

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Januar 2017 (19.01.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/009347 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68 (2006.01)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/066561
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Juli 2016 (12.07.2016)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: 10 2015 111 267.1 13. Juli 2015 (13.07.2015) DE; 10 2015 113 038.6 7. August 2015 (07.08.2015) DE
(72) Erfinder; und
(71) Anmelder : KANN, Simone [DE/DE]; Steinwiese 26, 53721 Siegburg (DE).
(72) Erfinder: HANSEN, Jessica; Feldschmiede 14 F, 22159 Hamburg (DE). SIEVERTSEN, Juergen; Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359 Hamburg (DE).
(74) Anwalt: SCHWABE SANDMAIR MARX; Joseph-Wild-Str. 20, 81829 Munich (DE).
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

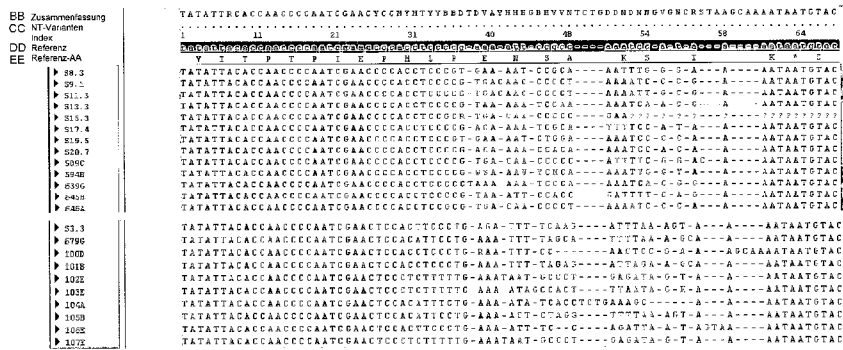
Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDES AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung : OLIGONUCLEOTIDE UND DEREN VERWENDUNG

AA Abgleich der Erreger-Sequenzen



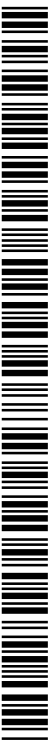
Figur 1

AA Comparison of the pathogen sequences
BB Summary
CC NT Variants
DD Reference
EE Reference-AA

(57) Abstract: The invention concerns oligonucleotides which comprise or consist of the nucleotide sequence SEQ ID NO 4, or oligonucleotides with nucleotide sequences homologous thereto, or oligonucleotides with a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO 4, or oligonucleotides with nucleotide sequences homologous to the complementary nucleotide sequence; or oligonucleotides with a nucleotide sequence opposite to the nucleotide sequence of SEQ ID NO 4 in terms of the 5' - 3' reading direction, or oligonucleotides with nucleotide sequences homologous to the opposite nucleotide sequence: cgaacccc*acctcc 15 SEQ ID NO 4, where * stands for an insert "c". The invention also concerns the use of the oligonucleotides for real-time PCR.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Oligonucleotide,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2017/009347 A1



die umfassen die, oder die bestehen aus der, Nucleotid-Sequenz SEQ IDNO 4, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 4 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' □ 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 4 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen: cgaacccc*acctcc 15 SEQ ID NO 4, worin * für ein Insert "c" steht. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Oligonucleotide für eine Real-Time-PCR.

Oligonucleotide und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Oligonucleotide und betrifft die Verwendung der Oligonucleotide für die medizinische Diagnose. Insbesondere betrifft die Erfindung Oligonucleotide, die für eine Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in der Diagnose der Chagas-Krankheit Verwendung finden können.

Die Chagas-Erkrankung gehört zu den parasitären Infektionen und wird durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) verursacht. Übertragen wird der Erreger hauptsächlich durch verschiedene blutsaugende Raubwanzen. Auch sind kongenitale Übertragungen, Übertragung durch Bluttransfusionen und Organtransplantationen, Übertragungen durch kontaminierte Lebensmittel und Übertragungen durch Laborunfälle dokumentiert.

Mehr als 150 Haus- und Wildtiere dienen als Reservoir, aber auch asymptomatisch infizierte Menschen tragen zur Verbreitung bei. 100 Millionen Menschen leben mit dem Risiko sich zu infizieren, rund 18 Millionen sind bereits infiziert. Damit steht Chagas an 6. Stelle der „Global Burden Diseases“ und stellt ein großes Problem für Süd- und Mittelamerika dar. Durch vermehrte Migration infizierter Menschen in die USA und nach Spanien und Portugal mehren sich auch dort die Fälle der Chagas-Erkrankung.

Verschiedene Raubwanzen-Arten (Familie *Reduviidae*, Unterfamilie *Triatomae*) dienen als Vektoren. Sie nehmen die Erreger beim Blutsaugen auf. Die Erreger vermehren sich im Insekt und werden dann, wenn die Raubwanze Blut von einem neuen Wirt, beispielsweise von einem Menschen, saugt, mit dem Kot der Raubwanze während des Saugaktes ausgeschieden.

Der Wanzenstich ist zumeist schmerzlos, hinterläßt jedoch eine Hautläsion und einen Juckreiz. Bekämpft die/der Gestochene den Juckreiz (oft unwillkürlich) durch Reiben, werden die Erreger mit dem Wanzenkot in die Wunde eingerieben.

Auch ist eine Infektion über die Schleimhäute der Augen (Konjunktiva), der Nase oder des Mundes möglich. Im Gewebe dringen die Erreger in die Wirtszelle ein und vermehren sich durch Zweiteilung, wobei sie sog. Pseudozysten bilden. Schließlich platzt die Pseudozyste auf und setzt die Parasiten frei, welche dann durch die Blutbahn zu neuen Wirtszellen transportiert werden und so weitere Vermehrungszyklen initiieren. Bei der nächsten Blutmahlzeit infizieren sich andere Raubwanzen, wozu selbst niedrige Parasitämien ausreichen. Raubwanzen sind nachtaktive Tiere. Sie können bis zu 2 Jahre alt werden und vermehren sich durch Eiablage. Ihr Radius beträgt mehrere Hundert Meter. Alle Stadien (Adulte und Larven) und beide Geschlechter saugen Blut. Einmal infiziert, bleiben sie lebenslang infektiös.

Beim Menschen verläuft die Chagas-Erkrankung in verschiedenen Stadien. In der akuten Phase kann es zu einer lokalen Entzündungsreaktion (Chagom) mit benachbarter Lymphknotenschwellung kommen. Ist diese am Auge, findet sich das charakteristische Romaña-Zeichen, eine Konjunktivitis mit Lidödem und präaurikulärer Lymphknotenschwellung. Das Romaña-Zeichen kommt allerdings nur selten vor (<5%). Die unspezifischen Krankheitssymptome gleichen einem grippalen Infekt. Die Symptome klingen im allgemeinen spontan wieder ab, oft innerhalb von 2 bis 4 Wochen. In wenigen Fällen kommt es in diesem Stadium zu Meningoenzephalitis oder Myokarditis mit letalen Ausgang.

Danach folgt eine Latenzphase. Hier findet sich ein positiver serologischer Test und zeitweise auch eine geringe Parasitämie; diese Phase wird auch indeterminate oder chronisch indeterminate Form genannt. Normalerweise ist diese Phase beschwerdefrei, Untersuchungen zeigten hier aber schon in einigen Fällen diskrete Störungen des Nervensystems.

30 bis 40% der Betroffenen gehen dann in ein chronisches Stadium über, das mit schwerwiegende Veränderungen am Herzen (Kardiomyopathie, plötzlicher Herztod, etc.) oder am Gastrointestinaltrakt (Megacolon, Megaösophagus, etc.) einhergeht.

Zwar könnte die Chagas-Erkrankung in der akuten Phase diagnostiziert werden, da die Parasitendichte hoch ist (Ausstrich, Konzentrationsverfahren, Buffy-Coat-

Verfahren, etc.), dies geschieht jedoch meist nicht, sei es, daß der Arzt gar nicht erst konsultiert wird oder die Symptome nicht im Zusammenhang mit Chagas gesehen werden. Daher wird zumeist später serologisch diagnostiziert.

Als Therapeutika stehen derzeit zwei Wirkstoffe zur Verfügung: Benznidazol (Medikamente: Ragonil[®], Radanil[®]) und Nifurtimox (Medikament: Lampit[®]). Wegen des etwas günstigeren Nebenwirkungsprofils ist Benznidazol die erste Wahl. Beide Wirkstoffe sind jedoch toxisch und sollten zu Beginn stationär verabreicht werden. Sie vernichten die Parasiten im Blut und sind daher besonders in der akuten Phase erfolgreich. Die Behandlungen sind langwierig (60-90 Tage für Benznidazol, 90-120 Tage für Nifurtimox). Die Vor- und Nachteile müssen insbesondere bei chronischen Infektionen vom behandelnden Arzt gut abgewägt werden. Während der Schwangerschaft dürfen sie nicht eingesetzt werden.

Um den Kreislauf der Infektionen zu durchbrechen, müssen neben Bekämpfungs- und Präventionsmaßnahmen (Verbesserung der Lebensumstände, Fumigationen, Aufklärung, etc.) auch gute diagnostische Kits und Methoden zur Verfügung stehen, um Chagas frühzeitig zu erkennen, zu behandeln und die Weitergabe durch Reservoir (Mensch und Tier) zu verhindern. Blut- und Organspender sollten auf Chagas gescreent, kongenitale Infektionen und Reaktivierungen bei Immunsuppression aufgedeckt und behandelt werden. Dazu bedarf es neuer Diagnose-Kits und -Methoden, die eine bessere Sensitivität und Spezifität aufweisen als die bereits bekannten Mittel und Verfahren.

Weiter ist es bei allen diagnostischen Ansätzen wichtig, *T. cruzi* von anderen, verwandten und z.T. apathogenen Trypanosomen (wie z.B. *T. rangeli*) zu unterscheiden: Eine einer „Positiv“-Diagnose folgende Behandlung mit den o. g. Wirkstoffen ist aufgrund der Toxizität nicht vertretbar, wenn die Positiv-Diagnose fälschlicherweise auf die Erkennung eines apathogenen Erregers zurückgeht.

Bisher fehlt ein Goldstandard zur Diagnosestellung der Chagas-Krankheit. Im chronischen Stadium werden meist serologische Verfahren angewandt. Wegen der geringen Erreger-Mengen, wie sie bei chronischer oder chronisch indeterminanter Form

der Chagas-Krankheit häufig sind, wurde im Stand der Technik bereits die PCR zur Diagnose der Chagas-Krankheit neben anderen Diagnose-Methoden beschrieben.

In einer großen Multicenter-Studie (A G Schijman et al., (2011), International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients, PLoS Negl Trop Dis 5 (1): e931) wurden 48 PCR's gegeneinander getestet. Dabei kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass 4 PCR's als die besten deklariert wurden. Eine davon war die konventionelle Gel-PCR(LbQ IDNA). Die drei anderen waren die Sat-DNA-PCR's LbD2-Sat-DNA-PCR, LbD3- Sat-DNA-PCR und LbF1- Sat-DNA-PCR. Die letztgenannte (LbF1- Sat-DNA-PCR) wird nachfolgend bezeichnet als „TCZ-PCR“.

Der von Schijmann et al. berichtete Ansatz wurde aufgenommen von „Y Qvarnström et al., (2012), Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens using a multi-Target Real-Time PCR Approach, PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1689): Sie verglichen ein bereits bekannt positives Chagas-Kollektiv mit den Ergebnissen der Mini-Satelliten-TCZ-PCR, der führenden Kinetoplasten-PCR (kDNA-PCR) und einer 18s-rRNA-PCR, die als besonders spezifisch gilt. Aus den Daten können folgende Sensivitäten bzw. Spezifitäten berechnet werden:

78 % bzw. 40 % für kDNA-PCR;

63 % bzw. 100 % für TCZ-PCR;

6 % bzw. 100 % für 18s-rRNA-PCR.

Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass nur bei denjenigen Patienten, für die in allen drei PCR's positive Testergebnisse vorlagen, eine sichere Chagas-Diagnose gestellt werden könnte. Jede Probe, die nur in kDNA-PCR und/oder TCZ-PCR ein positives Ergebnis lieferte, bedürfe einer weiteren Abklärung. Diese bleibt vor Ort jedoch meist Theorie: Zusätzliche Diagnoseschritte werden meist aus Kostengründen und/oder infolge des Fehlens von geeignetem Equipment nicht mehr durchgeführt. Damit bleibt die Diagnose in der Praxis oft unklar, und eine Therapie wird deswegen nicht durchgeführt.

Nichtsdestoweniger ergibt sich aus den Untersuchungen, die in den vorgenannten Druckschriften berichtet wurden, dass Real-Time-PCR's (RT-PCR) ein hoher Stellenwert zugemessen wird.

Weiter sind nach wie vor die angewendeten Verfahren zur Feststellung akuter Infektionen oder kongenitaler Erkrankungen, zur Erfolgskontrolle nach einer Therapie, bei Reaktivierung unter Immunsuppression oder zur Detektion von Erreger-Reservoirs und Maßnahmenkontrollen sowie zum Screening vor Organtransplantationen unzureichend.

Im Rahmen der Erfindung wurde ein Proben-Kollektiv untersucht, das sich durch eine größere Anzahl von Probanden (1009 vs. 119 – Qvarnström, a. a. O.), das Vorhandensein aller Altersgruppen, das Vorhandensein von Gesunden sowie verschiedener Stadien der Chagas-Krankheit (akut, chronisch, chronisch-indeterminant, negativ) von dem Kollektiv von Qvarnström unterscheidet.

Im Rahmen der eigenen Experimente wurde insbesondere nachgewiesen, dass die kDNA-PCR zu zahlreichen falschen positiven Ergebnissen führt. Diese beruhen überwiegend auf Kreuzreaktionen mit *Trypanosoma rangeli*. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die derzeit leistungsfähigsten PCR's (RT-PCR's) hilfreich sind, aber nur unterstützend bei der Diagnosestellung eingesetzt werden können.

Der Grund könnte – ohne auf diese Deutung festgelegt werden zu wollen – darin liegen, dass die bisherigen (RT-) PCR's auf Strukturen der Zelle zielen, die entweder hochkonserviert sind (18s-rRNA-PCR) und damit sehr spezifisch sind, oder die in vielen Kopien in verschiedenen Parasiten-Genomen (z. B. auch Leishmanien) vorkommen (Kinetoplasten-kDNA-PCR) und damit fälschlicherweise eine hohe Sensitivität zeigen.

Ein weiteres Problem sind die geringen Erreger-Mengen, wie sie bei chronischer oder chronisch-indeterminanter Form der Chagas-Krankheit häufig sind. Schwierigkeiten bereitet auch die große genetische Variabilität der Erreger. Auch diese Faktoren erklären die Schwierigkeiten für die Sensitivitäten und Spezifitäten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden Proben aus einem Hochendemie-Gebiet in Kolumbien mittels Schnelltest oder ELISA, Immunfluoreszenz sowie mit den real-time-PCR's (RT-PCR's) kDNA-PCR, TCZ-PCR und 18s rRNA-PCR untersucht, die – wie oben berichtet: Schijman et al., Qvarnström et al. – derzeit zu den leistungsfähigsten PCR's gehören.

Zur weiteren Evaluation wurden ca. 87 kDNA-PCR-Amplifikationsprodukte kloniert und sequenziert.

Ausgehend von den Sequenzierungs-Ergebnissen erfolgte über BLAST im NCBI eine Zuordnung der Isolate zu den Erregern.

Die Klone für *Trypanosoma cruzi* wurden gegeneinander und gegen die Klone von *Trypanosoma rangeli* sowie gegen in der Datenbank hinterlegte Sequenzen abgeglichen.

Dabei konnte eine Region gefunden werden, in der sich die Sequenzen aller untersuchten *Trypanosoma cruzi* deutlich von den Sequenzen von *Trypanosoma rangeli* unterscheiden.

Der Abgleich der Erreger-Sequenzen ist in Figur 1 gezeigt.

Die Erfindung betrifft daher Oligonucleotide (i) mit der Sequenz SEQ ID NO 3 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder (ii) Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 3 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder (iii) Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 3 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

worin w für a oder t steht,
y für c oder t steht; und
* für ein Insert „c“ steht.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Teils der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 7 beansprucht und nachfolgend beispielhaft beschrieben.

Die Erfindung betrifft weiter Oligonucleotide der Sequenzen SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 und/oder SEQ ID NO 16 gemäß der nachfolgenden detaillierten Beschreibung zur Verwendung bei der Amplifikation von Krankheitserreger-Nucleotid-Sequenzen, vorzugsweise zur ausschließlichen Amplifikation von *Trypanosoma cruzi*-DNA-Sequenzen, in einer Mischung von DNA unterschiedlicher Provenienz, besonders bevorzugt durch PCR, am meisten bevorzugt durch Real-Time-PCR.

Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung der Oligonucleotide der Sequenzen SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 und/oder SEQ ID NO 16 gemäß der nachfolgenden detaillierten Beschreibung zur Bestimmung der Präsenz oder Abwesenheit von DNA von *Trypanosoma cruzi* im Körper eines Tieres oder Menschen, vorzugsweise im Körper eines Insekts, eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, weiter bevorzugt in einer Probe eines Körpergewebes oder einer Körperflüssigkeit eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, am meisten bevorzugt in einer Gewebeprobe oder einer Blutprobe oder einer Plasmaprobe oder einer Serumprobe eines Menschen.

Die Erfindung betrifft weiter auch die Verwendung der Oligonucleotide der Sequenzen SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 und/oder SEQ ID NO 16 gemäß der nachfolgenden

den detaillierten Beschreibung zur Diagnose der Chagas-Krankheit im Körper eines Tieres oder Menschen, vorzugsweise im Körper eines Insekts, eines Geflügels, einer Säugers oder eines Menschen, weiter bevorzugt in einer Probe eines Körpergewebes oder einer Körperflüssigkeit eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, am meisten bevorzugt in einer Gewebeprobe oder einer Blutprobe oder einer Plasmaprobe oder einer Serumprobe eines Menschen.

Schließlich betrifft die Erfindung auch gemäß Anspruch 11 (i) Oligonucleotide der Sequenz SEQ ID NO 1 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder (ii) Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 1 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder (iii) Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 1 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

ccccwccwcc vnd 13 SEQ ID NO 1,

worin w für a oder t steht;
 v für a oder c oder g steht,
 d für a oder g oder t steht; und
 n für a oder c oder g oder t steht.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Teils der Erfindung in Form von Oligonucleotiden der SEQ ID NO 2

ccccacctcc ccg 13 SEQ ID NO 2

sind in dem abhängigen Anspruch 12 beansprucht und nachfolgend beispielhaft beschrieben.

Im Rahmen der Erfindung wurden also eine für die unterscheidende Region in der DNA von *Trypanosoma cruzi* spezifische Nucleotid-Sequenz einer Sonde, die für ei-

ne Verwendung in der Real-Time-PCR geeignet ist, sowie damit kombinierbare Forward-Primer und Reverse-Primer kreiert.

Einzelheiten des durchgeführten Ansatzes ergeben sich aus den experimentellen Daten und werden dort erläutert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden beansprucht, und werden im Rahmen bevorzugter Ausführungsformen in der Beschreibung beschrieben, Oligonucleotide, die gekennzeichnet sind durch im Einzelnen angegebene SEQ ID Nos 1 bis 16 gemäß der zur Beschreibung gehörenden Sequenzliste.

Unter „Oligonucleotiden“ werden im Rahmen der Patentansprüche und der vorliegenden Beschreibung lineare Sequenzen aus bis zu 40 kovalent über Phosphorsäurediester-Brücken vom 3'-C-Atom eines Nucleotids zum 5'-C-Atom des folgenden Nucleotids miteinander gebundenen Nucleotiden verstanden. Diese werden üblicherweise (so auch in den vorliegenden Ansprüchen und in der Beschreibung) mit den kleinen Buchstaben a (für Adenin), c für Cytosin, g für Guanin und t für Thymin abgekürzt. Lineare Sequenzen werden durch die kovalente Aneinanderreihung der einzelnen Nucleotide repräsentiert. Dabei wird die angegebene Nucleotid-Sequenz immer in der Richtung 5' → 3' gelesen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die erfindungsgemäßen Oligonucleotide immer verstanden

- (i) als Oligonucleotide mit der angegebenen Sequenz SEQ ID NO oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder
- (ii) als Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der angegebenen SEQ ID NO komplementären Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder

- (iii) als Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der angegebenen SEQ ID NO gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen.

Für die Fälle von Nucleotid-Sequenzen, die zu einer angegebenen Nucleotid-Sequenz homolog sind, werden – ebenfalls wie üblich – konkrete Buchstaben für einzelne Homolog-Nucleotide verwendet, die sich im Einzelnen aus den Patentansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung konkret ergeben. In Einzelfällen auftretende Inserts sind mit besonders definierten Zeichen (*, **, §, #) gekennzeichnet.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die in der Sequenzliste ebenfalls wiedergegebenen Nucleotid-Sequenzen bevorzugter Ausführungsformen beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen beschränkt. Diese ermöglichen in erster Linie ein besseres Verständnis der Erfindung und sollen der beispielhaften Veranschaulichung der Erfindung dienen.

Erfindungsgemäße Oligonucleotide haben in einer Ausführungsform der Erfindung die unter SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotid-Sequenz:

cgaacccc*w ccwyc 15 SEQ ID NO 3,

worin w für a oder t steht,
 y für c oder t steht; und
 * für ein Insert „c“ steht.

Diese Ausführungsform der Erfindung umfasst Oligonucleotide mit der angegebenen Sequenz SEQ ID NO 3 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der angegebenen SEQ ID NO 3 komplementären Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der an-

worin * für ein Insert "c" steht.

Noch mehr bevorzugt ist eine Ausführungsform der Erfindung mit Oligonucleotiden, die umfassen die, oder sogar bestehen aus der, (den Sequenzen mit der SEQ ID NO 3 und der SEQ ID NO 14 und der SQ ID NO 4 ähnlichen) Nucleotid-Sequenz SEQ IC NO 10, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 10 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 10 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

cgaacccccac ctcc

14

SEQ ID NO 10

In alternativen Ausführungsformen betrifft die Erfindung Oligonucleotide, die – wie nachfolgend ersichtlich – Nucleotid-Sequenzen der vorstehenden SEQ ID Nos 3 oder 4 oder 10 oder 14 beinhalten, jedoch an ihrem 5'-Ende und/oder 3'-Ende weitere Nucleotid-Sequenzen gebunden aufweisen, oder betreffen Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotids-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen.

Diese Oligonucleotide umfassen die Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 5:

caacccaat cgaacccc*w ccwyc vnd**d §nm#hwhy 38 SEQ ID NO 5,

worin w für a oder t steht;

m für a oder c steht;

y für c oder t steht;
 v für a oder c oder g steht;
 d für a oder g oder t steht;
 h für a oder c oder t steht;
 n für a oder c oder g oder t steht;
 * für Insert c steht;
 ** für Insert t steht,
 § für Insert g steht; und
 # für Insert c steht.

Bevorzugte Oligonucleotide der vorgenannten Gruppe umfassen Oligonucleotide der SEQ ID NO 15 oder umfassen Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen, die Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 15 aufweisen:

caacccaat cgaacccc*a cctccccg**a §aa#attc 38 SEQ ID NO 15,

worin * für Insert c steht;
 ** für Insert t steht,
 § für Insert g steht; und
 # für Insert c steht.

Ebenfalls bevorzugte Oligonucleotide der vorgenannten Gruppe umfassen Oligonucleotide der SEQ ID NO 11 oder umfassen Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der angegebenen Nucleotid-

Sequenz gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen, die Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 11 aufweisen:

caacccaat cgaacccwc cwycvndnm hwhy 34 SEQ ID NO 11,

worin w für a oder t steht;
 m für a oder c steht;
 y für c oder t steht;
 v für a oder c oder g steht;
 d für a oder g oder t steht;
 h für a oder c oder t steht; und
 n für a oder c oder g oder t steht.

Ebenfalls bevorzugte Oligonucleotide der vorgenannten Gruppe umfassen Oligonucleotide oder umfassen Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen, die Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 16 aufweisen:

caacccaat cgaacccac ctccccgaaa attc 34 SEQ ID NO 16.

Die letztgenannte Gruppe von Oligonucleotiden der SEQ ID NO 16 ist aufgrund der erzielten Erkennung von *Trypanosoma cruzi*-Erregersequenzen besonders bevorzugt.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung, die allein oder mit weiteren Merkmalen der Erfindung verwirklicht werden können und die Erfindung nicht beschränken sollen, betrifft die Erfindung Oligonucleotide der vorstehend definierten

SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 5 oder SEQ ID NO 10 oder SEQ ID NO 11 oder SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 16, die eine oder mehrere Markierung(en) an einem oder an beiden ihrer 5'-Enden und/oder 3'-Enden aufweisen. Solche Markierungen, die bestimmten Zwecken bei der späteren Verwendung der Oligonucleotide dienen können, sind dem Fachmann allgemein bekannt und können daher den Gegebenheiten entsprechend aus dem Stand der Technik bekannten Markierungen gewählt werden. In weiter bevorzugten Ausführungsformen ist die eine oder sind die mehreren Markierung(en) Marker und sind noch weiter bevorzugt Fluoreszenzmarker oder Quencher. Beispielhaft können an dieser Stelle bekannte Fluoreszenzmarker bzw. Quencher wie FAM oder BHQ1 verwendet werden.

Oligonucleotide der SEQ ID Nos 3, 4, 5, 10, 11, 14, 15 und/oder 16 gemäß der vorstehenden Beschreibung können beispielsweise (ohne Beschränkung) als Sonden für die PCR verwendet werden und dienen erfindungsgemäß besonders bevorzugt als Sonden für die Real-Time-PCR, ohne die Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide auf diese Verwendung zu beschränken.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung, die allein oder mit weiteren Merkmalen der Erfindung verwirklicht werden können und die Erfindung nicht beschränken sollen, finden sich die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide der SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 5 oder SEQ ID NO 10 oder SEQ ID NO 11 oder SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 16 gemäß der obigen detaillierten beispielhaften Beschreibung in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Oligonucleotid(en) aus der Gruppe Forward Primer und Reverse Primer.

Weiter bevorzugt können beispielsweise Oligonucleotide der SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 5 oder SEQ ID NO 10 oder SEQ ID NO 11 oder SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 16 kombiniert werden mit einem Primer (1), beispielsweise in Form von Oligonucleotiden der Oligonucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 6 oder von Oligonucleotiden mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder von Oligonucleotiden mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 6 komple-

mentärer Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder von Oligonucleotiden mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 6 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

gcactatatt acaccaacct c 21 SEQ ID NO 6

und/oder mit einem Primer (2), beispielsweise in Form einer Oligonucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 7 oder von Oligonucleotiden mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder von Oligonucleotiden mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 7 komplementären Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder von Oligonucleotiden mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 7 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

catgcawctc mcccgtm 17 SEQ ID NO 7;

worin w für a oder t steht; und
 m für a oder c steht.

In einer bevorzugten, weil eine gute Erkennungsbasis darstellenden Ausführungsform von Oligonucleotiden der Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 7, die allein oder mit anderen Merkmalen der Erfindung realisiert werden kann und die Erfindung nicht beschränken soll, oder von Oligonucleotiden mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder von Oligonucleotiden mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 7 komplementären Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder von Oligonucleotiden mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 7 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen ist die Nucleotid-Sequenz eine solche der SEQ ID NO 12:

catgcatctc ccccgta 17 SEQ ID NO 12.

Vorzugsweise ist der Primer (1) ein Forward-Primer und/oder ist der Primer (2) ein Reverse-Primer. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist der Primer (2) ein Forward-Primer und/oder ist der Primer (1) ein Reverse-Primer.

Als Primer (1) und/oder Primer (2) können auch Oligonucleotide verwendet werden, die an ihrem 5'-Ende und/oder an ihrem 3'-Ende weitere Nucleotid-Sequenzen gebunden enthalten, jedoch in jedem Fall eine Oligonucleotid-Sequenz gemäß der vorstehenden SEQ ID Nos 6 und/oder 7 enthalten (oder zumindest ein Homolog davon):

Damit betrifft die Erfindung auch Oligonucleotide der vorstehend definierten SEQ ID Nos 4, 5, 6, 7, 10, 11 und 12, die umfassen: als Primer (1) Nucleotid-Sequenzen der SEQ IC NO 8 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 8 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 8 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

taaccaactg gcactatatt acaccaaccc caat 34 SEQ ID NO 8

und/oder die umfassen: als Primer (2) Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 9 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 9 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 9 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

vbsbnrdwwk catgcawctc mcccgtmcat tatyt*bn 38 SEQ ID NO 9

worin s für c oder g steht;
w für a oder t steht;
r für a oder g steht;
y für c oder t steht;
k für g oder t steht;
v für a oder c oder g steht;
d für a oder g oder t steht;
b für c oder g oder t steht;
n für a oder c oder g oder t steht; und
* für Insert „s“ steht.

In einer bevorzugten, weil eine gute Erkennungsbasis darstellenden Ausführungsform von Oligonucleotiden der Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 9, die allein oder mit anderen Merkmalen der Erfindung realisiert werden kann und die Erfindung nicht beschränken soll, oder von Oligonucleotiden mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder von Oligonucleotiden mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 9 komplementären Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder von Oligonucleotiden mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 9 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder von Oligonucleotiden mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen ist die Nucleotid-Sequenz eine solche der SEQ ID NO 13:

ggccagaatt catgcatctc ccccgtacat tattt*ta 38 SEQ ID NO 13,

worin * für Insert „s“ steht

Weiter bevorzugt sind auch in diesem Fall der Primer (1) ein Forward-Primer und/oder der Primer (2) ein Reverse-Primer, oder sind der Primer (2) ein Forward-Primer und/oder der Primer (1) ein Reverse-Primer.

Weiter betrifft die Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt Oligonucleotide der Sequenzen SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 und SEQ ID NO 16, wie sie vorstehend im Detail beschrieben sind, zur Verwendung bei der Amplifikation von Krankheitserreger-Nucleotid-Sequenzen. Besonders haben sich die Oligonucleotide gemäß den vorstehend angegebenen SEQ ID NOs 3 bis 16 bewährt bei der ausschließlichen Amplifikation von *Trypanosoma cruzi*-DNA-Sequenzen, in einer Mischung von DNA unterschiedlicher Provenienz, besonders bevorzugt durch PCR, erfindungsgemäß am meisten bevorzugt durch Real-Time-PCR.

Die Ergebnisse der Durchführung einer Real-Time-PCR mit den erfindungsgemäßen Kombinationen aus Primern (Forward-Primern und Reverse Primern) mit einer erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Sonde (gegebenenfalls mit Markern) gemäß der vorstehenden Beschreibung deuten – ohne auf diese Deutungen festgelegt werden zu wollen – darauf hin, dass die identifizierte Region der DNA von *Trypanosoma cruzi* ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal zu der DNA von *Trypanosoma rangeli* ist. Kreuzreaktionen zu *Trypanosoma rangeli* werden nicht beobachtet.

Im Rahmen der Erfindung ausgetestete Stämme von *Trypanosoma cruzi* sind die Stämme *Trypanosoma cruzi* CL Brenner (Hg 39), *Trypanosoma cruzi* Typ Y (Vero) und *Trypanosoma cruzi* Brazil (HG 39). Diese wurden in den neuen Real-Time-PCR's unter Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide detektiert. Andererseits blieben Kreuzreaktionen mit *Malaria tertiana* und *Malaria tropica* und *Leishmania brasiliensis* aus.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung der Oligonucleotide der definierten SEQ ID NOs 3 bis 16 zur Bestimmung der Präsenz oder Abwesenheit von DNA von *Trypanosoma cruzi* im Körper eines Tieres oder Menschen, vorzugsweise im Körper eines Insekts, eines Geflügels, einer Säugers oder eines Menschen, weiter bevorzugt in einer Probe eines Körpergewebes oder einer Körperflüssigkeit eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, am meisten bevorzugt in einer Gewebe-

probe oder einer Blutprobe oder einer Plasmaprobe oder einer Serumprobe eines Menschen.

Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung der Oligonucleotide der definierten SEQ ID NOs 3 bis 16 zur Diagnose der Chagas-Krankheit im Körper eines Tieres oder Menschen, vorzugsweise im Körper eines Insekts, eines Geflügels, einer Säugers oder eines Menschen, weiter bevorzugt in einer Probe eines Körpergewebes oder einer Körperflüssigkeit eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, am meisten bevorzugt in einer Gewebeprobe oder einer Blutprobe oder einer Plasmaprobe oder einer Serumprobe eines Menschen.

Wie oben beschrieben, betrifft die Erfindung auch Oligonucleotide

- (i) mit der Sequenz SEQ ID NO 1 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder
- (ii) Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 1 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder
- (iii) Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 1 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

ccccwccwcc vnd

13

SEQ ID NO 1,

worin

w für a oder t steht;

v für a oder c oder g steht,

d für a oder g oder t steht; und

n für a oder c oder g oder t steht,

welche sich zur Unterscheidung der Erreger-Sequenz von *Trypanosoma cruzi* von Sequenzen anderer *Trypanosoma* eignen, beispielsweise *Trypanosoma rangeli*.

In einer bevorzugten, weil eine gute Erkennungsbasis darstellenden Ausführungsform betrifft die Erfindung Oligonucleotide, die umfassen die, oder die bestehen aus der, Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 2, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 2 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 2 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

ccccacctcc ccg

13

SEQ ID NO 2,

mit der eine besonders zuverlässige Unterscheidung der Erreger-Sequenz von *Trypanosoma cruzi* von *Trypanosoma rangeli* gelingt, im Unterschied zu den einleitend beschriebenen PCR's aus dem Stand der Technik.

Experimenteller Teil: Teil 1:

In dem in der nachfolgenden Tabellen-Kombination wiedergegebenen PCR-Lauf wurden verschiedene DNA-Proben verschiedener Probanden getestet. Alle Proben wurden untersucht mittels Serologie (Schnelltest [Chagas Ab Rapid von Standard Diagnostics] oder ELISA [Elisa in house des Laboratorio de Salud], Immunfluoreszenz [Immunfluoreszenz in house, Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin]), kDNA-PCR, TCZ-PCR, 18s-rRNA-PCR.

Die in der Tabelle mit „Cruzi“, „Rangeli“ und „Homo s“ bezeichneten Proben wurden zusätzlich sequenziert.

Das Cycler-Programm des Geräts (Rotorgene, Firma Qiagen) wurde wie folgt programmiert:

15 min 95 °C; anschließend

45 Cyclen für 15 sec 95 °C und 60 sec 60 °C; anschließend

30 sec 40 °C.

Die Ergebnisse sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 1

Experiment Information

Run Name	Lauf definierte Proben
Run Start	5/5/2015 3:31:52 AM
Run Finish	5/5/2015 5:38:03 AM
Operator	PCR
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.1.0.9
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	8.
Gain Yellow	10.
Gain Orange	10.
Gain Red	10.









Tabelle 2
































Quantitation Information

Threshold	0.00483
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 3
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Ergebnisse:

Tabelle 3

No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1		Cruzi 1	Unknown	33.93			
2		Cruzi 1	Unknown	28.89			
3		Cruzi 1	Unknown	39.95			
4		Cruzi 2	Unknown	32.92			
5		Cruzi 2	Unknown	33.70			
6		Cruzi 2	Unknown	35.03			
7		Cruzi 3	Unknown	29.76			
8		Cruzi 3	Unknown	30.03			

No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
9		Cruzi 3	Unknown	29.83			
10		Cruzi 4	Unknown	35.73			
11		Cruzi 4	Unknown	33.02			
12		Cruzi 4	Unknown	36.50			
13		Cruzi 5	Unknown	36.38			
14		Cruzi 5	Unknown	35.39			
15		Cruzi 5	Unknown	34.02			
16		Rangeli 1	Unknown		NEG (NTC)		
17		Rangeli 1	Unknown		NEG (NTC)		
18		Rangeli 1	Unknown		NEG (NTC)		
19		Rangeli 2	Unknown		NEG (NTC)		
20		Rangeli 2	Unknown		NEG (NTC)		
21		Rangeli 2	Unknown		NEG (NTC)		
22		Rangeli 3	Unknown		NEG (NTC)		
23		Rangeli 3	Unknown		NEG (NTC)		
24		Rangeli 3	Unknown		NEG (NTC)		
25		Rangeli 4	Unknown		NEG (NTC)		
26		Rangeli 4	Unknown		NEG (NTC)		
27		Rangeli 4	Unknown		NEG (NTC)		
28		Homo S. 1	Unknown		NEG (NTC)		
29		Homo S. 1	Unknown		NEG (NTC)		
30		Homo S. 1	Unknown		NEG (NTC)		
31		Homo S. 2	Unknown		NEG (NTC)		
32		Homo S. 2	Unknown		NEG (NTC)		
33		Homo S. 2	Unknown	37.10			
34		Homo S. 3	Unknown		NEG (NTC)		
35		Homo S. 3	Unknown		NEG (NTC)		
36		Homo S. 3	Unknown		NEG (NTC)		
37		Homo S. 4	Unknown		NEG (NTC)		
38		Homo S. 4	Unknown		NEG (NTC)		
39		Homo S. 4	Unknown		NEG (NTC)		

No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
40	■	Neg. Probe 1	Unknown		NEG (NTC)		
41	■	Neg. Probe 1	Unknown		NEG (NTC)		
42	■	Neg. Probe 1	Unknown		NEG (NTC)		
43	■	Neg. Probe 2	Unknown		NEG (NTC)		
44	■	Neg. Probe 2	Unknown		NEG (NTC)		
45	■	Neg. Probe 2	Unknown		NEG (NTC)		
46	■	Neg. Probe 3	Unknown		NEG (NTC)		
47	■	Neg. Probe 3	Unknown		NEG (NTC)		
48	■	Neg. Probe 3	Unknown		NEG (NTC)		
49	■	Neg. Probe 4	Unknown		NEG (NTC)		
50	■	Neg. Probe 4	Unknown		NEG (NTC)		
51	■	Neg. Probe 4	Unknown	35.17			
52	■	Negativ - H2O	Unknown		NEG (NTC)		
53	■	Negativ - H2O	Unknown		NEG (NTC)		
54	■	Positiv Tulahuen 1:100	Unknown	23.09			
55	■	Positiv Tuahuen 1:1000	Unknown	27.38			

Die ermittelten Werte sind in Figur 2 in einer Graphik einander gegenübergestellt.

Wie die vorstehenden Daten, zusammen mit der Graphik von Figur 2, zeigen, wurden in allen Fällen, in denen Erregersequenzen von *Trypanosoma cruzi* bereits durch die Sequenzierung bestätigt wurden, diese in dem erwarteten CT-Bereich angezeigt und wurden damit eindeutig detektiert. Im Gegensatz dazu blieben alle (verwandten) Erregersequenzen von *Trypanosoma rangeli* im Test negativ.

Experimenteller Teil: Teil 2:**Sensitivität, Spezifität**

Die labortechnische Diagnosestellung der Chagas-Erkrankung ist insofern eine Herausforderung, als dass es keinen Goldstandard gibt. Darüber hinaus ist die Diagnosestellung abhängig von dem Stadium der Erkrankung. So können chronische Formen bereits mit Hilfe von serologischen Verfahren (Schnelltest, Elisa, Immunfluoreszenz, etc.) gut festgestellt werden, akute, indeterminante oder kongenitale Formen sowie Rezidive oder die Kontrolle einer stattgehabten Therapie aber nicht. Im Gegensatz zu den indirekten serologischen Nachweisverfahren empfehlen sich hier die Direktnachweise des Erregers z.B. mittels RT-PCR.

Viele Ansätze sind diesbezüglich versucht und ausgewertet worden (s. Veröffentlichungen Schijman et al, Qvarnström et al und andere). Beispielhaft für viele PCRs stellten Qvarnström et al für drei der führenden PCRs Sensitivitäten und Spezifitäten dar:

	kDNA-PCR	18S rRNA PCR	TCZ-PCR
Sensitivität	78%	6%	63%
Spezifität	40%	100%	100%

(modifiziert nach Qvarnström et al, 2012)

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist das untersuchte Studienkollektiv (119), das überwiegend aus Erwachsenen mit bekannter Chagas-Erkrankung bestand, welche unter Immunsuppression (nach Organtransplantation, AIDS) reaktiviert worden war, oder kongenital oder durch Laborunfälle erworben war. Bei vielen aus diesem Kollektiv waren hohe Parasitämien zu erwarten. Trotzdem kommen die Autoren zu der Schlußfolgerung, daß mit diesen PCRs zwar eine diagnostische Unterstützung stattfinden, aber keine zuverlässige Diagnose gestellt werden kann, es sei denn, die Probe zeigte sich in allen drei PCRs positiv.

Im Rahmen einer Studie in Kolumbien wurden wir auf das Problem der Chagas-Erkrankung aufmerksam. Wir haben insgesamt 1009 Proben aus einem Hochendemiegebiet auf Chagas untersucht.

Aus diesem Kollektiv, bestehend aus allen Altersklassen, Gesunden, akuten, chronischen und chronisch-indeterminanten Chagase-Erkrankten, wurden ca. 100 PCR-positive Proben sequenziert. Da alle TCZ und 18S rRNA PCR positiven Proben auch kDNA PCR positiv waren, wurde hier das Amplifikat der kDNA PCR kloniert und sequenziert. In 87 Fällen sind Klonierung und Sequenzierung gelungen. Es fanden sich 65 sequentiell gesicherte Nachweise für *Trypanosoma cruzi*, 14 für *Trypanosoma rangeli* und 8 für *Homo sapiens*.

Auch die PCR-Amplifikate von sechs Proben der neu entwickelten PCR wurden sequenziert. Alle zeigten einen positiven Nachweis für *T.cruzi*. Eine dieser positiv sequenzierten Proben war nur in der neuen PCR positiv und wurde von keiner der anderen drei PCRs detektiert.

Ausgehend von diesen Ergebnissen haben wir die Sensitivitäten und Spezifitäten für das sequenzierte Kollektiv für alle PCRs zu gleichen Bedingungen berechnet und in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

	kDNA-PCR	18S rRNA PCR	TCZ-PCR	<i>Neu entwickelte PCR</i>
Sensitivität	89,2%	1,5%	20,5%	92,3%
Spezifität	22,7%	100%	100%	100%

Die guten Spezifitäten der 18S rRNA und TCZ PCR konnten – wie zuvor bei Qvarnström et al beschrieben - auch hier bestätigt werden. Allerdings zeigten sich die Sensitivitäten geringer (viele falsch negative Ergebnisse). Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Kollektive sein. Bei Reaktivierungen z.B sind die Parasitämien meist

hoch, bei einer Querschnittsbevölkerung mit vorwiegend chronischen/chronisch indeterminanten Verläufen ist die Anzahl der Parasiten jedoch eher gering.

Die kDNA-PCR zeigt eine gute Sensitivität, liegt jedoch in der Spezifität sehr niedrig. Ein Grund hierfür sind viele falsch positive Ergebnisse, die zumeist auf eine Kreuzreaktion mit *T. rangeli* zurückzuführen sind. *T. rangeli* gilt als naher Verwandter zu *T. cruzi*, wird jedoch im Gegensatz zu *T. cruzi* als apathogen angesehen. Die neu entwickelte PCR zeigt als einzige sowohl gute Sensitivitäten als auch Spezifitäten. In dieser Gruppe wurde keine Probe als falsch positiv klassifiziert und alle negativen als richtig negativ erkannt.

Inter- und Intra-Assay-Daten

Für den Interassay wurde die Positivkontrolle Tulahuen in einer Verdünnung von 1 : 100 verwendet und an drei verschiedenen Tagen an 10 Proben pro Lauf getestet (22.-24.6.15). Der Variationskoeffizienzwert belief sich auf 1,86%.

Für den Intraassay wurden 20 Proben der Positivkontrolle Tulahuen jeweils 1 : 100 und 1 : 10.000 verdünnt in einem Lauf getestet. Der Variationskoeffizienzwert belief sich auf 1,7% für die Verdünnung von 1 : 100 und auf 2,4% für die 1 : 10.000 Verdünnung.

Primer-Dimer-Lauf

In einem Primer-Dimer-Lauf (auch Wasserlauf genannt) wurden nur Primer, Sonde, Magnesiumchlorid, Puffer und Wasser angesetzt, um ggf. Interaktionen der einzelnen Komponenten des Kits zu erkennen. Diese traten in keiner der getesteten 30 Proben auf.

Definiertes Plasmid zur Quantifizierung

Mit Hilfe eines definierten Plasmids wurde eine Standardkurve zur Ermittlung der Quantität der Parasitämie erstellt. Dazu wurde eine bereits bekannt positive Probe amplifiziert, kloniert und sequenziert, gleichzeitig wurde die Plasmidkonzentration

gemessen. Nach erneuter Bestätigung der Sequenz als *T. cruzi* und einem Meßergebnis von 10^{11} Plasmiden / μl in der Probe konnte über eine Verdünnungsreihe im Dreifachansatz die Standardkurve ermittelt werden. Die Messung der Verdünnungsreihe sowie die Erstellung der Standardkurve erfolgte sowohl für die kDNA-PCR (modifiziert von Qvarnström et al) als auch für die neue PCR.

Im Anschluss wurden zwei bekannt positive Proben in logarithmischen Verdünnungsstufen in beiden oben genannten PCRs getestet.

Als Nachweisgrenze wurde in der Veröffentlichung von Schijman et al (2011) 5×10^{-3} Parasiten/ml beschrieben. In unseren Untersuchungen stellte sich für die kDNA PCR (modifiziert von Qvarnström et al) eine Nachweisgrenze von 3×10^{-2} Parasiten/ml heraus.

Die neu entwickelte PCR hat einen Detektionsgrenze von 3×10^{-4} Erreger/ml.

Damit kann die neu entwickelte PCR selbst geringe Parasitämien nachweisen, womit die Möglichkeit besteht, die Diagnostik bei akuten, kongenitalen, chronisch-indeterminanten Infektionen sowie Therapie-Erfolgskontrollen, Reaktivierungen unter Immunsuppression, Screening vor Organtransplantationen oder Blutabgaben und Bekämpfungsmaßnahmen (z. B. Vektor-/Reservoirkontrolle usw.) zu verbessern.

Patentansprüche

1. Oligonucleotide

- (i) mit der Sequenz SEQ ID NO 3 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder
- (ii) Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 3 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder
- (iii) Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 3 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

cgaacccc*w ccwyc 15 SEQ ID NO 3,

worin w für a oder t steht,
 y für c oder t steht; und
 * für ein Insert „c“ steht.

- 2. Oligonucleotide nach Anspruch 1, umfassend die, oder bestehend aus der, Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 14 nach Anspruch 1, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 14 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 14 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

cgaaccccwc cwyc 14 SEQ ID NO 14,

worin w für a oder t steht; und
y für c oder t steht; oder

umfassend die, oder bestehend aus der, Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 4 nach Anspruch 1, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 4 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 4 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

cgaacccc*a cctcc 15 SEQ ID NO 4,

worin * für ein Insert "c" steht; vorzugsweise

Oligonucleotide, umfassend die, oder bestehend aus der, Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 10 nach Anspruch 1, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 10 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 10 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

cgaaccccac ctcc 14 SEQ ID NO 10.

3. Oligonucleotide nach Anspruch 1 oder 2, umfassend Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 5 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-

Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 5 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 5 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

caacccaat cgaacccc*w ccwycvnd**d §nm#hwhy 38 SEQ ID NO 5

worin w für a oder t steht;
 m für a oder c steht;
 y für c oder t steht;
 v für a oder c oder g steht;
 d für a oder g oder t steht;
 h für a oder c oder t steht;
 n für a oder c oder g oder t steht;
 * für Insert „c“ steht;
 ** für Insert „t“ steht,
 § für Insert „g“ steht; und
 # für Insert „c“ steht; vorzugsweise

Oligonucleotide umfassend Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 11 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 11 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 11 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

caacccaat cgaaccccwc cwycvnddnm hwhy 34 SEQ ID NO 11,

worin w für a oder t steht;
 m für a oder c steht;
 y für c oder t steht;
 v für a oder c oder g steht;
 d für a oder g oder t steht;
 h für a oder c oder t steht; und
 n für a oder c oder g oder t steht.; oder

Oligonucleotide umfassend Oligonucleotide der SEQ ID NO 15 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen, die Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 15 aufweisen:

caacccaat cgaacccc*a cctcccg**a §aa#attc 38 SEQ ID NO 15,

worin * für Insert c steht;
 ** für Insert t steht,
 § für Insert g steht; und
 # für Insert c steht; vorzugsweise

Oligonucleotide umfassend Oligonucleotide der SEQ ID NO 16 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der angegebenen Nucleotid-Sequenz gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz

homologen Nucleotid-Sequenzen, die Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 16 aufweisen:

caacccaat cgaacccac ctccccgaaa attc 34 SEQ ID NO 16.

4. Oligonucleotide der SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 10 oder SEQ ID NO 11 nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, aufweisend eine oder mehrere Markierung(en) an einem oder an beiden ihrer 5'-Enden und/oder 3'-Enden, vorzugsweise worin die eine oder die mehreren Markierung(en) Marker sind, weiter bevorzugt worin die eine oder die mehreren Markierung(en) Fluoreszenzmarker oder Quencher ist/sind.
5. Oligonucleotide der SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 5 oder SEQ ID NO 10 oder SEQ ID NO 11 oder SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 16 nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Oligonucleotid(en) aus der Gruppe Forward Primer und Reverse Primer.
6. Oligonucleotide der SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 5 oder SEQ ID NO 10 oder SEQ ID NO 11 oder SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 16 nach Anspruch 5, worin ein Primer (1) umfasst: eine Oligonucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 6 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 6 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotidsequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 6 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

gcactatatt acaccaacc c 21 SEQ ID NO 6

und/oder worin ein Primer (2) umfasst: eine Oligonucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 7 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder

der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 8 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

taaccaactg gcactatatt acaccaaccc caat 34 SEQ ID NO 8

und/oder umfassend als Primer (2) Nucleotid-Sequenzen der SEQ ID NO 9 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 9 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 9 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

vbsbnrddwwk catgcawctc mcccgtmcat taty*bn 38 SEQ ID NO 9

worin

- s für c oder g steht;
- w für a oder t steht;
- r für a oder g steht;
- y für c oder t steht;
- k für g oder t steht;
- v für a oder c oder g steht;
- d für a oder g oder t steht;
- b für c oder g oder t steht;
- n für a oder c oder g oder t steht; und
- * für Insert „s“ steht; und

vorzugsweise umfassend: Oligonucleotide der Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 13 oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 13 komplementären Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit

hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 13 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

ggccagaatt catgcatctc ccccgtaacat tattt*ta 38 SEQ ID NO 13,

worin * für Insert „s“ steht;

weiter vorzugsweise worin der Primer (1) ein Forward-Primer und/oder worin der Primer (2) ein Reverse-Primer ist; oder worin der Primer (2) ein Forward-Primer und/oder worin der Primer (1) ein Reverse-Primer ist.

8. Oligonucleotide der Sequenzen SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 und/oder SEQ ID NO 16 nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 zur Verwendung bei der Amplifikation von Krankheitserreger-Nucleotid-Sequenzen, vorzugsweise zur ausschließlichen Amplifikation von *Trypanosoma cruzi*-DNA-Sequenzen, in einer Mischung von DNA unterschiedlicher Provenienz, besonders bevorzugt durch PCR, am meisten bevorzugt durch Real-Time-PCR.
9. Verwendung der Oligonucleotide der Sequenzen SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 und/oder SEQ ID NO 16 nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 zur Bestimmung der Präsenz oder Absenz von DNA von *Trypanosoma cruzi* im Körper eines Tieres oder Menschen, vorzugsweise im Körper eines Insekts, eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, weiter bevorzugt in einer Probe eines Körpergewebes oder einer Körperflüssigkeit eines Geflügels, eines Säugers oder eines Menschen, am meisten bevorzugt in einer Gewebeprobe oder einer Blutprobe oder einer Plasmaprobe oder einer Serumprobe eines Menschen.

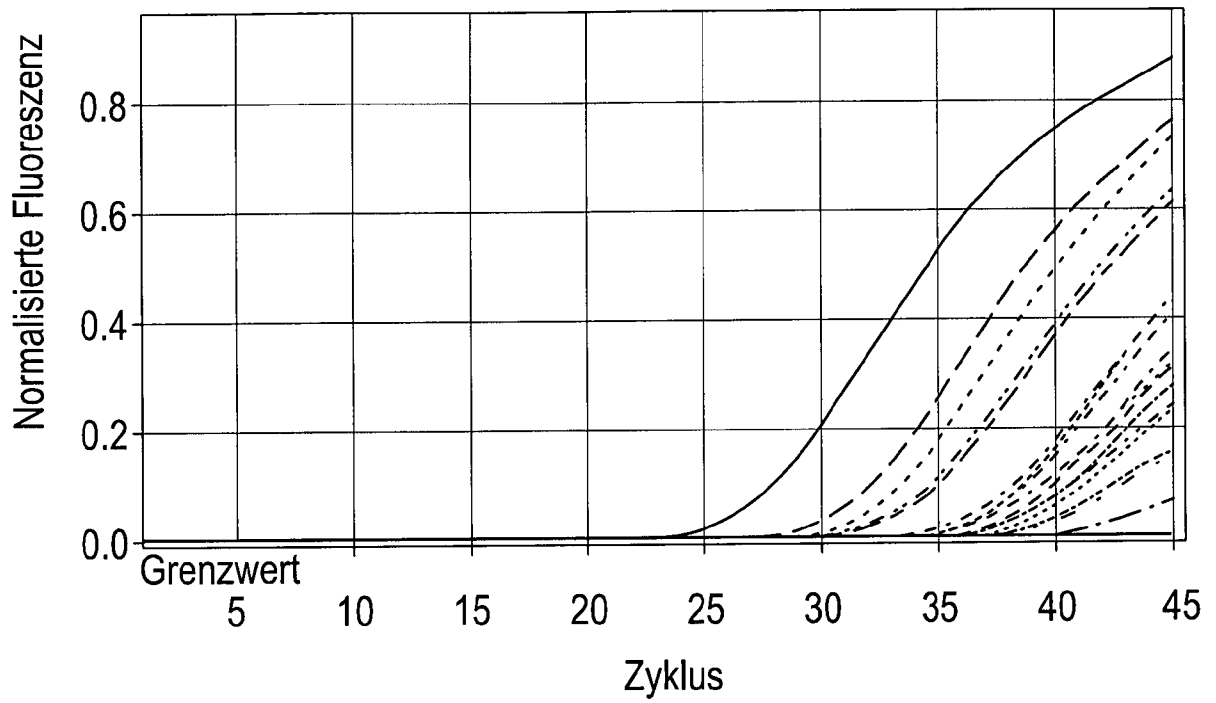
12. Oligonucleotide nach Anspruch 11, umfassend die, oder bestehend aus der, Nucleotid-Sequenz SEQ ID NO 2 nach Anspruch 11, oder Oligonucleotide mit dazu homologen Nucleotid-Sequenzen, oder Oligonucleotide mit zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 2 komplementärer Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der komplementären Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen; oder Oligonucleotide mit hinsichtlich der Leserichtung 5' → 3' zu der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID NO 2 gegenläufiger Nucleotid-Sequenz oder Oligonucleotide mit zu der gegenläufigen Nucleotid-Sequenz homologen Nucleotid-Sequenzen:

ccccacctcc ccg

13

SEQ ID NO 2.

Ermittelte Daten:



Figur 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/066561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/006755 A2 (CASTELLANOS ALEJANDRO [US]; TRAVI BRUNO [US]; Saldarraga Omar [US]; M) 15 January 2015 (2015-01-15) Trypanosoma cruzi DNA detection probe, SEQ ID 29 beinhaltet SEQ ID NO:12 -----	1-11
X	US 2013/267429 A1 (GARDNER SHEA [US] ET AL) 10 October 2013 (2013-10-10) GS NUC ALERT:US2013267429.374977 offenbart ein Oligonukleotid von 51 bp das SEQ ID NO:2 umfasst. ----- -/--	12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 12 October 2016	Date of mailing of the international search report 24/10/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gabriels, Jan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066561

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ELIZABETH A. GARCÍA ET AL: "TcTASV: A Novel Protein Family in Trypanosoma cruzi Identified from a Subtractive Trypomastigote cDNA Library", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, vol. 4, no. 10, 5 October 2010 (2010-10-05), page e841, XP055309452, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000841 the whole document & DATABASE EMBL [Online]</p> <p>16 May 2010 (2010-05-16), "TcT-E01h14.b1d TcT-E Trypanosoma cruzi cDNA clone tcte-01h14, mRNA sequence.", retrieved from EBI accession no. EM_EST:GW883681 Database accession no. GW883681 sequence</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	12
X	<p>BURGOS J M ET AL: "Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of Trypanosoma cruzi bloodstream populations causing congenital Chagas disease", INTERNATIONAL JOURNAL OF PARASITOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 37, no. 12, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 1319-1327, XP026865144, ISSN: 0020-7519 [retrieved on 2007-08-24] the whole document & DATABASE EMBL [Online]</p> <p>11 September 2006 (2006-09-11), "Trypanosoma cruzi clone Si.I-3 kinetoplastid minicircle, partial sequence.", retrieved from EBI accession no. EM_STD:DQ873372 Database accession no. DQ873372 sequence</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	6,8-10
A	<p>WO 2011/087782 A2 (UNIV TULANE [US]; CARLIER YVES [BE]; DUMONTEIL ERIC [MX]) 21 July 2011 (2011-07-21) claim 3; example 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	9,10
A	<p>CA 2 736 087 A1 (LI XINJUN [CA]) 30 September 2012 (2012-09-30) claims 1,2; table 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/066561

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/066561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015006755 A2	15-01-2015	US 2016130669 A1 WO 2015006755 A2	12-05-2016 15-01-2015

US 2013267429 A1	10-10-2013	NONE	

WO 2011087782 A2	21-07-2011	NONE	

CA 2736087 A1	30-09-2012	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12Q1/68 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12Q		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2015/006755 A2 (CASTELLANOS ALEJANDRO [US]; TRAVI BRUNO [US]; SALLARRIAGA OMAR [US]; M) 15. Januar 2015 (2015-01-15) Trypanosoma cruzi DNA detection probe, SEQ ID 29 beinhaltet SEQ ID NO:12 -----	1-11
X	US 2013/267429 A1 (GARDNER SHEA [US] ET AL) 10. Oktober 2013 (2013-10-10) GS NUC ALERT:US2013267429.374977 offenbart ein Oligonukleotid von 51 bp das SEQ ID NO:2 umfasst. ----- -/--	12
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
12. Oktober 2016		24/10/2016
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gabriels, Jan

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>ELIZABETH A. GARCÍA ET AL: "TcTASV: A Novel Protein Family in Trypanosoma cruzi Identified from a Subtractive Trypomastigote cDNA Library", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, Bd. 4, Nr. 10, 5. Oktober 2010 (2010-10-05), Seite e841, XP055309452, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000841 das ganze Dokument & DATABASE EMBL [Online]</p> <p>16. Mai 2010 (2010-05-16), "TcT-E01h14.bld TcT-E Trypanosoma cruzi cDNA clone tcte-01h14, mRNA sequence.", gefunden im EBI accession no. EM_EST:GW883681 Database accession no. GW883681 Sequenz</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	12
X	<p>BURGOS J M ET AL: "Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of Trypanosoma cruzi bloodstream populations causing congenital Chagas disease", INTERNATIONAL JOURNAL OF PARASITOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, Bd. 37, Nr. 12, 1. Oktober 2007 (2007-10-01), Seiten 1319-1327, XP026865144, ISSN: 0020-7519 [gefunden am 2007-08-24] das ganze Dokument & DATABASE EMBL [Online]</p> <p>11. September 2006 (2006-09-11), "Trypanosoma cruzi clone Si.I-3 kinetoplastid minicircle, partial sequence.", gefunden im EBI accession no. EM_STD:DQ873372 Database accession no. DQ873372 Sequenz</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	6,8-10
A	<p>WO 2011/087782 A2 (UNIV TULANE [US]; CARLIER YVES [BE]; DUMONTEIL ERIC [MX]) 21. Juli 2011 (2011-07-21) Anspruch 3; Beispiel 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	9,10
A	<p>CA 2 736 087 A1 (LI XINJUN [CA]) 30. September 2012 (2012-09-30) Ansprüche 1,2; Tabelle 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	9,10

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a) im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der internationalen Anmeldung war und
- in Form einer Textdatei gemäß Anhang C/ST.25 vorlag.
- in Papierform oder in Form einer Bilddatei vorlag.
- b) zusammen mit der internationalen Anmeldung gemäß Regel 13ter.1 a) PCT nur für die Zwecke der internationalen Recherche in Form einer Textdatei gemäß Anhang C/ST.25 eingereicht wurde.
- c) nach dem internationalen Anmeldedatum nur für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde, und zwar
- in Form einer Textdatei gemäß Anhang C/ST.25 (Regel 13ter.1 a)).
- in Papierform oder in Form einer Bilddatei (Regel 13ter.1 b) und Abschnitt 713 der Verwaltungsvorschriften).
2. In dem Fall, dass mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht wurde, wurden zusätzlich die erforderlichen Erklärungen eingereicht, dass die Informationen in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien denen entsprechen, die im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der Anmeldung waren, bzw. dass sie nicht über den Offenbarungsgehalt der Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/066561

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2015006755 A2	15-01-2015	US 2016130669 A1 WO 2015006755 A2	12-05-2016 15-01-2015

US 2013267429 A1	10-10-2013	KEINE	

WO 2011087782 A2	21-07-2011	KEINE	

CA 2736087 A1	30-09-2012	KEINE	
