اللوحية. تم الحصول على الأمصال المستخدمة في المقارنة من 8 من الحيوانات السليمة (قسم علم الطُفيليات، جامعة إكستريمادورا).

تم استخدام عينات مصل من 58 من الكلاب المصابة الليشمانيَّة الشاغاسية (44 ظهرت عليها أعراض إكلينيكية، و7 قليلة الأعراض و7 بدون أعراض) من منطقة بيلو هوريزونتي، ميناس جيريس، البرازيل. كما هو موضح أعلاه، تعتبر الحيوانات قد ظهرت عليها الأعراض عند ظهور ثلاثة أو أكثر من الأعراض الإكلينيكية، وتعتبر قليلة الأعراض عند ظهور واحد أو اثنين فقط من الأعراض وتعتبر بدون أعراض عندما تكون خالية من الأعراض الإكلينيكية. كما هو محدد أعلاه، فقد تم تشخيص VL عندما شوهدت السوطيَّات في مَسْحات Giemsa الملوَّنة من

شفط نخاع العظم أو تم التعرف على السوطيّات من مزارع الدم الطرفي أو شفطات نخاع العظام. تم توفير الأمصال من الكلاب بواسطة Evaldo Nascimento and Maria Norma Melo (Department of Parasitology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). تم استخدام المصل من 47 من الكلاب التي تعيش في المناطق الموبوءة بـــ VL ولكن بدون علامات إكلينيكية أو اشتباه في الليشمانيّات الكلبية والتي كانت سلبية بعد الاختبارات المصليّة والطُفيليّة مع الاحتكام إلى مجموعة المقارنة. تم استخدام عينات مصل من أربعة عشر من الكلاب مع إصابات طُفيليّة أخرى لتحليل رد الفعل المتبادل، على النحو التالي : التوكسوبلازما المقوّسة (ن = 5) والمثقبية الكروزية (ن = 9). تم استخدام عينات مصل من الكلاب السليمة والملقحة بـــ Leishmune ® (ن = 18) أو® Leishtec (ن = 23)، في التجارب.

ELISA: تمت تغطية أطباق التقييم المناعي ذات العيار الحجمي الدقيق (Falcon) بالليشمانيّة الطِفلية أو الليشمانيّة الشاغاسية SLA، أو بالليشمانيّة الطِفلية LRP (0.5 ميكروجرام/ عين، لكل منها)، في 100 ميكرولتر من محلول مُنظّم للتغطية رقم هيدروجيني 9.6، 18 ساعة عند 4 °م. تم إنشاء منحنيات معايرة لتحديد أفضل تركيز للبروتين وأفضل تخفيف للجسم المضاد لكي يتم استخدامه. مواقع الربط الحرة التي تم سدها باستخدام PBS-Tween 20 ٪0.05(PBST) و٪3 محلول كازايين لمدة 2 ساعة عند 37 °م. بعد ثلاث غسلات باستخدام PBST، تم احتضان الأطباق باستخدام 100 ميكرولتر من أمصال كلبيّة لمدة 1 ساعة عند 37 °م. تم تخفيف عينات المصل 200:1 في PBST و٪0.3 كازايين. تم غسل الأطباق واحتضانها باستخدام 10000:1 جسم مضاد IgG مضاد للكلب (Sigma,St. Louis,USA) المترافق مع بيروكسيداز الجرجار الحار. تم تنفيذ التفاعل بالاحتضان مع H_2O_2، وأورثو فينيلين داي أمين ومحلول مُنظّم سترات– فوسفات رقم هيدروجيني 5.0، لمدة 30 دقيقة في الظلام وإيقافة باستخدام 20 ميكرولتر H2O2

N 2. تمت قراءة الكثافات الضوئية عند 492 نانومتر في مقياس طيفي ضوئي لطبق دقيق بطريقة ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus. Concord, ON, Canada).

بقعة وسترن. بالنسبة لـ SDS-PAGE تمت إعادة تعليق الليشمانيَّة الطفلية LRPs (15 ميكروجرام) في محلول Laemmli المُنظِّم (المحلول المُنظِّم أ) وتم حله في تدريج من جيلات SDS-PAGE٪14-10 باستخدام مِحسَّة تجريبية مع نظام الجيل الصغير للاستشراد الكهربي BioRad Protein (Hercules, CA, USA). بالنسبة لـ 2D-PAGE، تمت إذابة LRPs لليشمانيَّة الطفلية في 200 ميكرولتر من المحلول المُنظِّم للحل (0.5 ٪ Nonidet P40، 1ملي مولار EDTA، رقم هيدروجيني 8.0، 0.1 ملي مولار PMSF، 10 ملي مولار Tris HCl، رقم هيدروجيني 7.4، و1ملي مولار DTT) وتم استخلاصه بحجم مماثل من الفينول. تم ترسيب البروتينات الموجودة في الطور العضوي باستخدام 5 أحجام من محلول منظم من أسيتات الأمونيوم (0.1 مولار أسيتات أمونيوم مذابة في الميثانول) وغسله ثلاث مرات باستخدام 80٪ أسيتون. تمت إعادة تعليق الحبيبات الجافة في محلول مُنظِّم لإعادة التميؤ (7 مولار يوريا، 2 مولار ثيو يوريا، 5.0٪ IPG محلول مُنظِّم (3-10)، 4٪ CHAPS ، 40 ملي مولار Tris HCl، رقم هيدروجيني 8.8، و0.002٪ أزرق البروموفينول) وتم طرده مركزيا لإزالة المادة غير الذائبة. تم امتزاز البروتينات على Immobiline TM DryStrip، رقم هيدروجيني 3-10، 11 سم (GE Healthcare,Uppsala Sweden). تمت إعادة التميؤ وعمل بؤرة متساوية الكهربية (IEF) باستخدام نظام IPGphor (GE Healthcare) وفقا لتعليمات الصانع. بعد IEF، تمت معادلة شرائح IPG في محلول مُنظِّم للمعادلة (6 مولار يوريا، 2٪SDS ، 0.375 مولار Tris HCl، رقم هيدروجيني 8.8، 20٪ جليسرول، 0.002 ٪ أزرق البروموفينول (ومعه 20 مجم/ مل DTT لمدة 15 دقيقة، ثم بمحلول مُنظِّم للمعادلة ومعه 25 مجم/ مل من يوداسيتاميد لمدة 15 دقيقة أخرى. تم وضع شرائح IPG التي تمت معادلتها على جيلات صغيرة 12٪ SDS-PAGE

(BioRad). تم تبقيع جيل 2D-PAGE باستخدام نيترات الفضة باستخدام طاقم تبقيع الفضة (GE Healthcare).

في كلتا الحالتين، وبعد الاستشراد الكهربي، تم نقل الجيلات إلى أغشية النيتروسليولوز (GE Healthcare). تم جس البُقَع بالمصل (2:1) من كلاب مصابة بالليشمانيَّة الطِفلية بصورة مستقلة (SDS-PAGE) أو كمجموعة (2D-PAGE) . كجسم مضاد ثانوي، تم استخدام جسم مضاد IgG مضاد للكلب مترافق مع بيروكسيداز الجرجار الحار (2000:1) تم شراؤه من Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, The Netherlands) was used.

التحليل الإحصائي: تم اختبار كل تحليلات البيانات للوقوف على دلالتها باستخدام اختبار Student- t غير المزدوج؛ قيم P <0.05 تم اعتبارها ذات دلالة إحصائية.

النتائج

خاصية توليد الضد لليشمانيَّة الطِفلية LRP أثناء الإصابة الكلبية: حتى يمكن تحليل خاصية توليد الضد لليشمانيَّة الطِفلية LRP أثناء الإصابة الكلبية، تم احتضان الأمصال من 10 كلاب مصابة طبيعيا بالليشمانيَّة الطِفلية باستخدام غشاء من النيتروسليولوز يحتوي على مستخلصات LRP من هذا الطُفيل. الأمصال من كل الحيوانات المصابة تعرفت على جزء البروتين المُنقَّى من هذا الطُفيل (شكل رقم 1أ، الأعمدة 4-13). كانت الأمصال المأخوذة من كلاب سليمة سلبية أو أدت إلى تبقيع ضعيف لبعض عديدات الببتيد في المستحضر الريبوسومي الخام (شكل رقم 1أ، الأعمدة 1-3). معظم أمصال CVL تعرفت على عدد كبير من حزم البروتين بالرغم من أن شدة وتعقيد نمط التعرف كانا مختلفين بين الأمصال الكلبية المختلفة. بالرغم من التغيُّر الذي تمت ملاحظته تمت ملاحظة منطقتين للمناعة السائدة في بقعة وسترن: عديدات الببتيد 45-36 كيلو دالتون و25-22 كيلو دالتون، بالترتيب.

للتحليل بمزيد من التفصيل لنمط البروتينات التي تم التعرف عليها، تم فصل مستخلصات LRP باستخدام 2D-PAGE عالي الدقة. كما هو موضح في شكل رقم 1ب، في اللوح الأيمن نجد أن

الجيلات المحضرة باستخدام حمولات بروتين تحضيرية (20 ميكروجرام) قد أظهرت دقة عالية. تم اكتشاف وجود 20 بقعة لمولد الضد عندما تم احتضان جيل 2D-PAGE مع مجموعة من نفس الأمصال السابق استخدامها (شكل رقم 1ب، اللوح الأيمن).

مقارنة LRP وSLA للتشخيص المصلي لـــ CVL : لتحديد ما إذا كان مستخلصLRP يمكن اعتباره أداة مفيدة للتشخيص المصلي لـــ CVL، قمنا بتحديد النشاط تجاه LRP وSLA لـــ 127 عيِّنة مصليَّة كلبية. تكونت مجموعة الأمصال الأولى من 72 عيِّنة من عيِّنات المصل التي تم الحصول عليها من الليشمانيَّة الطفلية (ن= 28) أو الليشمانيَّة الشاغاسية (ن= 44) من الكلاب المصابة التي ظهرت عليها الأعراض. تكونت المجمعة الثانية من الأمصال من 55 كلبا سليما. يوضح شكل رقم 2أ قيم الامتصاص CVL ذات الأعراض وأمصال المقارنة. لكلا مستحضري البروتين، كانت الفروق بين CVL وأمصال المقارنة ذات دلالة إحصائية (P<0.001). قيم طيف الامتصاص منLRP وSLA كانت مختلفة، وهي تمثل نشاطا أعلى لأمصال CVL تجاه SLA (المتوسط= 1.79 ± 0.64) عن ذلك الذي تم الحصول عليه لـــ LRP (المتوسط= 0.90 ± 0.63). حسبما هو موضح بواسطة الانحراف المعياري (SD)، تمت ملاحظة التغيُّر الكبير في قيم الامتصاص مع عينات مصل مستقلة لكل من مستحضري مولد الضد، بالرغم من أن الانحراف المعياري كان أعلى عندما تم استخدام SLA كمولد ضد. نشاط الأمصال السليمة كان أيضا عاليا تجاه SLA (المتوسط= 0.38 ± 0.13) بالمقارنة بنشاطها تجاه LRP (المتوسط= 0.0954 ± 0.047). في ظروف ELISA الموضحة تحت عنوان المواد والطرق كانت قيمة القَطْع لكلا مولدي الضد (التي تعرف بأنها متوسط قيمة النشاط من أمصال سليمة مضافا إليها 3 انحرافات معيارية) 0.237 لـــLRP و0.774 لـــ SLA. سمحت قيم القطع هذه لنا بتحديد الأمصال السالبة والموجبة وبالتالي تقييم أداء بارامترات ELISA (جدول رقم 1). نظرا لأن LRP أظهر أداء مشابها (شدَّة عالية وقيم خصوصية عالية) بالمقارنة بـــ SLA في اختبارات

ELISA يمكن استنتاج أن البروتينات الريبوسومية لليشمانيَّة هي مولدات ضد مناسبة لتشخيص CVL ذات الأعراض.

بعد ذلك، تم اختبار الأمصال من الكلاب قليلة الأعراض (ن= 7) وكذلك التي لم تظهر عليها أعراض (ن= 7) (شكل رقم 2ب). اتضح أن النشاط تجاه LRP وSLA من أمصال كلتا المجموعتين ومجموعة المقارنة السليمة له دلالة إحصائية (P <0.001). بالرغم من استخدام عدد محدود من الأمصال، توضّح البيانات التي تم الحصول عليها أنه حينما تكون الأمصال من كلاب قليلة الأعراض قد تعرَّفت على مستحضرات LRP وSLA (100٪ حساسية)، فإن الأمصال من 30 ٪ من الكلاب التي لم تظهر عليها الأعراض (7/3) أظهرت قيم امتصاص تجاه SLA أعلى من قيمة القَطْع (شكل رقم 2ب). من الناحية الأخرى، الأمصال من الكلاب التي لم تظهر عليها الأعراض لم تُظهِر عند اختبارها قيم امتصاص تجاه LRP أعلى من قيمة القطع. بذلك، تُوضّح نتائجنا أن استخدام LRP يمكن اعتباره أداة جيدة للتشخيص المصلي لـــ CVL.

النشاط المتبادل لـــ LRP وSLA: نظرا لأن LRP يتكون من بروتينات محافظة ملتفَّة، وقد قمنا بتحليل التفاعلات المتبادلة المحتملة لمستخلصات LRP مع أمصال من كلاب مصابة بالحيوانات الأخرى وحيدة الخلية مثل : المقوسة الجوندية (ن= 5) والمثقبية الكروزية (ن= 9). في شكل رقم 3، قيم النشاط للأمصال المستقلة لكل مجموعة تجاه LRP موضحة. لم يُظهر أي مصل من الكلاب المصابة بـــ T. gondii (المتوسط= 0.1012 ± 0.056) أو T. cruzi (المتوسط= 0.101 ±0.06) نشاطا أعلى من القَطْع المحدد بواسطة الأمصال السليمة (أنظر ما سبق). كعينات مقارنة، تم تحليل نشاط نفس الأمصال تجاه SLA. النشاط المتوسط لهذه الأمصال تجاه SLA (0.629 ± 0.21 للكلاب المصابة بـــ T. gondii و0.99 ± 0.29 للكلاب المصابة بـــT. cruzi) كانت أعلى من تلك التي تمت ملاحظتها تجاه LRP. نشاط بعضها كان أعلى من قيمة القَطْع (5/1 للكلاب المصابة بـــ T. gondii و9/7 للكلاب المصابة بـــ T cruzi).

تم أيضا تقييم نشاط الأمصال المأخوذة من الملقحة باثنين من لقاحات الليشمانيَّة الوقائية المرخص بهما في البرازيل: Leishmune® (29) و Leishtec®(15) تجاه مستخلصات LR و SLA. اكتشفنا أن 22.2 ٪ (18/4) من الأمصال من كلاب سليمة ملقحة بـــ Leishmune® أظهرت قيم كثافات ضوئية (O.D.) فوق قيمة القَطْع عند استخدام مستخلصات LRP في اختبارات ELISA(شكل رقم 3ب). عند تحليل نفس الأمصال في SLA أساسها اختبارات ELISA، كانت 16.6٪ (18/3) من الأمصال أيضا فوق قيمة القَطْع (شكل رقم 3ب). لم تُظهِر أي من الـــ 23 مصلا التي تم الحصول عليها من كلاب ملقحة بلقاح Leishtec® نشاطا تجاه SLA. أظهر واحد فقط من هذه الأمصال انتقائية تجاه LRP مع قيمة لـــ .O.D قريبة من قيمة القَطْع المحددة بواسطة أمصال المقارنة السلبية المأخوذة من أصحاء والتي تم تحليلها في شكل رقم 2أ.

المناقشة

العديد من بروتينات الليشمانيَّة السيتوبلازمية داخل الخلية أو النووية مثل الهستونات، وأنواع بروتيناز السيستين أو الكينيزين، تم تحديدها باعتبارها مُولِّدة للضد في داء الليشمانيَّات في البشر أو داء الليشمانيَّات الحشوي الكلبي (VL) (2، 13، 14، 30، 32، 35). أوضحنا في هذا العمل أن البروتينات الريبوسومية في الطُفيل هي أيضا مُولِّدة للضد أثناء مرض CVL. بالرغم من ملاحظة حدوث تغيُّر بين كل حالة وأخرى بين الكلاب، أظهرت كل الأمصال من الكلاب التي تظهر عليها أعراض نشاطا تجاه بعض مكونات الريبوسوم في الطُفيل. نظرا لأن خاصية توليد الضد في البروتينات الريبوسومية في الطُفيل تم أيضا توضيحها في نموذجين فأريين مختلفين من داء الليشمانيَّات الجلدي (22) فقد أوضحت نتائجنا أن ريبوسومات الطُفيل تتداخل مع النظام المناعي للعوائل الفقارية أثناء الإصابات الطبيعية والتجريبية بالليشمانيَّة.

الاختبارات التي تستند إلى التقنيات المصليَّة هي أكثر الطرق شيوعا لتشخيص داء الليشمانيَّات الحشوية في الكلاب والبشر (VL) نتيجة للاستجابة الخلطية الكبيرة التي تصاحب الإصابة بأنواع

الليشمانيَّة ذات الانتحاء الحشوي. بالأخذ في الاعتبار النشاط العالي الذي تتم ملاحظته تجاه مستخلص البروتينات الريبوسومية في الطُفيل من الأمصال المأخوذة من الكلاب المصابة بـــ CVL، قمنا بتحليل الخواص التشخيصية لمستخلصات LRP. تم استخدام اختبارات البروتينات الريبوسومية في الطُفيل كمصدر لمولد الضد في اختبارات ELISA، نظرا لأن هذه التقنية تعتبر دقيقة وحساسة لفحص عدد كبير من العينات لتشخيص مرض VL (16، 33). تم إجراء تحليل مقارن لمستخلصات LRP مع بروتينات الطُفيل الكلية التي تم الحصول عليها من نواتج حل السوطيَّات نظرا لأن استخدام اختبارات ELISA التي تعتمد على -SLA يتضح عادة أن لها حساسية عالية عند تشخيص VL(5، 25، 33). قيم الحساسية والخصوصية لمستخلصات LRP كانت شبيهة بتلك التي أظهرتها SLA عندما تم تحليل الأمصال من كلاب ظهرت عليها أعراض أو كلاب قليلة الأعراض. تم الحصول على زيادة طفيفة في الحساسية مع LRP بالمقارنة بـــ SLA (100٪ و96٪، بالترتيب) و أوضح مصل واحد فقط تم الحصول عليه من كلاب سليمة قيم امتصاص تجاه LRP فوق قيمة القَطْع المحددة نشاط الأمصال المستخدمة في المقارنة. بذلك، يمكن استنتاج أن الأداء التشخيصي لاختبارات ELISA التي تعتمد على SLA كان شبيها بذلك الذي تم الحصول عليه مع مستحضر SLA عند تشخيص CVL مع ظهور الأعراض أو CVL قليل الأعراض. مع ذلك، فإن اكتشاف المرض في الكلاب التي لم تظهر عليها الأعراض يمكن أن يكون حاسما في الدراسات الوبائية للسيطرة على انتشار المرض بين الكلاب وبعضها وكذلك بين الكلاب والبشر (3، 20). نظرا لأن اختبارات ELISA التي تعتمد على SLA فشلت في اكتشاف نسبة كبيرة من حالات CVL التي لم تظهر لها أعراض (27، 31)، قمنا بتحليل حساسية مستخلصات LRP عند تشخيص CVL التي لم تظهر لها أعراض. حيث قام خليط مولد الضد LRP باكتشاف كل الحالات التي لم تظهر لها أعراض (100٪) وقام الاختبار الذي يستخدم مستحضر SLA فقط باكتشاف حوالي 30٪ من الحالات. بالرغم من أن النشاط تجاه LRP يحتاج إلى المزيد من التأكيد باستخدام عدد أكبر من العينات قليلة الأعراض

والعينات التي لم تظهر عليها أعراض، توضح البيانات الخاصة بنا أن LRP يمكن استخدامه كمولد ضد أكثر نشاطا بالمقارنة بـــ SLA عند تشخيص كل أشكال مرض CVL .

خصوصية تجارب ELISA باستخدام SLA تعتمد إلى حد كبير على مستحضر مولد الضد وبعض النتائج الايجابية الكاذبة تم الحصول عليها مع الأمصال التي تم الحصول عليها من مرضى أو كلاب يعانون من أمراض متوطنة مشتركة مثل مرض شاغاس، والملاريا والجذام أو داء المقوسات (16، 23، 31). لهذا السبب تم استخدام عدة بروتينات معاودة الارتباط من طُفيل كمولد ضد بصورة فردية والمولدات الضد في اختبارات ELISA لتطوير اختبار تشخيصي أكثر تحديدا (24). وكشفت اختبارات ELISA المقارنة عموما خصوصية أعلى من التحديد ولكن مع حساسية أقل عند استخدام مولدات الضد معاودة الارتباط الفردية بدلا من SLA في تشخيص داء الليشمانيَّات الحشوي في البشر (25) أو داء الليشمانيَّات الكلبي (31). يمكن ربط قيم الحساسية الأقل بالتغيُّر الذي تتم ملاحظته في رد الفعل الخلطي غير المتجانس الذي يحدث ضد البروتينات في الطُفيل في كل مريض أو كلب مصاب. يمكن أن يحسن انتاج مزيج من مولدات الضد غير ذات الصلة (31) أو انتاج عديدات البروتينات التي تحتوي على مولدات ضد طُفيليَّة عديدة (6 و36) أداء اختبارات ELISA. بدلا من ذلك، يمكن أن تُستخدَم أجزاء الطُفيل التي تمت تنقيتها والتي تحتوي على مولدات ضد من الطُفيليات المختلفة. تُظهِر نتائجنا انه لا يتم التعرف على مستخلصات LRP بواسطة الأمصال من الكلاب المصابة بـــ *T. cruzi* أو *T. Gondii* في حين أن بعض هذه الأمصال أظهر نشاطا عاليا ضد SLA.

ينبغي أيضا الاحتفاظ بخصوصية تشخيص الاختبار عندما يتم الحصول على الأمصال من الكلاب التي تم تطعيمها. بسبب وجود لقاحات تجارية مُرخَّصة (15، 29) سوف سيكون من المرغوب فيه التمييز بين الكلاب المصابة والحيوانات المُلقَّحة. تظهر نتائجنا أنه في حين أن بعض الحيوانات المُلقَّحة بـــ Leishmune ® أظهرت بعض التفاعلات ضد LRP فأن أيا من الحيوانات الملقحة بـــ Leishtec ® لم تفعل ذلك. توضح النتائج المعروضة هنا عند أخذها

بصورة إجمالية أنه يمكن اعتبار مستخلصات LRP بديلا هاما للاستخدام في تشخيص ELISA لـــ CVL وأساسا من الحيوانات التي لم تظهر عليها أعراض للدراسات الوبائية في المناطق الموبوءة.

جدول رقم 1. حساسية وخصوصية اختبارات ELISA باستخدام LRP وSLA للتشخيص المصلي لـــ CVL الذي تظهر أعراضه.

	LRP	SLA
الحساسية [أ]	٪100 (72/0)	٪96 (72/3)
الخصوصية [ب]	٪98.2 (56/1)	٪ 100 (56/0)
PVP [ج]	٪98.6	٪100
PVN [د]	٪100	٪94.9

أ : تم حساب الحساسية من المعادلة [(الكميات الموجبة الحقيقية)/ (الكميات الموجبة الحقيقية + الكميات السالبة غير الحقيقية) × 100]. وبذلك تم تحديد عدد الكميات السالبة غير الحقيقية.

ب : تم حساب الخصوصية من المعادلة [(الكميات السالبة غير الحقيقية //((الكميات السالبة الحقيقية + الكميات الموجبة غير الحقيقية) × 100]. وبذلك تم تحديد عدد الكميات الموجبة غير الحقيقية.

ج: PVP القيمة المتوقعة للمقادير الموجبة تم حساب من المعادلة [(الكميات الموجبة الحقيقية //(الكميات الموجبة الحقيقية + الكميات الموجبة غير الحقيقية) × 100].

د: تم حساب الحساسية من المعادلة [(الكميات السالبة الحقيقية /(الكميات السالبة الحقيقية + الكميات السالبة الحقيقية) × 100].

المراجع

1. Alvar, J., C. Canavate, R. Molina, J. Moreno, and J. Nieto. 2004. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol 57:1-88.

2. Badaro, R., D. Benson, M. C. Eulalio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Netto, D. Pedral-Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R. L. Houghton, J. R. David, and S. G. Reed. 1996. rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis 173:758-61.

3. Baneth, G., A. F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau, and L. Ferrer. 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol 24:324-30.

4. Barbiéri, C. L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunol 28:329-37.

5. Barbosa-De-Deus, R., M. L. Dos Mares-Guia, A. Z. Nunes, K. M. Costa, R. G. Junqueira, W. Mayrink, O. Genaro, and C. A. Tavares. 2002. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 9:1361-6.

6. Boarino, A., A. Scalone, L. Gradoni, E. Ferroglio, F. Vitale, R. Zanatta, M. G. Giuffrida, and S. Rosati. 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of Leishmania infantum for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 12:647-53.

7. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54.

8. Cabrera, G. P., V. O. Da Silva, R. T. Da Costa, A. B. Reis, W. Mayrink, O. Genaro, and C. B. Palatnik-de-Sousa. 1999. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 61:296-301.

9. Cardoso, L., H. D. Schallig, F. Neto, N. Kroon, and M. Rodrigues. 2004. Serological survey of Leishmania infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). Acta Trop 91:95-100.

10. Carvalho, F. A., H. Charest, C. A. Tavares, G. Matlashewski, E. P. Valente, A. Rabello, R. T. Gazzinelli, and A. P. Fernandes. 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant Leishmania donovani A2 antigen. Diagn Microbiol Infect Dis 43:289-95.

11. Ciaramella, P., G. Oliva, R. D. Luna, L. Gradoni, R. Ambrosio, L. Cortese, A. Scalone, and A. Persechino. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. Vet Rec 141:539-43.

12. Coelho, E. A., C. A. Tavares, F. A. Carvalho, K. F. Chaves, K. N. Teixeira, R. C. Rodrigues, H. Charest, G. Matlashewski, R. T. Gazzinelli, and A. P. Fernandes. 2003. Immune responses induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2

antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. Infect Immun 71:3988-94.

13. Chang, K. P., and B. S. McGwire. 2002. Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence. Kinetoplastid Biol Dis 1:1.

14. Chang, K. P., S. G. Reed, B. S. McGwire, and L. Soong. 2003. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Trop 85:375-90.

15. Fernandes, A. P., M. M. Costa, E. A. Coelho, M. S. Michalick, E. de Freitas, M. N. Melo, W. Luiz Tafuri, M. Resende Dde, V. Hermont, F. Abrantes Cde, and R. T. Gazzinelli. 2008. Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) الشاغاسيّة in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine 26:5888-95.

16. Ferreira Ede, C., M. de Lana, M. Carneiro, A. B. Reis, D. V. Paes, E. S. da Silva, H. Schallig, and C. M. Gontijo. 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol 146:235-41.

17. Ferreira, W. A., W. Mayrink, M. L. dos Mares-Guia, and C. A. Tavares. 2003. Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis 45:35-43.

18. Garcia-Alonso, M., C. G. Nieto, A. Blanco, J. M. Requena, C. Alonso, and I. Navarrete. 1996. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid

during Leishmania infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. Parasite Immunol 18:539-46.

19. Goto, Y., R. F. Howard, A. Bhatia, J. Trigo, M. Nakatani, E. M. Netto, and S. G. Reed. 2009. Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dogs. Vet Parasitol 160:215-20.

20. Gramiccia, M., and L. Gradoni. 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int J Parasitol 35:1169-80.

21. Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniasis. Lancet 354:1191-9.

22. Iborra, S., N. Parody, D. R. Abanades, P. Bonay, D. Prates, F. O. Novais, M. Barral-Netto, C. Alonso, and M. Soto. 2008. Vaccination with the Leishmania major ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. Microbes Infect 10:1133-41.

23. Kar, K. 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol 21:123-52.

24.Kubar, J., and K. Fragaki. 2005. Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. Lancet Infect Dis 5:107-14.

25. Maalej, I. A., M. Chenik, H. Louzir, A. Ben Salah, C. Bahloul, F. Amri, and K. Dellagi. 2003. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 68:312-20.

26. Mauricio, I. L., J. R. Stothard, and M. A. Miles. 2000. The strange case of Leishmania chagasi. Parasitol Today 16:188-9.

27. Miro, G., L. Cardoso, M. G. Pennisi, G. Oliva, and G. Baneth. 2008. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol 24:371-7.

28. Nieto, C. G., I. Navarrete, M. A. Habela, F. Serrano, and E. Redondo. 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. Vet Parasitol 45:33-47.

29. Palatnik-de-Sousa, C. B. 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine 26:1709-24.

30. Pollock, K. G., K. S. McNeil, J. C. Mottram, R. E. Lyons, J. M. Brewer, P. Scott, G. H. Coombs, and J. Alexander. 2003. The Leishmania mexicana cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. J Immunol 170:1746-53.

31. Porrozzi, R., M. V. Santos da Costa, A. Teva, A. Falqueto, A. L. Ferreira, C. D. dos Santos, A. P. Fernandes, R. T. Gazzinelli, A. Campos-Neto, and G. Grimaldi, Jr. 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infantum visceral infections in dogs. Clin Vaccine Immunol 14:544-8.

32. Rafati, S., A. Nakhaee, T. Taheri, A. Ghashghaii, A. H. Salmanian, M. Jimenez, M. Mohebali, S. Masina, and N. Fasel. 2003. Expression of cysteine proteinase type I and II of Leishmania infantum and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. Exp Parasitol 103:143-51.

33. Reed, S. G., W. G. Shreffler, J. M. Burns, Jr., J. M. Scott, G. Orge Mda, H. W. Ghalib, M. Siddig, and R. Badaro. 1990. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 43:632-9.

34. Reis, A. B., A. Teixeira-Carvalho, A. M. Vale, M. J. Marques, R. C. Giunchetti, W. Mayrink, L. L. Guerra, R. A. Andrade, R. Correa-Oliveira, and O. A. Martins-Filho. 2006. Isotype patterns of الجلوبيولين المناعي s: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. Vet Immunol Immunopathol 112:102-16.

35. Requena, J. M., C. Alonso, and M. Soto. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. Parasitol Today 16:246-50.

36. Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, and C. Alonso. 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 36:58-63.

SEQUENCE LISTING

<110> Laboratorios LETI S.L.

<120> Diagnosis of a parasitic disease such as Leishmaniasis using Ribosomal Protein Extract (RPE)

<130> P6026586PCT

<150> EP 09165282.6
<151> 2009-07-13

<150> US 61/267,214
<151> 2009-12-09

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 322
<212> PRT
<213> Leishmaniasis chagasi

<400> 1

Met Pro Ser Ile Thr Thr Ala Lys Arg Glu Tyr Glu Glu Arg Leu Val
1 5 10 15

Asp Cys Leu Thr Lys Tyr Ser Cys Val Leu Phe Val Gly Met Asp Asn
20 25 30

Val Arg Ser Gln Gln Val His Asp Val Arg Arg Gly Cys Arg Gly Lys
35 40 45

Ala Glu Phe Ile Met Gly Lys Lys Thr Leu Gln Ala Lys Ile Val Glu
50 55 60

Lys Arg Ala Gln Ala Lys Asp Ala Ser Pro Glu Ala Lys Pro Phe Asn
65 70 75 80

Asp Gln Cys Glu Glu Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Asn Thr Gly Leu Ile
85 90 95

Phe Thr Asn Asn Ala Val Gln Glu Ile Thr Ser Val Leu Asp Gly His
100 105 110

Arg Val Lys Ala Pro Ala Arg Val Gly Ala Ile Pro Cys Asp Val Val
115 120 125

Val Pro Ala Gly Ser Thr Gly Met Glu Pro Thr Gln Thr Ser Phe Phe
130 135 140

Gln Ala Leu Asn Ile Ala Thr Lys Ile Ala Lys Gly Met Val Glu Ile
145 150 155 160

Val Thr Glu Lys Lys Val Leu Ser Val Gly Asp Lys Val Asp Asn Ser
165 170 175

Thr Ala Thr Leu Leu Gln Lys Leu Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Tyr Gln
180 185 190

Val Asn Val Leu Ser Val Trp Asp Arg Gly Val Leu Phe Thr Arg Glu
195 200 205

Asp Leu Met Met Thr Glu Asp Met Val Glu Lys Met Leu Met Glu Gly
210 215 220

Leu Ser Asn Val Ala Ala Met Ala Leu Gly Ala Gly Ile Pro Thr Ser
225 230 235 240

Ser Thr Ile Gly Pro Met Leu Val Asp Ala Phe Lys Asn Leu Leu Ala
245 250 255

Val Ser Val Ala Thr Ser Tyr Glu Phe Glu Glu His Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Leu Arg Glu Ala Ala Ile Asn Gly Leu Leu Ala Gly Ser Gly Ser Ala
275 280 285

Ala Ala Glu Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala
290 295 300

Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Phe Gly Met Gly Gly
305 310 315 320

Leu Phe

عناصر الحماية

1 1- استخدام مستخلص بروتيني ريبوسومي (RPE) لتشخيص مرض طُفيلي في
2 مريض.

1 2- استخدام وفقا لعنصر الحماية رقم 1، حيث RPE يشتمل على اثنين على الأقل
2 من البروتينات الريبوسومية و/ أو اثنين على الأقل من مولدات الضد لبروتين
3 ريبوسومي و/ أو اثنتين على الأقل من شظايا البروتين لبروتين ريبوسومي.

1 3- استخدام وفقا لعنصر الحماية رقم 2، حيث تكون شظية البروتين عبارة عن
2 شظية تشتمل على الأقل على 2، 3، 5، 7، 10، 15، 20، 25، 30 أو أكثر من
3 الأحماض الأمينية المتجاورة لبروتين ريبوسومي مناظر.

1 4- استخدام وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 3، حيث لا يشتمل RPE على،
2 أو لا يتكون من، قمة لاصقة تنشأ من مولد الضد الريبوسومي الحمضي LcPo من
3 داء الليشمانيّات الشاغاسيّة حسبما تم الكشف عنه في الطلب الأوروبي 824 699
4 (EP824 699)، والذي تمثله المتوالية رقم: 1، والأفضل، أن RPE لا يشتمل على أو
5 لا يتكون من الأحماض الأمينية الـ 17 الموجودة في الطرف C من LcPo: وهي
6 الأحماض الأمينية 306-322 من LcPo والتي تمثلها المتوالية رقم: 1.

1 5- استخدام وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 4، حيث يمكن الحصول على
2 المستخلص البروتيني الريبوسومي بتنفيذ الخطوات التالية باستخدام خلية طُفيليّة
3 تسبب مرضا طُفيليا عند وجودها في مريض:

أ- خلط خلية طُفيليَّة مع محلول مُنظِّم يستخدم للحل،

ب- عمل طرد مركزي للخليط الذي تم الحصول عليه للحصول على مستخلص عُصاري خلوي،

ج- تحضير المستخلص البروتيني الريبوسومي من المستخلص العُصاري الخلوي الذي تم الحصول عليه.

6- استخدام وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 5، حيث يتم الحصول على المستخلص البروتيني الريبوسومي من أحد أنواع الليشمانيا، ويُفضَّل الليشمانيَّة الكَبيرَة.

7- استخدام وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 6، حيث يكون المرض الطُفيلي عبارة عن داء الليشمانيَّات أو الملاريا.

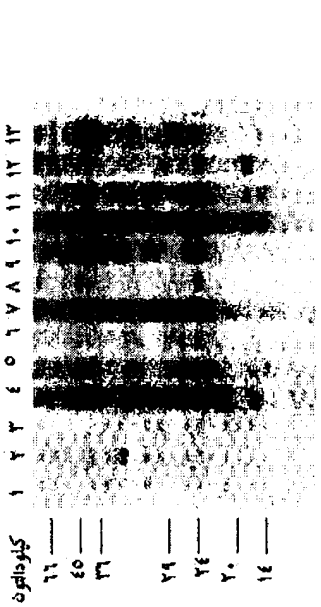
8- استخدام وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 7، حيث يكون المرض الطُفيلي ناتجا عن الليشمانيَّة أو بواسطة نوع المُتَصَوِّرَة.

9- استخدام وفقا لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 8، حيث يكون المرض الطُفيلي ناتجا عن أنواع مختلفة عن الأنواع التي يتم منها اشتقاق المستخلص البروتيني الريبوسومي.

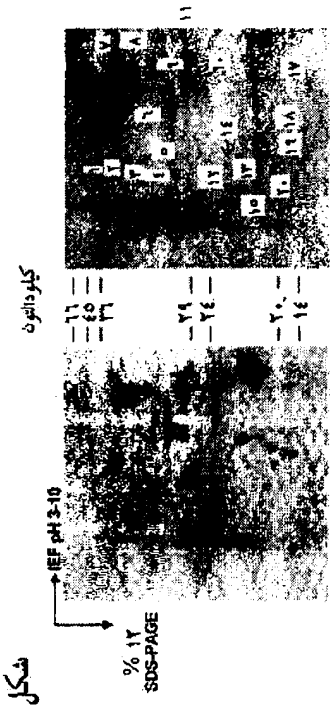
10- طريقة لتشخيص المرض الطُفيلي في مريض باستخدام RPE حسبما تم تحديده في أي من عناصر الحماية من 1 إلى 9، حيث تشتمل الطريقة على تحديد ما إذا كان الجسم المضاد الذي يتعرف على RPE موجودا في العيِّنة التي تم الحصول عليها من المريض أم لا.

11- اختبار لتشخيص المرض الطُفيلي في مريض، حيث يشتمل الاختبار على RPE.

12- اختبار وفقا لعنصر الحماية رقم 11، حيث يكون الاختبار هو ELISA.

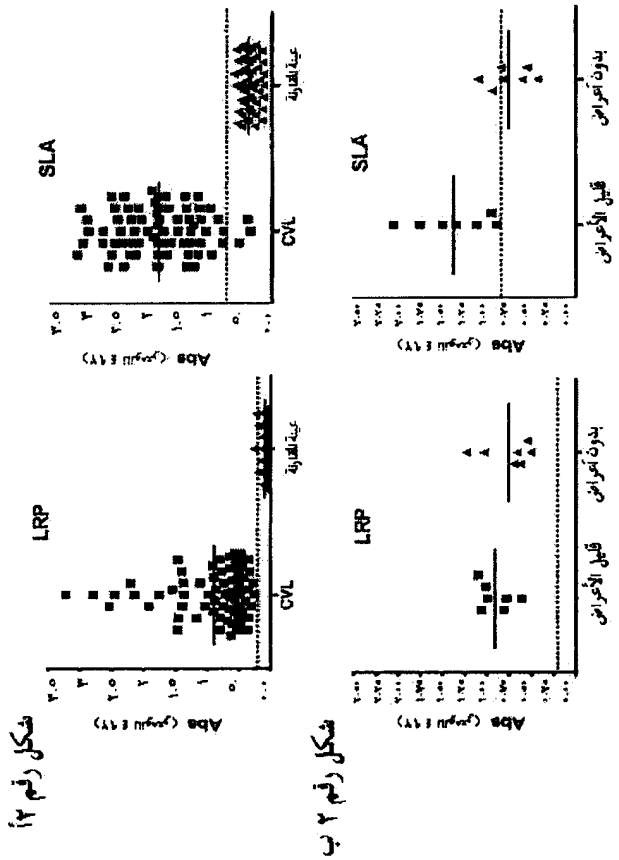


شكل رقم ١أ



شكل رقم ١ب

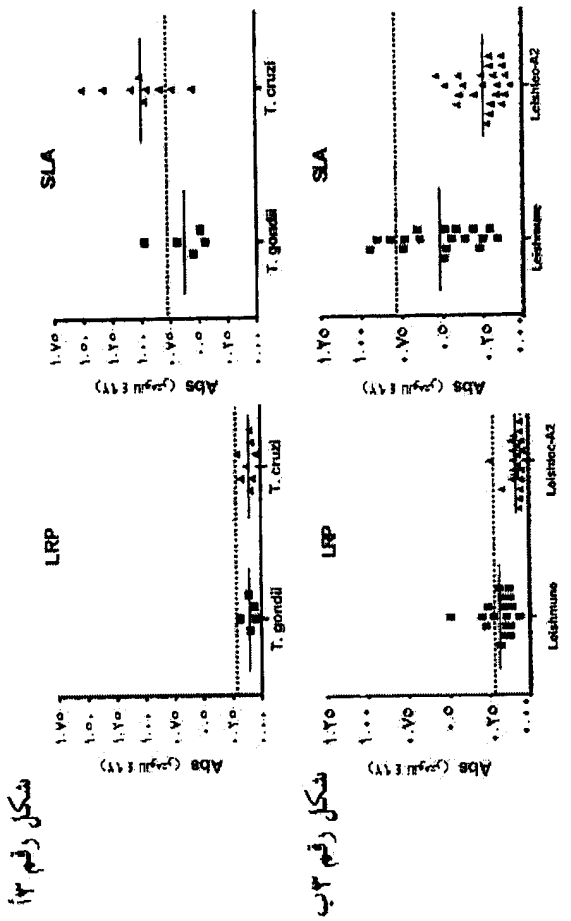
شكل 1-1



شكل رقم ٢ أ

شكل رقم ٢ ب

شكل 1-2



شكل رقم ٣أ

شكل رقم ٣ب

شكل 1-3