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 34472 B1

(51) Cl. internationale :
G01N 33/68; G01N 33/558

(43) Date de publication :
01.08.2013

---

(21) N° Dépôt :
35667

(22) Date de Dépôt :
15.02.2013

(30) Données de Priorité :
17.08.2010 EP 10173056.2 ; 17.08.2010 US 61/374,313

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/NL2011/050564 16.08.2011

(71) Demandeur(s) :
STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT, GEERT GROOTEPLEIN-ZUID 10 NL-6525 CA NIJMEGEN (NL)

(72) Inventeur(s) :
JOOSTEN, Leonardus Antonius Bernardus ; NETEA, Mihai Gheorghe ; VAN DER MEER, Johannes Willem Maarten ; KULLBERG, Bart Julian ; VAN DEUREN, Marcel

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

---

(54) Titre : **NOUVELLE MÉTHODE DE DIAGNOSTIC DE LA FIÈVRE Q À L'AIDE D'UN TEST IMMUNOLOGIQUE CELLULAIRE**

(57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE UNE MÉTHODE DE DIAGNOSTIC DE LA FIÈVRE Q CHEZ UN SUJET, LA MÉTHODE COMPRENANT LES ÉTAPES DE : (A) OBTENTION D'UN ÉCHANTILLON PRÉLEVÉ SUR LEDIT SUJET, (B) MISE EN CONTACT DUDIT ÉCHANTILLON AVEC UNE SOURCE D'ANTIGÈNE DE COXIELLA BURNETII ET (C) DÉTERMINATION DU NIVEAU D'EXPRESSION D'UNE CYTOKINE PRO-INFLAMMATOIRE, TELLE QUE IFN-?, DANS LEDIT ÉCHANTILLON À LA FIN DE L'ÉTAPE (B).

MA 34472B1

(طريقة جديدة لتشخيص حمى Q باستخدام اختبار مناعي خلوي)

الملخص

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لتشخيص حمى Q في خاضع، وتتضمن الطريقة الخطوات التالية:

(أ) الحصول على عينة من الخاضع المذكور،

(ب) تلامس العينة المذكورة مع مصدر لمولد الضد Coxiella burnetii

(ج) تحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ في العينة المذكورة في نهاية الخطوة (ب).

MA 34472B1

N°35667
du 15.02.2013

01 AOUT 2013

(طريقة جديدة لتشخيص حمى Q باستخدام اختبار مناعي خلوي)

الوصف الكامل

المجال التقني

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لتشخيص حمى Q في خاضع، من خلال تحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل الإنترفيرون- جاما.

الخلفية التقنية

تعد الحمى Q عبارة عن عدوى جهازية سببها بكتريا بين الخلوية Coxiella burnetii. وتكون العدوى شائعة في الحيوانات، خاصة الماشية، وتنقلها إلى الإنسان بشكل أساسي عن طريق الهواء الحامل للبكتريا. ويختلف تمثيل المرض بشكل واسع، يتراوح من العدوى بدون أعراض، إلى مرض الحمى الحاد المصاحب غالبًا للالتهاب الرئوي، وحمى Q المزمنة المعقدة (بشكل أساسي التهاب الشغاف أو التهاب الأوعية الدموية) وتعب ما بعد حمى Q.

تواجه هولندا حاليًا اندلاع شديد لحمى Q، ذات صلة بمزارع الماعز. منذ 2007، حدثت زيادة في عدد الحالات البشرية المصابة.

يستند التشخيص إلى تاريخ التعرض للإصابة والفحص الإكلينيكي على PCR وعلم الأمصال. بسبب الصعوبة في زراعة Coxiella burnetii في المعمل، والتغير في استجابة الجسم المضاد، والصعوبات لمعرفة قياسية الأمصال، عادة لا يكون تشخيص المعمل سهلاً. يتم الحصول على بعض الأوزان للأجسام المضادة الخاضعة لأطوار، عندما تتم ملاحظة الأجسام المضادة ذات الطور 1 في الإصابة المزمنة وتتعلق الأجسام المضادة ذات الطور 2 بالإصابة الحادة. ومن تراكم الخبرات في الحالات المعقدة في الوباء الهولندي الحالي، لدينا خبرة بأن نتائج علم الأمصال يمكن

أن تكون ملتبسة.

في حالة التشخيص في المرحلة الحادة، يمكن علاج المرض باستخدام مسار قصير نسبيًا من المضاد الحيوي الدوكسي سيكلين، لكن الحمى Q المزمنة تكون أصعب بكثير في علاجها. ولحمى Q المزمنة معدل وفيات مرتفع. وتمثل أحد المواقف الخاصة الإصابة بحمى Q في المرأة الحامل، التي يتعرض فيها الجنين للخطر وتكون إدارة الأمر غير واضحة بالكامل.

وتمثل المنطقة الخاصة حيث تكون الأداة التشخيصية هامة هي تلقيح حمى Q في البشر. حاليًا، يتم فحص المرضى باستخدام الأمصال واختبار الجلد، وفقط في حالة وجد أن الاختبارين سلبيين، يتم اعتبار التلقيح إجراء آمن. وليس من السهل إجراء اختبار الجلد بل شاق. وحساسيته وخصوصيته غير معروفة.

لذلك توجد حاجة للحصول على طريقة محددة وحساسة لتشخيص حمى Q في خاضع، لتخطي كافة السلبيات في الطرق الموجودة. بالإضافة إلى ذلك، لا تقيم الاختبارات الحالية (باستثناء اختبار الجلد) حالة المناعة الخلوية المحددة، التي تكون ضرورية لعلاج الإصابة.

الوصف التفصيلي

طريقة التشخيص

في جانب أول، يتعلق الاختراع بطريقة لتشخيص حمى Q في خاضع، وتتضمن الطريقة الخطوات التالية:

(أ) الحصول على عينة من الخاضع المذكور،

(ب) تلامس العينة المذكورة مع مصدر لمولدات الضد Coxiella burnetii،

(ج) تحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب في العينة المذكورة في نهاية الخطوة

(ب).

السيتوكين المساعد للالتهاب عبارة عن سيتوكين قادر على تحسين الالتهاب الجهازي. ويُفضل اختيار السيتوكين المساعد للالتهاب من المجموعة المحتوية على IL-1β أو IFNγ أو IL-6 و-IL 17. ويمثل IFNγ السيتوكين المساعد للالتهاب المفضل في هذا السياق.

في سياق الاختراع، من الأفضل أن يعني "تشخيص حمى Q" أن التشخيص وصل إلى:

- خاضعين مصابين بحمى Q حادة
- خاضعين مصابين بحمى Q مزمنة
- خاضعين مصابين بتعب ما بعد حمى Q

الخاضعين المصابين بحمى Q ينبغي ألا يستقبلو لذلك مصل حمى Q. الخاضعين غير المصابين بـ Coxiella burnetii، لن ينتجوا السيتوكينات هذه في المعمل. بمجرد المستوى القابل للكشف للسيتوكين المساعد للالتهاب يتم كشفه في الخطوة ج)، يتم تشخيص الإصابة بحمى Q حادة أو الإصابة بحمى Q مزمنة أو التعب ما بعد حمى Q في خاضع.

في هذا السياق، تعني الإصابة بحمى Q حادة مؤخرًا الإصابة المكتسبة الحادثة بواسطة Coxiella burnetii. ويمكن أن تعني "مؤخرًا" يوم واحد على الأقل أو يومين أو 3 أو 4 أو 5 أو 6 أو 7 أيام على الأقل أو أطول ولكن لا يتجاوز الثلاثين يومًا.

وفي هذا السياق، تعني الإصابة بحمى Q مزمنة المرض الحادث بسبب وجود Coxiella burnetii منذ ثلاثين يومًا أو أكثر.

وفي هذا السياق، تعني الإصابة بالتعب ما بعد حمى Q أن التعب الحاد بعد الإصابة الحادثة بواسطة Coxiella burnetii.

ويكون العرض/ المتغير المصاحب للإصابة بحمى Q حادة هو حمى أو التهاب رئوي أو التهاب الكبد.

يمكن تشخيص خاضع مصاب بحمى Q حادة بإجراء اختبار الاختراع. بدون الرغبة في التقيد بأي نظرية، نتوقع أنه يمكن كشف استجابة للسيتوكين متوسطة في هذا الخاضع. ويكون الاختبار سريعًا ويضيف قيمة جديدة لعلم الأمصال الحالي.

يمكن تشخيص خاضع مصاب بحمى Q مزمنة بإجراء اختبار الاختراع. بدون الرغبة في التقيد بأي نظرية، نتوقع أنه يمكن كشف استجابة للسيتوكين أعلى في هذا الخاضع عن الخاضع المصاب بحمى Q حادة. ويكون الاختبار سريعًا ويضيف قيمة جديدة لعلم الأمصال الحالي.

في سياق الاختراع، يمكن أن يكون الخاضع إنسان أو حيوان. يمكن أن يكون الحيوان عبارة عن عنزة. يمكن تطبيق طريقة التشخيص بقدر ما يلزم في الخاضع. في حالة كان الخاضع إنسان، يمكن أن يكون الخاضع شخص معرض لخطورة عالية من الإصابة أو تطور الإصابة لحمى Q مزمنة، على سبيل المثال، وفقًا لحقيقة أن الخاضع يعيش في منطقة حيث تكون حمى Q فيها شائعة مثل هولندا أو فرنسا أو استراليا. في أحد النماذج، ليس من المعروف سواء تمت إصابة الخاضع ببكتريا حمى Q Coxiella burnetii. في حالة كان الخاضع حيوان، على سبيل المثال، عنزة، يتم استخدام الاختراع لإجراء تشخيص الإصابة بالعدوى بواسطة Coxiella burnetii. في أحد النماذج، لم يتم تلقيح الخاضع المراد تشخيصه بطريقة الاختراع بلقاح مضاد لحمى Q.

في إحدى الطرق المفضلة، يتم تشخيص الحمى Q عندما تؤدي الخطوة (ج) إلى اكتشاف مستوى التعبير الممكن اكتشافه أو المتزايد للسيتوكين المساعد للالتهاب.

اختياريًا في طريقة الاختراع، يمكن مقارنة مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مناهض للالتهاب كما هو محدد في الخطوة (ج) مع قيمة مرجعية لمستوى التعبير الوراثي المذكور في عينة مقارنة. في

سياق الاختراع، من الأفضل أن تكون "القيمة المرجعية" لمستوى التعبير الوراثي للسيتوكين المذكور هي متوسط القيمة لمستوى التعبير الوراثي المذكور في عينة المقارنة. يمكن اشتقاق عينة المقارنة من الخاضع المقارن أو خواضع المقارنة أو من وسط الزراعة المستخدم بالخطوة (ب). يمكن أن يكون الخاضع عبارة عن خاضع لا يعيش في منطقة معرضة للخطر أو لا يتعرض لتلامس بالحيوانات. يمكن أن تعني "قيمة مرجعية" أنه لا يمكن كشف مستوى السيتوكين. ويمكن إدراك تقييم مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مباشرة عند مستوى التعبير الوراثي للبروتين (تحديد كمية بروتين السيتوكين المذكور)، و/ أو بشكل غير مباشر تحديد كمية متوالية النوكليوتيد التي تشفر السيتوكين المساعد للالتهاب. ويعد تشفير متوالية حمض النوكليوتيد المفضلة IFN-γ هو كالمتوالية بهوية رقم 2. وسيفهم الشخص الماهر أنه من الممكن عزل الصور الأيزومرية المتعددة لـ IFN-γ اعتماداً على الخاضع أو العينات المختبرة.

في أحد النماذج المفضلة، تتضمن IFN-γ المراد تحديد كميتها: IFN-γ

- مطابقة بنسبة 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % على الأقل, أو 100 % لمتوالية بهوية رقم: 2 و/ أو

- يتم تشفيرها بواسطة متوالية حمض نوكليوتيد تكون مطابقة بنسبة 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % على الأقل, أو 100 % لمتوالية بهوية رقم: 1.

في نموذج مفضل آخر، تشتمل متوالية حمض النوكليوتيد التي تشفر □ IFN-γ كسيتوكين مساعد للالتهاب كما هو موصوف هنا في هذا الطلب) المراد تحديد كميتها على:

- مطابقة بنسبة 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % على الأقل, أو 100 % لمتوالية بهوية رقم: ذ و/ أو

- تشفير متوالية حمض أميني لـ IFN-γ تكون مطابقة بنسبة 60 %, 70 %, 80 %, 90

%, 95 % على الأقل, أو 100 % لمتوالية حمض أميني مشفرة بواسطة متوالية بهوية رقم: 1.

ثم تم تعريف المطابقة هنا في هذا الطلب بعد ذلك. ومن الأفضل أن يتم إجراء تحديد الكمية لمتوالية نوكليوتيد التي تشفر IFN-γ و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب كما هو موصوف هنا في هذا الطلب باستخدام أساليب بيولوجية جزيئية كلاسيكية مثل تحليل PCR (الوقت الفعلي)، أو تحليل بالمصفوفات أو تحليل شمالي. في هذا النموذج، تعني متوالية النوكليوتيد التي تشفر IFN-γ و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب كما هو موصوف هنا في هذا الطلب مراسل RNA (mRNA). على نحو بديل، وفقًا لنموذج مفضل آخر، في طريقة التشخيص يتم تحديد مستوى التعبير الوراثي لـ IFN-γ و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب آخر كما هو موصوف هنا في هذا الطلب مباشرة بواسطة تحديد كمية IFN-γ و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب آخر. يمكن إجراء عملية تحديد كمية البولي ببتيد بواسطة أي أسلوب معروف. ومن الأفضل، يتم تحديد كمية البولي ببتيد باستخدام جزئ يرتبط بشكل خاص بـ IFN-γ (و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب آخر كما هو موصوف هنا في هذا الطلب). يتم اختيار جزيئات الارتباط المفضلة من: جسم مضاد، تتم زيادته على وجه التحديد لإدراك IFN-γ (و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب آخر كما هو موصوف هنا في هذا الطلب)، أي جزئ آخر معروف أنه يرتبط تحديدًا بـ IFN-γ (و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب آخر كما هو موصوف هنا في هذا الطلب). يمكن استخدام مثل هذا الجسم المضاد في أي تجربة مناعية معروفة للشخص الماهر مثل western blotting أو ELISA (اختبار Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) أو FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) باستخدام خرزات لاتكس. تحضير الجسم المضاد معروف للأشخاص الماهرين في المجال. تم تقديم شرح قصير للطرق الممكن استخدامها لتحضير الأجسام المضادة بعد ذلك هنا في هذا الطلب. في سياق الاختراع، يمكن أن يكون أي جزئ آخر معروف

بالارتباط بـ IFN-γ (و/ أو سيتوكين مساعد للالتهاب آخر كما هو موصوف هنا في هذا الطلب) عبارة عن حمض نووي، على سبيل المثال، منطقة تنظيم DNA، بولي ببتيد، ناتج أيض، ركيزة، عنصر تنظيمي، مكون هيكلي، جزئ شابيرون (نقل)، شبيه الببتيد، غير شبيه الببتيد، أو أي نوع آخر من المجموعات الترابطية. وتم تعريف الشبيه هنا في هذا الطلب بعد ذلك. وتشتمل أمثلة الجزيئات المعروفة بالارتباط بـ سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ، على مستقبل سيتوكين مساعد للالتهاب المذكور مثل مستقبل IFN-γ، جسم مضاد موجه ضد السيتوكين المساعد للالتهاب المذكور مثل IFN-γ. يمكن كشف ارتباط سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ إلى جزئ ارتباط ثاني بواسطة أي طرق قياسية معروفة لهؤلاء الماهرين في المجال. تشتمل الطرق المناسبة على اختبارات الارتحال الكهربائي المشترك بكروماتوجراف الألفة و elisa. سيفهم الشخص الماهر أنه على نحو بديل أو بالاندماج مع تحديد كمية متوالية حمض النووي التي تشفر السيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ و/ أو بولي ببتيد مناظر، يتم تضمين تحديد كمية ركيزة بولي ببتيد مناظر أو أي مركب معروف ارتباطه بوظيفة أو نشاط بولي ببتيد مناظر أو تحديد كمية وظيفة أو نشاط بولي ببتيد مناظر باستخدام تجربة محددة داخل نطاق طريقة التشخيص الخاصة بالاختراع. على سبيل المثال، يمكن تحديد النشاط الانتقالي للجين المستهدف بواسطة سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ أو جزئ قادر على ربط السيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ (تحديدًا، جزئ ربط IFN-γ) وتحديد كميته، على سبيل المثال في اختبار سرعة انتقال العدوى التي يتم فيها ربط محسن الجين المستهدف إلى مراسل جينات، على سبيل المثال، إنزيم P- جالاكتوزيداز أو لوسيفيراز. ويمكن إجراء هذه التقييمات في المختبر أو في جسم الكائن الحي أو خارج جسم الكائن الحي. في طريقة الاختراع، يتم استخدام عينة من خاضع. لذلك تعد طريقة الاختراع عبارة عن طريقة في جسم الكائن الحي أو خارج جسم الكائن الحي. ومن الأفضل أن تشتمل عينة أو تتكون من مائع تم

الحصول عليه من خاضع. والأكثر تفضيلاً، يشتمل المائع على أو يتكون من أو يتم اختياره من: البول، أو الدم، أو السائل النخاع الشوكي، أو اللعاب، أو المني، أو غسل القصبات. المائع المفضل عبارة عن، أو يتضمن، أو يحتوي على، أو يتم اشتقاقه من الدم. يمكن تخفيف الدم قبل استخدامه مرة أخرى. ويمكن أن يكون التخفيف 1 : 4، أو 1 : 5، أو 1 : 6 في وسط زراعة أو محلول منظم.

في طريقة خاصة بالاختراع، يتم تلامس عينة الخطوة (أ) المذكورة التي تم الحصول عليها بمصدر لمولد الضد Coxiella burnetii بعد ذلك. يعتمد اختيار مولد الضد على سلالات Coxiella burnetii السائدة في مناطق مختلفة في العالم. ويمكن أن تبلغ مدة التلامس ساعة واحدة أو ساعتين أو 3 أو 4 أو 5 أو 6، أو 7، أو 8 ساعات، أو 12، أو 24، أو 30، أو 48، أو 60، أو 70، أو 80، أو 90، أو 93، أو 96، أو 100، أو 110 ساعة، أو أكثر. ومن الأفضل أن تتراوح مدة التلامس من 4 ساعات إلى 96 ساعة. ويمكن أن تكون خطوة التلامس هذه عبارة عن خطوة زراعة في وسط استزراع مثل RPMI 1640. يمكن أن يعني مصدر لمولد الضد Coxiella burnetii أنه يتم استخدام خلية Coxiella burnetii كاملة. في أحد النماذج المفضلة، يتم إيقاف نشاط خلية Coxiella burnetii كاملة بالحرارة أو مثبتة بالفورمالين. يمكن استبدال إيقاف النشاط بالحرارة بالقتل بالحرارة. ويعرف الشخص الماهر في المجال كيفية الحصول على خلايا Coxiella burnetii غير منشطة بالحرارة أو مثبتة بالفورمالين. ومن الأفضل أن يتم تحضير خلايا معطل نشاطها بالحرارة بواسطة التسخين عند درجة حرارة تبلغ 95، أو 96، أو 97، أو 98 أو 99° م لمدة 20 دقيقة أو 25 دقيقة أو 30 دقيقة. والأكثر تفضيلاً يتم تحضير خلايا معطل نشاطها بالحرارة بواسطة التسخين عند 99° م لمدة 30 دقيقة. يمكن الحصول على خلايا مركزة بالفورمالين من خلال تلامس الخلايا مع الفورمالدهيد لمدة 40 أو 50 أو 60 دقيقة. والأكثر تفضيلاً، يتم تلامس الخلايا أو نقلها إلى 4 % فورمالدهيد لمدة

ساعة واحدة. بعد ذلك، يتم غسل الخلايا عدة مرات باستخدام محلول منظم PBS (محلول فوسفات ملحي منظم). على نحو بديل، يمكن استخدام خلية Coxiella burnetii. ومن الأفضل أن يكون جزء من خلية Coxiella burnetii عبارة عن جزء مولد ضد منه؛ أو يشتمل أو يحتوي على مولد ضد. يمكن أن يكون مولد الضد عبارة عن بروتين، و/ أو خلاصة البروتين و/ أو جزء منه، يمكن أن يكون في صورة منقاة أو يمكن تضمينه داخل تركيبة خام، ومن الأفضل من أصل حيوي، مثل ليسات أو سونيكات أو فيكسات من Coxiella burnetii. على نحو بديل، يمكن تصنيع مولد ضد كيميائيًا أو إنتاجه بشكل إنزيمي في المختبر. كما يمكن أيضًا أن يكون مصدر البروتين، أو جزء منه كمولد ضد، عبارة عن حمض نووير يشفر المتوالية المذكورة سابقًا، أو جزء منه، من نموذج RNA أو نموذج DNA. في نموذج مفضل، يكون مصدر لمولد الضد Coxiella burnetii عبارة عن خلية Coxiella burnetii كاملة أو مولد ضد من الخلية المذكورة ويعد استخدام خلية Coxiella burnetii كاملة جاذبًا ومفضل عن استخدام جزء من خلية Coxiella burnetii لسببين على الأقل. يعد استخدام خلية Coxiella burnetii كاملة أسهل وأرخص للشخص الماهر. لا توجد حاجة لتحديد الأجزاء المناسبة وتصنيعها بعد ذلك (تحديدًا، الأجزاء المولدة للضد) في خلية Coxiella burnetii. بالإضافة إلى ذلك، باستخدام خلية Coxiella burnetii كاملة، توجد كافة الأجزاء المناسبة الفعالة (تحديدًا، كافة مولدات الضد) في خلية Coxiella burnetii. ولذلك من المتوقع أن طريقة التشخيص ستكون أكثر حساسية وفعالية عن طريقة التشخيص المناظرة المطبقة باستخدام مولد ضد محدد. تم الحصول على نتائج واعدة جدًا باستخدام خلية Coxiella burnetii كاملة غير نشطة بالحرارة (في الشكل رقم 2).

وبعد ذلك، يتم تحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ في العينة المذكورة في نهاية خطوة التلامس بالخطوة (ب). في أحد النماذج المفضلة، في نهاية خطوة

التلامس، يتم عزل المواد الطافية بواسطة الطرد المركزي، ويتم تحديد متوالية النوكليوتيد أو بروتين سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ بواسطة الشخص الماهر في المجال باستخدام الطرق المعروفة. ويمكن أن يكون الطرد المركزي عبارة عن 1200 لفة في الدقيقة عند 4° م. على نحو بديل، يمكن إضافة منظف إلى العينة في نهاية الخطوة ب). ويمكن استخدام عدة منظفات مثل Triton بتركيز 0.1 %. وتعد إضافة منظف جاذب للتفاعل حيث أنه من المتوقع ألا تكون خطوة الطرد المركزي ضرورية. ويمكن تحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب في العينة المتضمنة منظف مذكور، يُطلق عليه اسم حُلالة خلية.

في أكثر طريقة تشخيص مفضلة، يتم تشخيص حمى Q عندما يكون التعبير الوراثي لسيتوكسين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ قابل للكشف أو تم كشفه واختياريًا عندما تؤدي المقارنة إلى اكتشاف تعبير وراثي قابل للكشف لسيتوكسين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ و/ أو زيادة مستوى تعبيره الوراثي. في خاضعين عينة المقارنة، وفي العينات المقارنة كما هم موضحين أعلاه مسبقًا، لا يكون IFN-γ (وأي سيتوكين مساعد للالتهاب آخر) قابل للكشف بشكل عام.

ومن الأفضل يتم تحديد كشف التعبير الوراثي للسيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ أو زيادة مستوى تعبيرها الوراثي و/ أو زيادة أو كشف مستوى التعبير الوراثي لمتوالية نوكليوتيد تشفر سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ (أو مستوى حالة الثبات لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ) بكونه مستوى تعبير وراثي قابل للكشف أو تغيير قابل للكشف لمستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ و/ أو متوالية نيوكليوتيد تشفر سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ (أو مستوى حالة الثبات للسيتوكين المساعد للالتهاب المشفر مثل IFN-γ أو أي نشاط له قابل للكشف أو تغير قابل للكشف في نشاطه الحيوي) باستخدام طريقة محددة مسبقًا بالمقارنة لمستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ و/ أو لمتوالية نيوكليوتيد مناظرة (أو مستوى حالة الثبات للسيتوكين المساعد للالتهاب المشفر المناظر

مثل IFN-γ) في خاضع عينة المقارنة أو في عينة مقارنة. طبقًا لنموذج مفضل، يتم تحديد كشف أو زيادة نشاط السيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ باستخدام اختبار mRNA محدد لجين تشفير السيتوكين المساعد للالتهاب المذكور مثل IFN-γ كما هو محدد مسبقًا هنا في هذا الطلب. ومن الأفضل، أن تعني زيادة مستوى التعبير الوراثي لمتوالية نوكليوتيد تشفر السيتوكين المساعد للالتهاب المذكور مثل IFN-γ زيادة بنسبة 5 % على الأقل في مستوى التعبير الوراثي لمتوالية النوكليوتيد المذكورة باستخدام PCR. تم تحديد البوادئ المفضلة المستخدمة لـ PCR كبادئ موجه 5'-CTCTTGGCTGTTACTGCCAGG-3' (متوالية بهوية رقم: 3)؛ وبادئ عكسي 5'-CTCCACACTCTTTTGGATGCT-3' (متوالية بهوية رقم: 4). والأكثر تفضيلاً، تعني زيادة مستوى التعبير الوراثي لمتوالية النوكليوتيد زيادة بنسبة 10 % على الأقل، والأكثر تفضيلاً 20 % على الأقل، أو 30 % على الأقل، أو 40 % على الأقل، أو 50 % على الأقل، أو 70 % على الأقل، أو 90 % على الأقل، أو 150 % على الأقل، أو أكثر.

ومن الأفضل أن تعني زيادة مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ زيادة بنسبة 5 % على الأقل من مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ باستخدام western blotting و/ أو اختبار ELISA أو اختبار مناسب. والأكثر تفضيلاً أن تعني زيادة مستوى التعبير الوراثي للبولي بيبتيد زيادة بنسبة 10 % على الأقل، والأكثر تفضيلاً 20 % على الأقل، أو 30 % على الأقل، أو 40 % على الأقل، أو 50 % على الأقل، أو 70 % على الأقل، أو 90 % على الأقل، أو 150 % على الأقل، أو أكثر.

ومن الأفضل أن تعني زيادة نشاط السيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ زيادة بنسبة 5 % على الأقل من نشاط البولي بيبتيد باستخدام اختبار مناسب. والأكثر تفضيلاً أن تعني زيادة نشاط البولي بيبتيد زيادة بنسبة 10 % على الأقل، والأكثر تفضيلاً 20 % على الأقل، أو

30 % على الأقل، أو 40 % على الأقل، أو 50 % على الأقل، أو 70 % على الأقل، أو 90 % على الأقل، أو 150 % على الأقل، أو أكثر.

في أكثر طريقة تشخيص مفضلة، يتم تشخيص حمى Q عندما يؤدي الكشف أو المقارنة إلى اكتشاف مستوى قابل للكشف أو زيادة في مستوى التعبير الوراثي لسيتوكسين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ أو زيادة أو كشف مستوى التعبير الوراثي لمتوالية نوكليوتيد تشفر سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ، الكشف المذكور أو الزيادة المذكورة يتم كشفها عند مستوى متوالية الحمض الأميني لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ، والأكثر تفضيلاً زيادة بنسبة 5 % على الأقل في مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ باستخدام ELISA كما هو محدد هنا في هذا الطلب.

تعد طريق الاختراع جذابة لأنه يتم التشخيص بمزيد من التأكد. علاوة على ذلك، هذه الطريقة غير مصحوبة بأي ضرر، وبسيطة، ويمكن إعادتها، وحساسة، ومحددة، ومكافئة من حيث الوقت والتكلفة.

وسيلة الاختبار

في جانب ثاني، يتم توفير وسيلة الاختبار لتشخيص حمى Q في خاضع، حيث تشتمل الوسيلة المذكورة على جزئ يرتبط على وجه التحديد بسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ. ويمكن استخدام هذه الوسيلة في طريقة التشخيص الخاصة بالاختراع. يمكن أن يستخدم أي خاضع أو طبيب هذه الوسيلة في المكتب/ المنزل، ويكرر استخدام هذه الوسيلة حسب الضرورة.

تم وصف نوع الجزيئات المعروف بارتباطه على وجه التحديد بسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ مسبقًا هنا في هذا الطلب. في أحد النماذج المفضلة، يكون الجزئ المعروف بارتباطه على وجه التحديد بسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ والموجود في الوسيلة عبارة عن جسم

مضاد.

في أحد النماذج المفضلة، تكون وسيلة الاختبار عبارة عن شريط اختبار تدفق جانبي معروف أيضًا مقياس العمق، ومن الأفضل، ولكن ليس بالضرورة، يتم تغليفها في مبيت، مصمم للقراءة بواسطة الخاضع، ويكون الاختبار عبارة عن اختبار مناعي شطيري. يتم تزويد هذه الوسائل بكواشف تبين على وجه التحديد وجود جزئ محدد، الممثل هنا سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ من خلال تغيير اللون عقب التلامس مع عينة. تم تعريف عينات الخاضع المفضلة هنا في هذا الطلب. ومن الأفضل أن يتم تمييز الجسم المضاد بإقرانه بعلامة قابلة للكشف ماديًا، وبعد تلامس عينة تحتوي على سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ تكون معقد. يتم بعد ذلك تلامس معقد الجسم المضاد- سيتوكين مساعد للالتهاب المذكور، مثل معقد الجسم المضاد- IFN-γ مع جسم مضاد ثاني، يتعرف على الجسم المضاد الأول المذكور ويتم تثبيته على دعامة صلبة داخل الوسيلة. يلتقط جسم مضاد ثاني معقد الجسم المضاد- سيتوكين مساعد للالتهاب المذكور أو معقد الجسم المضاد- IFN-γ لتكوين معقد شطيري جسم مضاد- سيتوكين مساعد للالتهاب- جسم مضاد، ويكون المعقد الناتج المثبت على الدعامة الصلبة قابلاً للكشف بفضل العلامة. ثم يمكن إدخال شريط اختبار إلى القارئ، حيث يتم قياس إشارة من العلامة المذكورة في المعقد. على نحو بديل، يمكن إدخال شريط اختبار إلى القارئ قبل إضافة العينة. على نحو بديل، ووفقًا لأحد النماذج المفضلة، يتم تصور وجود سيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ بواسطة خاضع في صورة تغيير في اللون لجزء على الأقل من الوسيلة. دائماً ما يتم صنع مقاييس العمق من الورق أو الورق المقوى. وعادة ما تكون الجزيئات الإضافية موجودة في وسيلة كعينة مقارنة إيجابية أو سلبية. يمكن أن تكون عينة المقارنة الإيجابية النمطية عبارة عن جسم مضاد يتعرف على جزئ معروف وجوده في العينة المراد اختباره. و يمكن أن تكون عينة المقارنة السلبية النمطية عبارة عن جسم مضاد يتعرف على جزئ معروف وجوده في العينة المراد

اختياره.

<u>هوية المتوالية</u>

يتم تعريف "هوية المتوالية" هنا في هذا الطلب في صورة علاقة بين اثنين أو أكثر من متواليات الحمض الأميني (بولي بيبتيد أو بروتين) أو اثنين أو أكثر من متواليات الحمض النووي (بولي نوكليوتيد)، كما هو محدد من خلال مقارنة المتواليات. ومن الأفضل أن يتم تحديد الهوية بين اثنين من متواليات الحمض الأميني أو متواليات الحمض النووي بواسطة تقييم هويتهم خلال هوية متوالية برقم كاملة كما هو محدد هنا في هذا الطلب أو جزء منها. يمكن أن يعني جزء منه 50 % على الأقل من طول هوية المتوالية برقم، أو 60 % على الأقل، أو 70 % على الأقل، أو 80 % على الأقل، أو 90 % على الأقل.

في هذا المجال، يعني أيضًا مصطلح "هوية" درجة صلة المتوالية بين متواليات الحمض الأميني أو متواليات الحمض النووي. يتم تحديد "التشابه" بين اثنين من متواليات الحمض الأميني من خلال مقارنة متوالية الحمض الأميني وبدائل الحمض الأميني المحافظة الخاصة ببولي بيبتيد واحد إلى المتوالية الخاصة ببولي بيبتيد ثاني. ويمكن حساب "الهوية" و"التشابه" على نحو بسهولة بالطرق المعروفة، بما في ذلك على سبيل المثال لا الحصر تلك الموصوفة في (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo,

.(H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)

يتم تصميم الطرق المفضلة لتحديد الهوية لتوفير التواصل الأكبر بين المتواليات المختبرة. يتم تقنين طرق تحديد الهوية والتشابه في برامج الكمبيوتر المتوفر بشكل عام. تشتمل طرق برامج الكمبيوتر المفضلة لتحديد الهوية والتشابه بين متواليتين على سبيل المثال، على مجموعة برامج GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984))، وBestFit، وBLASTP، وBLASTN، وFASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). وتكون برامج BLAST X متوفرة بشكل عام من NCBI ومصادر أخرى (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). كما يمكن أيضًا استخدام لوغاريتم Smith Waterman المعروف جيدًا لتحديد الهوية.

تشتمل المتغيرات المفضلة لمقارنة متوالية البولي بيبتيد على التالي: خوارزم: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)؛ مصفوفة المقارنة: BLOSSUM62 from Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992); Gap Penalty: 12; and Gap Length Penalty: 4. ويكون البرنامج المفيد مع هذه المتغيرات متوفرًا بشكل عام كبرنامج "Ogap" من شركة Genetics Computer Group، ومقرها في Madison, WI. تعتبر المتغيرات المذكورة مسبقًا هي المتغيرات الافتراضية لمقارنات الحمض الأميني (إلى جانب عدم وجود penalty لـ gaps الطرفية).

تشتمل المتغيرات المفضلة لمقارنة الحمض النووي على التالي: خوارزم: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)؛ مصفوفة المقارنة: matches=+10, mismatch=0; Gap Penalty: 50; Gap Length Penalty: 3. ويكون متوفر في صورة برنامج Gap من شركة

Genetics Computer Group، ومقرها في Madison, WI. تعتبر المتغيرات الواردة أعلاه هي المتغيرات الافتراضية لمقارنات الحمض النووي.

اختياريًا، في تحديد درجة تشابه الحمض الأميني، يمكن أيضًا أن يأخذ في الاعتبار الشخص الماهر في المجال بدائل الحمض الأميني "المحافظة"، كما ستكون واضحة للشخص الماهر في المجال. تشير بدائل الحمض الأميني المحافظة إلى قابلية تبادل المواد المتبقية المتضمنة سلاسل جانبية مشابهة. على سبيل المثال، تكون مجموعة الأحماض الأمينية المتضمنة سلاسل جانبية أليفاتية عبارة عن جليكاين، وألانين، وفالين، وليوسين، وأيزو ليوسين؛ وتكون مجموعة الأحماض الأمينية المتضمنة سلاسل جانبية أليفاتية- هيدروكسيل عبارة عن سيرين وثريونين؛ وتكون مجموعة الأحماض الأمينية المتضمنة سلاسل جانبية تشمل الأميد عبارة عن أسباراجين وجلوتامين؛ وتكون مجموعة الأحماض الأمينية المتضمنة سلاسل جانبية عطرية عبارة عن فنيل ألانين، وتيروسين، وتريبتوفان؛ وتكون مجموعة الأحماض الأمينية المتضمنة سلاسل جانبية قاعدية عبارة عن ليسين، وأرجنين، وهيستادين؛ وتكون مجموعة الأحماض الأمينية المتضمنة سلاسل جانبية تشمل الكبريت عبارة عن سيستين وميثيونين. وتكون المجموعات البديلة للأحماض الأمينية الحافظة المفضلة عبارة عن: فالين- ليوسين- أيزو ليوسين، وفنيل ألانين- تيروسين، وليسين- أرجنين، وألانين- فالين، وأسباراجين- جلوتامين. تعتبر المتغيرات البديلة لمتوالية الحمض الأميني المكتشف عنها هنا في هذا الطلب عبارة عن تلك التي يتم فيها إزالة مادة متبقية واحدة على الأقل في المتواليات المكتشفة وتدخل مادة متبقية مختلفة في مكانها. ومن الأفضل، أن يكون تغير الحمض الأميني محافظ. وتكون البدائل المحافظة المفضلة لكل من الأحماض الأمينية الحادثة طبيعيًا هي كالتالي: Ala إلى Ser؛ وArg إلى Lys؛ وAsn إلى Gln أو His؛ وAsp إلى Glu؛ وCys إلى Ser أو Ala؛ وGln إلى Asn؛ وGlu إلى Asp؛ وGly إلى Pro؛ وHis إلى Asn أو Gln؛ وIle إلى Leu أو Val؛ وLeu إلى Ile أو Val؛ وLys إلى Arg, Gln أو

Glu؛ وMet إلى Leu أو Ile؛ وPhe إلى Met, Leu أو Tyr؛ وSer إلى Thr؛ وThr إلى Ser؛ وTrp إلى Tyr؛ وTyr إلى Trp أو Phe؛ وVal إلى Ile أو Leu.

الأجسام المضادة

تتعلق بعض جوانب الاختراع باستخدام جسم مضاد أو جزء من الجسم المضاد يرتبط على وجه التحديد بسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ. تم وصف الطرق الخاصة بتوليد أجسام مضادة أو أجزاء جسم مضاد ترتبط على وجه التحديد ببولي بيبتيد في على سبيل المثال Harlow and Lane (1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY) والبراءة الدولية رقم WO 91/19818؛ و WO 91/18989؛ وWO 92/01047؛ وWO 92/06204؛ وWO 92/18619؛ والبراءة الأمريكية رقم US 6.420.113 والمراجع الواردة هنا في هذا الطلب. يشتمل المصطلح "ارتباط نوعي" المستخدم هنا في هذا الطلب، على ارتباط نوعي منخفض الألفة وعالي الألفة. يمكن إظهار الارتباط النوعي، على سبيل المثال، بواسطة جسم مضاد منخفض الألفة أو جزء جسم مضاد له Kd بمقدار 10^{-4} مولار تقريبًا على الأقل. ويمكن أيضًا إظهار الارتباط النوعي بجسم مضاد عالي الألفة أو جزء جسم مضاد، على سبيل المثال، جسم مضاد أو جزء جسم مضاد له Kd بمقدار 10^{-7} مولار تقريبًا على الأقل، أو 10^{-8} مولار تقريبًا على الأقل، أو 10^{-9} مولار تقريبًا على الأقل، أو 10^{-10} مولار تقريبًا على الأقل، أو 10^{-11} أو 10^{-12} مولار تقريبًا على الأقل أو أكبر.

عام

في هذا المستند وعناصر الحماية الخاصة به، يتم استخدام الفعل "يشتمل على" وتصريفاته بمعناه غير المقيد ليعني أن العناصر التالية للكلمة تم تضمينها، ولكن لا يعني أن العناصر غير المذكورة على وجه التحديد تم استبعادها. بالإضافة إلى ذلك، يمكن استبدال الفعل "يتكون من" بـ

"يتكون بشكل أساسي من" مما يعني أن الطريقة أو وسيلة الاختبار كما هو محدد هنا في هذا الطلب يمكن أن تشتمل على خطوة (خطوات) إضافية، ومكون (مكونات) على التوالي بخلاف المذكورين تحديدًا، ولا تغير الخطوة (الخطوات) الإضافية، والمكون (المكونات) على التوالي المذكورة من الخصائص الفريدة للاختراع. بالإضافة إلى ذلك، لا تستثني الإشارة إلى عنصر بأدوات النكرة "a" أو "an" إمكانية وجود أكثر من واحد من العنصر، ما لم يتطلب السياق بوضوح وجود واحد وأنه واحد فقط من العناصر. وبالتالي عادة تعني أدوات النكرة "a" أو "an" أنه "واحد على الأقل".

تم إدراج كافة مراجع البراءة والفن السابق الواردة في الوصف التفصيلي الحالي بموجب هذا في هذا الطلب كمرجع بالكامل. وتم تقديم الأمثلة التالية لأغراض توضيحية فقط، ولا يُقصد منها تقييد نطاق الاختراع الحالي بأي طريقة من الطرق.

الأمثلة

الطريقة

تم أخذ عينات الدم من المرضى والأفراد الأصحاء في أنابيب EDTA vacutainer (Becton and Dickinson, Leiden, The Netherlands). من هذه العينات، تم تخفيف 200 ميكرو لتر بنسبة 1 : 5 في وسط استزراع (RPMI 1640) وتحضينه في أطباق زراعة أنسجة بها 24 عين (Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). تمت إضافة 100 نانو جرام/ مل من Coxiella burnetii الطور 1 غير منشط بالفورمالدهيد Henzerling Strain (CSL limited, Australia) كمحفز إلى هذه المزارع (الشكل رقم 1). تم تحضير خلايا غير منشطة بالفورمالدهيد من خلال نقلها أو تحضينها باستخدام الفورمالدهيد بنسبة تركيز 4 % لمدة ساعة واحدة. وبعد ذلك يتم غسل الخلايا عدة مرات باستخدام PBS. ولا تتم إضافة المحفز للتحكم في المزارع.

ويتم تحضين المزارع عند 37° م و5 % CO_2 لمدة 48 ساعة. ويتم استخدام سلالة Coxiella burnetii 9 ميل تموت بالحرارة أو غير منشطة بالحرارة (CVI, Lelystad, The Netherlands) في الدراسة الثانية (الشكل رقم 2). ويكون البروتوكول مطابق، باستثناء أن التحضين يكون لمدة 24 ساعة. ويتم تحضير خلايا غير منشطة بالحرارة من خلال تسخينه عند 99° م لمدة 30 دقيقة.

بعد فترة التحضين هذه، يتم تجميع المواد الطافية وطردها مركزيًا عند 15000 جم لمدة 5 دقائق، وبعد ذلك يتم تخزينها -20° م حتى قياس الإنترفيرون γ (IFNγ). تم قياس IFNγ باستخدام ELISA معين (Pelikine Sanquin, Amsterdam, The Netherlands).

<u>النتائج</u>

في المزارع غير المحفظة، لم يتم العثور على IFNγ قابلة للكشف، كما كانت الحالة في عينات المقارنة غير المصابة بالعدوى التي تعرضت لمولدات الضد Coxiella في المختبر.

أوضح المرضى المصابين بحمى Q المزمنة (التهاب الشغاف, التهاب الأوعية الدموية)، الجاري معالجتهم حاليًا بأجسام مضادة وجود تركيزات عالية من IFNγ (الشكل رقم 1). وقد أوضح المرضى المتعافين من حمى Q حادة غير معقدة استجابة متوسطة (الشكل رقم 1). في دراسة ثانية تم فحص مجموعة كبيرة من الأفراد (ع = 1527) قبل التلقيح. وعاش هؤلاء الأفراد في منطقة معرضة بشكل عالي الخطورة لـ Coxiella burnetii. بعد إجراء الفحص، تم ارتباط مستويات IFN-γ باختبار جلدي إيجابي من الأمصال لـ Coxiella burnetii. وقد تعرض الأفراد (ع = 346) لـ Coxiella burnetii قبل ظهور إنتاج عالي من IFN-γ (الشكل رقم 2). وهذا على خلاف ما حدث للأفراد الذي لم يتم إجراء اختبار الجلد الإيجابي أو اختبار الأمصال لهم (الشكل رقم 2).

الوصف المختصر للرسومات

الشكل رقم 1: تم تخفيف عينة دم كاملة من المرضى والعينات المقارنة بنسبة 1 : 5 في RPMI وتعريضها لمولدات الضد Coxiella burnetii لمدة 48 ساعة. تم قياس الإنترفيرون جاما الفعال مناعيًا (IFNγ) في الجزء الطافي. وتظهر عينات المقارنة الإنتاج الأساسي عندما أوضح المرضى المصابين بحمى Q المزمنة استجابة عالية وأوضح المرضى المتعافين من حمى Q حادة غير معقدة استجابة متوسطة.

الشكل رقم 2: تم تخفيف عينة دم كاملة من الأفراد (ع = 1527) بنسبة 1 : 5 في RPMI وتعريضها لـ Coxiella burnetii تموت بالحرارة لمدة 24 ساعة. وتم قياس الإنترفيرون جاما الفعال مناعيًا (IFNγ) في الجزء الطافي. فتظهر عينات المقارنة (1181) الإنتاج الأساسي عندما أوضح الأفراد (ع = 346) المعرضين مسبقًا لـ Coxiella burnetii استجابة عالية.

SEQUENCE LISTING

<110> Stichting Katholieke Universiteit Radboud Nijmegen Medical Centre
Stichting Katholieke Universiteit

<120> A novel method for diagnosing Q-fever using a cellular immunological test

<130> P6031158PCT

<150> US 61/374,313
<151> 17-08-2010

<150> EP 10173056.2
<151> 17-08-2010

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 501
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 1
atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctcttggc 60

tgttactgcc aggacccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca 120

ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa 180

gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct cctttttactt caaacttttt 240

aaaaacttta aagatgacca gagcatccaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg 300

aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat 360

tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg 420

gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga 480

ggtcgaagag catcccagta a 501

2 <210>

166 <211>

PRT <212>

homo sapiens <213>

2 <400>

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
15 10 5 1

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
30 25 20

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
45 40 35

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
60 55 50

Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
80 75 70 65

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
95 90 85

Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
110 105 100

Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
125 120 115

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
140 135 130

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
160 155 150 145

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
165

3 <210>

21 <211>

DNA <212>

artificial <213>

<220>

<223> primer

<400> 3

ctcttggctg ttactgccag g 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> primer

<400> 4

ctccacactc ttttggatgc t 21

عناصر الحماية

1- طريقة لتشخيص حمى Q في خاضع، وتتضمن الطريقة الخطوات التالية:

(أ) الحصول على عينة من الخاضع المذكور،

(ب) تلامس العينة المذكورة مع مصدر لمولد الضد Coxiella burnetii

(ج) وتحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ في العينة المذكورة في نهاية الخطوة (ب).

2- طريقة وفقًا لعنصر الحماية رقم 1, حيث يتم تشخيص الحمى Q عندما تؤدي الخطوة (ج) إلى اكتشاف مستوى التعبير القابل للكشف أو زيادة في مستوى التعبير الوراثي للسيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ.

3- طريقة وفقًا لعنصر الحماية رقم 1 أو 2, حيث يتم تحديد مستوى التعبير الوراثي لسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ عن طريق تحديد كمية السيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ مباشرة و/ أو بشكل غير مباشر عن طريق تحديد كمية متوالية النوكليوتيد التي تشفر السيتوكين المساعد للالتهاب مثل IFN-γ.

4- طريقة وفقًا لعنصر الحماية بدءًا من رقم 1 إلى رقم 3, حيث أن المصدر المذكور لمولد الضد Coxiella burnetii عبارة عن خلية Coxiella burnetii كاملة غير منشطة بالحرارة أو مثبتة بالفورمالين.

5- طريقة وفقًا لعنصر الحماية بدءًا من رقم 1 إلى رقم 4, حيث تم تشخيص إصابة بحمى Q حادة أو إصابة بحمى Q مزمنة أو تعب ما بعد حمى Q.

6- طريقة وفقًا لعنصر الحماية بدءًا من رقم 1 إلى رقم 5, حيث لم يتم تحصين الخاضع المذكور لقاح مضاد لحمى Q.

7- طريقة وفقًا لعنصر الحماية بدءًا من رقم 1 إلى رقم 6, حيث تكون العينة عبارة

عن مائع تم الحصول عليه من الخاضع.

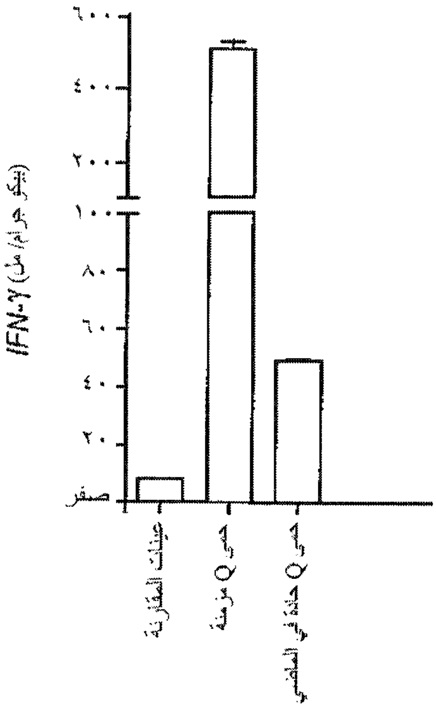
8- طريقة وفقًا لعنصر الحماية رقم 7, حيث يتم اختيار المائع من الدم أو مائع الحبل الشوكي.

9- وسيلة اختبار لتشخيص حمى Q في خاضع، حيث تشتمل الوسيلة على جزئ يرتبط على وجه التحديد بسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ.

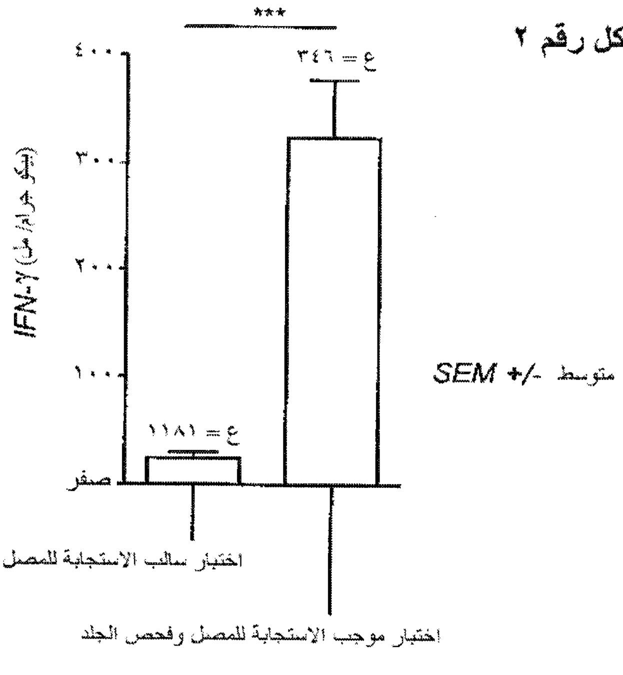
10- وسيلة وفقًا لعنصر الحماية رقم 9, حيث يكون الجزئ الذي يرتبط على وجه التحديد بسيتوكين مساعد للالتهاب مثل IFN-γ عبارة عن جسم مضاد.

11- وسيلة وفقًا لعنصر الحماية رقم 9 أو 10, حيث تكون الوسيلة عبارة عن شريط اختبار التدفق الجانبي.

الشكل رقم ١



الشكل رقم ٢



اسم الطالب			
رقم الطلب/التاريخ/الساعة			
توقيع الوكيل / الطالب			
عدد اللوحات	1	رقم اللوحة	1
أصل			