(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 20 856 T2** 2006.12.28

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 183 393 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 20 856.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU01/00291**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 911 285.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/068909**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.03.2001**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.09.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.03.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.06.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.12.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
PQ622900 15.03.2000 AU

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:
Eimeria Pty. Ltd., Melbourne, AU

(74) Vertreter:
Flaccus, R., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 50389 Wesseling

(72) Erfinder:
GASSER, Beat, Robin, Werribee, VIC 3030, AU; WOODS, Geoffery, Wayne, Sunbury, VIC 3429, AU; RICHARDS, Grant, David, Frankston North, VIC 3199, AU; WHITHEAR, George, Kevin, Port Melbourne, VIC 3207, AU

(54) Bezeichnung: **IDENTIFIZIERUNG VON EIMERIA SPEZIES UND STÄMMEN AUF PCR-BASIS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

ERFINDUNGSGEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein PCR-basiertes Verfahren zur Identifizierung unterschiedlicher Spezies der Gattung Eimeria (allgemein als Kokzidien bekannt). Insbesondere betrifft die Erfindung ein PCR-basiertes Verfahren, das gattungsspezifisch ist, bei dem neuartige PCR-Primer Verwendung finden und mit dessen Hilfe man in der Lage ist, auch Spezies von Eimeria zu identifizieren, die sich nur durch relativ geringfügige Sequenzabweichungen unterscheiden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die bibliographischen Daten der Veröffentlichungen, auf die hier Bezug genommen wird, sind am Ende der Beschreibung aufgelistet.

[0003] Der vorliegende Text enthält die folgenden allgemein üblichen Abkürzungen: ITS ("Internal Transcribed Spacer"), ITS-1 (erster "Internal Transcribed Spacer"), ITS-2 (zweiter "Internal Transcribed Spacer"), rDNA (ribosomale DNA), TBE ("Tris-Borat-EDTA"), DPGE ("denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese"), SSCP ("Single-Strand Conformation Polymorphism", Einzelstrang-Konformationspolymorphismus).

[0004] Kokzidiose ist eine Krankheit bei Tieren und Vögeln, die durch unter der Bezeichnung Kokzidien bekannte protozoische Parasiten (Eimeria) verursacht wird. Diese Krankheit ist weltweit für die Geflügelindustrie von erheblicher ökonomischer Bedeutung.

[0005] Eimeria-Spezies haben komplizierte Lebenszyklen, deren Einzelheiten gut beschrieben sind. Kurz gesagt, werden nach Aufnahme einer sporulierten (infektiösen) Kokzidien-Oozyste Sporozoiten freigesetzt und initiieren asexuelle und sexuelle Zyklen, die zur Entstehung tausender neuer Oozysten führen, welche dann über den Kot des Wirts verbreitet werden. In der Umwelt bilden diese Oozysten innerhalb von Tagen Sporen und sind dann für naive Vögel infektiös. Eine einzige sporulierte Oozyste kann tausende Nachkommen haben. Eimeria-Spezies verursachen Verletzungen im Darm durch Zerstörung der Epithelzellen, in denen sie sich entwickeln und vermehren, und sie verursachen Schäden an der Darmwand.

[0006] Zu den klinischen Symptomen der Kokzidiose gehört Durchfall, der schleimig oder blutig sein kann, und Dehydrierung. Auf diese Symptome folgen ein gesträubtes Federkleid, Anämie, Apathie, Gewichtsverlust, Einziehen des Kopfes und des Halses, sowie Schläfrigkeit. Sei Legehühnern wird Kokzidiose normalerweise durch eine verminderte Eierproduktion entdeckt. Infizierte Vögel zeigen ein nicht zufriedenstellendes Wachstum. Im Falle von hochvirulenten Stämmen von Eimeria ist die Sterblichkeit bei Hühnern gewöhnlich hoch.

[0007] Derzeit sind sieben Eimeria-Spezies als für Hühner infektiös anerkannt. Diese Spezies unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Biologie und Pathogenität erheblich (McDougald et al., 1998). Die Möglichkeit der exakten Identifizierung von Eimeria-Spezies und -"Stämmen" hat erhebliche Auswirkungen auf die Diagnose und Kontrolle wie auch auf die Erforschung ihrer Epidemiologie und Populationsbiologie.

[0008] Herkömmlicherweise werden Eimeria-Spezies mittels einer Anzahl unterschiedlicher Verfahren identifiziert, beispielsweise anhand morphologischer Merkmale und/oder der Morphometrie ihrer Oozysten oder Sporozysten (Größe, Form, Länge und Breite), ihrer Entwicklungsmuster, der Art der verursachten Läsionen, ihres bevorzugten Vorkommens im Darm, oder der Sporulationszeiten und des Reproduktionsindexes. Diese Kriterien können jedoch unzuverlässig sein (Eckert et al., 1995). Biochemische, immunologische und molekulare Verfahren (Andrews and Chilton, 1999; Gasser, 1997) können diese Beschränkungen zwar überwinden, jedoch können sie selbst andere Beschränkungen aufweisen.

[0009] Auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Verfahren, bei denen geeignete Markergene eingesetzt werden, können als alternative verfahren für die Identifizierung von Eimeria-Spezies angewendet werden, da man hiermit in der Lage ist, winzige Mengen parasitären Materials zu amplifizieren (z.B. Stucki et al., 1993). Allerdings sind die bisher beschriebenen Verfahren speziesspezifisch und können die Durchführung einer Reihe unterschiedlicher PCR-Reaktionen erfordern (unter Verwendung unterschiedlicher Paare speziesspezifischer Oligonucleotid-Primer), um eine bestimmte Eimeria-Spezies korrekt zu identifizieren.

[0010] Für die molekulare Identifizierung und Klassifizierung von Organismen ist die Analyse kritischer spezifischer Genomregionen erforderlich. Eine solche Region liegt bei Eukaryoten innerhalb der ribosomalen DNA

(rDNA) des Kerngenoms. Die rDNA von Eukaryoten ist eine Multigenfamilie, die aus tandemartig wiederholten Einheiten besteht. Jede Einheit umfasst einen "external transcribed Spacer" (ETS), die die 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA kodierenden Gene, getrennt durch "internal transcribed Spacer"-Regionen (ITS-1 bzw. ITS-2), und einen intergenischen Spacer (IGS). Innerhalb dieser Region stellen die Sequenzen von ITS-1 und ITS-2 verlässliche Markergene für die Identifizierung von Organismen auf der Artebene zur Verfügung, da die intraspezifische Variation in diesen Sequenzen normalerweise niedrig ist, verglichen mit höheren Niveaus interspezifischer Differenz.

[0011] Es wurde gezeigt, dass ITS-1 und ITS-2 nützliche Markergene für die Identifizierung von Eimeria-Spezies (Tsuji et al, 1997; Molloy et al, 1998; Schnitzler et al, 1999) oder für die Detektion von Populationsvariationen (Barta et al, 1998) darstellen.

[0012] Es wurde ein PCR-basierter Test entwickelt, bei dem speziesspezifische Primer aus der ITS-1-Sequenz zur Typisierung von Proben nach Spezies – auf Basis der Detektion eines Produktes einer bestimmten Größe auf Agarose-Gelen – verwendet werden (Schnitzler et al, 1999). Jedoch erlaubt dieser Test nicht die Analyse von Sequenzvariationen innerhalb eines spezifischen PCR-Produktes, und es kann ferner von Nachteil sein, dass es sich um einen speziesspezifischen Test handelt.

[0013] Weiterhin haben Barta et al 1998 eine Klonierungs/Sequenzierungs-Methode für die Analyse von Sequenzvariationen sowohl in ITS-1- als auch in ITS-2-Sequenzen in E. maxima angewendet. Jedoch kann die Anwendung dieser Methode Beschränkungen unterliegen, insbesondere dann, wenn eine große Anzahl von Proben analysiert werden muss, da die Methode arbeitsintensiv, zeitaufwändig und teuer in der Ausführung ist. Darüber hinaus führt dieses Verfahren nicht notwendigerweise zu einer exakten Aufklärung von Sequenzvariationen der unterschiedlichen Kopien von rDNA, außerdem ist es speziespezifisch, und es können mit diesem Verfahren Artefakte in die Sequenzdaten eingeführt werden (Gasser, 1997).

[0014] BARTA, J.R. ("Investigating phylogenetic relationships within the Apicomplexa using sequence data: The search for homology", 1997, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 13, 81–88) beschreibt die Verwendung von "universellen" Polymerase-Kettenreaktion-Primern, die zu den hochkonservierten Regionen der 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA-Gene komplementär sind, zur PCR-Amplifikation der 18S- und 5,8S-rRNA-Gene sowie der in höherem Maße variablen ITS-1- und ITS-2-Regionen. Sequenzdaten der rRNA-Gensequenzen wurden zur Analyse phylogenetischer Beziehungen zwischen Apicomplexa verwendet. Bei ITS-1 und ITS-2-Regionen wurde eine ausreichend hohe primäre Sequenzvariation festgestellt, um für die Feststellung von Stammvariationen bei fünf Stämmen von Eimeria maxima von Nutzen zu sein.

[0015] EP-A-0516381 betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einzelner Spezies von Eimeria mittels PCR-Amplifikation genomischer DNA und nachfolgender Hybridisierung der PCR-Produkte mit für Eimeria-Spezies spezifischen Gensonden aus kleinen rRNA-Untereinheiten (ssrRNA). Vorzugsweise werden PCR-Primer verwendet, die eine selektive Amplifizierung jeder dieser ssrRNA-Gen-Einheiten oder Fragmente derselben ermöglichen. Ferner sind die Nucleotidsequenzen für die ssrRNA-Gene der verschiedenen Eimeria-Spezies offenbart.

[0016] Gemäß TURENNE, C. Y., et al. ("Rapid identification of fungi by using ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system"; 1999, J. Clin. Microbiol., 37, 1846–1851) zeigte die ITS-2-Region verschiedener Candida-Hefen keine intraspezifische Variabilität innerhalb der Spezies, für die mehr als ein Stamm getestet wurde. Daher kann die interspezifische Sequenzvariabilität der ITS-2-Region für die speziesspezifische Diagnose klinischer Pilz-Isolate genutzt werden. PCR mit pilzspezifischen Primern, die auf konservierte Sequenzen der 5,8S- und 28S-rRNA-Gene abzielen, führt zu einer Amplifikation der speziesspezifischen ITS-2-Regionen, die bezüglich ihrer Amplikonlänge variabel sind.

[0017] TSUJI, N. et al. ("Discrimination of eight chicken Eimeria species using the two-step polymerase chain reaction"; 1997, The Journal of Parasitology, 83, 966–970) beschreibt ein Verfahren zur Unterscheidung von 8 Eimeria-Spezies. In einem ersten Schritt wird das ssrRNA-Gen unter Verwendung konservierter Sequenzen für die Apicomplexa-ssrRNA-Gene als Primer amplifiziert. In dem zweiten Schritt werden die PCR-Produkte einer zweiten PCR unterzogen, bei der es sich um eine RAPD-PCR ("random amplification of polymorphic DNA") handelt und bei der zufällig ausgewählte Primer eingesetzt werden. Die Gelanalyse der RAPD-PCR-Produkte ergibt Bandenmuster, die zur Identifizierung einzelner Eimeria-Spezies verwendet werden können.

[0018] Aufgrund der ökonomischen Bedeutung der Kokzidiose beispielsweise für die Geflügelindustrie ist es

wichtig, dass eine Identifikation von Eimeria-Spezies problemlos möglich ist, damit eine schnelle Diagnose der Krankheit und deren Behandlung schnell erfolgen können. Weiterhin ist für die Untersuchung der Epidemiologie der Krankheiten und für die Kontrolle der Reinheit von Laborlinien von Eimeria eine empfindliche und zuverlässige Identifizierung von Eimeria wünschenswert. Demgemäß besteht ein Bedarf an der Entwicklung eines Tests für die schnelle Identifizierung von Eimeria-Spezies, der die Beschränkungen der vorstehend beschriebenen Tests nicht aufweist.

[0019] Insbesondere bestand die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe in der Bereitstellung von Primern, die für die gattungsspezifische PCR-Amplifikation von spezifischen Regionen der rDNA von Eimeria geeignet sind, sowie in der Bereitstellung von Verfahren zur Detektion und Unterscheidung von Eimeria-Spezies auf der Basis der PCR-Amplifikation dieser Regionen der rDNA. Diese Aufgabe wird mit der vorliegenden Erfindung wie folgt gelöst:
Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Oligonucleotid, das wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 25 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

[0020] Vorzugsweise umfasst das Oligonucleotid die als SEQ ID NO: 25 bezeichnete Sequenz.

[0021] Alternativ hierzu ist das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 15 ausgewählt.

[0022] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Oligonucleotid bereitgestellt, dass wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 26 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

[0023] Vorzugsweise umfasst das Oligonucleotid die als SEQ ID NO: 26 bezeichnete Sequenz.

[0024] Alternativ hierzu ist das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 und SEQ ID NO: 16 ausgewählt.

[0025] Gemäß einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Oligonucleotid bereitgestellt, das wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 27 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

[0026] Vorzugsweise umfasst das Oligonucleotid die als SEQ ID NO: 27 bezeichnete Sequenz.

[0027] Alternativ hierzu ist das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 23 ausgewählt.

[0028] Gemäß einem vierten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Oligonucleotid bereitgestellt, das wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 28 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

[0029] Vorzugsweise umfasst das Oligonucleotid die als SEQ ID NO: 28 bezeichnete Sequenz.

[0030] Alternativ hierzu ist das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 und SEQ ID NO: 24 ausgewählt.

[0031] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein PCR-Primer-Paar bereitgestellt,

wobei es sich bei einem der Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 25 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon, und wobei es sich bei dem zweiten Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 26 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon.

[0032] Vorzugsweise umfasst das PCR-Primer-Paar einen Primer, der die als SEQ ID NO: 25 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst, sowie einen zweiten Primer, der die als SEQ ID NO: 26 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst. Alternativ hierzu umfasst das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16.

[0033] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein PCR-Primer-Paar bereitgestellt, wobei es sich bei einem der Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 27 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon, und wobei es sich bei dem zweiten Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 28 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon.

[0034] Vorzugsweise umfasst dieses PCT-Primer-Paar einen Primer, der die als SEQ ID NO: 27 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst, und einen Primer, der die als SEQ ID NO: 28 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst. Alternativ hierzu umfasst das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 oder SEQ ID NO: 23, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 oder SEQ ID NO: 24.

[0035] Vorzugsweise sind die hier beschriebenen PCR-Primer-Paare für die gattungsspezifische Amplifikation spezifischer Regionen der rDNA von Eimeria ausgelegt.

[0036] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Identifizierung von Eimeria in einer Probe bereitgestellt, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
Bereitstellen einer Probe, welche die zu testende genomische Original-DNA umfasst;
Bereitstellen genomischer DNA eines oder mehrerer Standards bekannter Identität;
Bereitstellen eines PCR-Primer-Paares, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

(i) Primern, die wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 25 und SEQ ID NO: 26 bezeichneten DNA-Sequenz umfassen, oder anlagernden Äquivalenten davon; oder
(ii) Primern, die wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 28 bezeichneten DNA-Sequenzen umfassen, oder anlagernden Äquivalenten davon;

Amplifizieren eines Abschnitts originaler DNA mittels PCR unter Verwendung des Primer-Paares, um ein PCR-Produkt oder mehrere PCR-Produkte aus der Probe und aus dem besagten einen Standard oder den besagten mehreren Standards bekannter Identität zu erzeugen;
Vergleichen des besagten einen, aus der Probe gewonnenen PCR-Produktes oder der besagten mehreren, aus der Probe gewonnenen PCR-Produkte mit einem oder mehreren PCR-Produkten des besagten einen Standards oder der besagten mehreren Standards bekannter Identität; und
Identifizieren der in der Probe vorliegenden Eimeria-Spezies.

[0037] Vorzugsweise umfasst das PCR-Primer-Paar Primer, welche die als SEQ ID NO: 25 und SEQ ID NO: 26 bezeichneten Sequenzen umfassen. Alternativ dazu umfasst das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16.

[0038] Alternativ dazu umfasst das PCR-Primer-Paar die Primer, welche die als SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 28 bezeichneten Sequenzen umfassen. Alternativ umfasst das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 oder SEQ ID NO: 23, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 oder SEQ ID NO: 24.

[0039] Vorzugsweise werden pro zu testender Probe zwei PCR durchgeführt und wobei für jede PCR ein anderes Primer-Paar verwendet wird.

[0040] Alternativ dazu wird pro zu testender Probe eine PCR durchgeführt und beide Primer-Paare innerhalb dieser einen PCR bereitgestellt.

[0041] Vorzugsweise werden das PCR-Produkt oder die PCR-Produkte, das/die aus der Probe gewonnen wurden, mit dem PCR-Produkt oder den PCR-Produkten des Standards oder der Standards bekannter Identität mittels Gel-Elektrophorese verglichen.

[0042] Vorzugsweise handelt es sich bei der Gel-Elektrophorese um DPGE. Als Alternative handelt es sich bei der Gel-Elektrophorese um SSCP. Eine weitere Alternative besteht darin, sowohl DPGE als auch SSCP einzusetzen.

[0043] Vorzugsweise wird die Gel-Elektrophorese in einem automatisierten System durchgeführt.

[0044] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines der hier beschriebenen Oligonucleotide, oder eines der anlagernden Äquivalente davon, zur Identifizierung von Eimeria-Spezies bereitgestellt.

ZEICHNUNGEN

[0045] Diese sowie weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung, die in allen ihren neuen Aspekten erwogen werden sollte, werden anhand der nachfolgenden Beschreibung ersichtlich, welche hier lediglich beispielhaft aufgeführt ist und in der auf die beiliegenden Zeichnungen Bezug genommen wird; diese Zeichnungen zeigen:

[0046] Fig. 1: E. tenella ITS-1-Sequenz (SEQ ID NO:1), amplifiziert mit dem Primer-Paar WW1 und WW3r (in Kursivschrift); die unterstrichene Sequenz stellt ITS-1 und die Sequenz in normaler Schrift das 3'-Ende der 18S-rDNA und das 5'-Ende der 5,8S-rDNA dar.

[0047] Fig. 2: E. tenella ITS-2-Sequenz (SEQ ID NO: 2), amplifiziert mit dem Primer-Paar WW2 und WW4r (dargestellt in Kursivschrift), die unterstrichene Sequenz stellt ITS-2 und die Sequenz in normaler Schrift das 3'-Ende der 5,8S-rDNA und das 5'-Ende der 28S-rDNA dar;

[0048] Fig. 3: Agarose-Gel, das ITS-1- oder ITS-2-PCR-Produkte zeigt, die für E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix; E. tenella (A, B, M, N bzw. T) stehen. Kontrollen mit Hühner-DNA und ohne DNA (C bzw. -);

[0049] Fig. 4: DPGE-Analyse von ITS-1- oder ITS-2-PCR-Produkten, amplifiziert aus mehreren Oozystenisolaten, wobei die Produkte fünf Eimeria-Spezies aus Hühnern repräsentieren, und zwar in folgender Reihenfolge: E. acervulina (Isolate A7, A2, A12 und A3), E. brunetti (Isolate B1 und B5), E. maxima (Isolate M1 und M2), E. necatrix (Isolate N1, N5 und N10) und E. tenella (Isolate T6, T5, T7, T3 und T4) (vgl. Tabelle 1);

[0050] Fig. 5: SSCP-Analyse von ITS-1- oder ITS-2-PCR-Produkten, amplifiziert aus mehreren Oozystenisolaten, wobei die Produkte fünf Eimeria-Spezies aus Hühnern repräsentieren, und zwar in folgender Reihenfolge: E. acervulina (Isolate A7, A2, A12 und A3), E. brunetti (Isolate B1 and B5), E. maxima (Isolate M1 and M2), E. necatrix (Isolate N1, N5 und N10) und E. tenella (Isolate T6, T5, T7, T3 und T4) (siehe Tabelle 1);

[0051] Fig. 6 Fähigkeit des DPGE-Verfahrens zur spezifischen Detektion mehrerer Eimeria-Spezies in Proben. Darstellung A zeigt die Detektion von Eimeria maxima in Gegenwart eines Überschusses an E. acervulina (DNA der Isolate A7 bis M1, gemischt im Verhältnis $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$ und $1:10^{-4}$) . Darstellung B zeigt die Detektion einer bestimmten Spezies (zweites Isolat) in Gegenwart (+) von 100facher Überschuss an DNA einer heterologen Spezies (erstes Isolat), für alle möglichen Kombinationen der dargestellten Spezies E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix und E. tenella, repräsentiert durch die Isolate A7, B1, M1, N1 bzw. T6 (siehe Table 1);

[0052] Fig. 7: Agarose-Gel (oben) und DPGE-Gel (unten), das ITS-2-PCR-Produkte zeigt, die aus Oozystenisolaten amplifiziert sind und sieben verschiedene Spezies von Eimeria aus Hühnern repräsentieren. Spuren: E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis, E. necatrix, E. praecox and E. tenella (A, B, M, µ, N, P bzw. T) (vgl. Fig. 3 and Fig. 4). Die dargestellten Isolate sind A7, B1, M1, µ2, N1, P4 and T6 (vgl. Tabelle 1);

[0053] Fig. 8: Chromatogramme, die fluoreszenzmarkierte ITS-2-PCR-Produkte zeigen, die aus sieben Eimeria-Spezies aus Hühnern (Spuren A, B, M, µ, N, P und T stehen für E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis, E. necatrix, E. praecox bzw. E.tenella) sowie aus drei australischen Isolaten aus Farmhühnern, welche eine Mischung von Eimeria-Spezies enthielten (Spuren X9, X15 und X7, vgl. Tabelle 2), amplifiziert wurden. Die Produkte wurden auf einem DPGE-Gel in einem automatisierten 377-DNA-Sequenzierer (Applied Biosys-

tems, USA) getrennt, und die Chromatogramme mit der GeneScan® 3.1-Software erzeugt. Bei E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix and E. tenella wurde kein merklicher Unterschied in der Anzahl und der Position der Peaks in den Chromatogrammprofilen zwischen/bei den Proben festgestellt (nicht dargestellt), allerdings wurde eine gewisse Variation in der relativen Peak-Intensität zwischen einigen Proben, die eine Spezies repräsentieren, festgestellt. Sowohl bei E. mitis and E. praecox wurden einige Unterschiede in den Positionen kleinerer Peaks, die eine Populationsvariation anzeigen, detektiert (vgl. **Fig. 9**). Zwar gab es eine gewisse Überlappung in den Profilen von E. brunetti, E. mitis und E. praecox, doch konnten speziesspezifische Chromatographie-Peaks für jede der sieben Eimeria-Spezies (Asteriske) definiert werden, wodurch die Identifizierung der in den "Farm-Isolaten" vorhandenen Spezies erleichtert wurde (Markierungen A, B, M, μ, P und T machen die Peaks kenntlich, die E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis, E. praecox bzw. E. tenella repräsentieren, vgl. Tabelle 2). Die dargestellten monospezifischen Isolate sind A7, B1, M1, μ2, N1, P4 und T6 (vgl. Tabelle 1); und

[0054] **Fig. 9**: Chromatogramme, die fluoreszenzmarkierte ITS-2-PCR-Produkte zeigen, welche amplifiziert sind aus unterschiedlichen Abstammungslinien von E. mitis und E. praecox. Die Produkte wurden auf einem DPGE-Gel in einem automatisierten 377-DNA-Sequenzierer (Applied Biosystems, USA) getrennt und die Chromatogramme mit der GeneScan®-3.1-Software generiert. Sowohl bei E. mitis als auch bei E. praecox wurde eine Variation in den Positionen kleinerer Peaks, die eine Populationsvariation anzeigt, festgestellt (vertikale Linien). Die dargestellten E. mitis-Abstammungslinien sind: Beerwah, Jorgensen, Kelly and Radlands (Isolate μ3, μ4, μ2 und μ5, vgl. Tabelle 1), und die E. praecox-Abstammungslinien sind: MCK, und ARI (Isolate P2 und P4, vgl. Tabelle 1).

BEVORZUGTE AUSFÜHRUNGSFORM

[0055] Das Folgende ist eine allgemein formulierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung bezüglich der Anwendung der hier beschriebenen neuen Oligonucleotide auf ein Verfahren zur Identifizierung von Eimeria-Spezies. Die Erfindung wird weiterhin anhand der weiter unten unter der Unterüberschrift "Experimentelle Basis der Erfindung" aufgeführten Offenbarung erläutert, in der Beispiele für die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung genannt sind.

[0056] Zwar betrifft die hier beschriebene Erfindung in erster Linie die Verwendung der neuen Oligonucleotide als Primer in gattungsspezifischen PCR, doch ist ersichtlich, dass jedes der hier beschriebenen Oligonucleotide auch in anderer Weise zur Identifizierung von Eimeria-Spezies eingesetzt werden kann.

[0057] In der vorliegenden Beschreibung ist, soweit der Kontext nichts anderes erfordert, das Wort "umfassen", sowie Varianten wie "umfasst" und "umfassend", durchweg so zu verstehen, dass sie eine angegebene Einheit oder einen angegebenen Schritt, oder eine Gruppe von Einheiten oder Schritten, umfasst, wobei aber eine andere Einheit oder ein anderer Schritt, oder eine andere Gruppe von Einheiten oder Schritten, nicht ausgeschlossen sind.

[0058] Der Begriff "Gattung", wie hier verwendet, bezeichnet einen hohen Rang in der taxonomischen Hierarchie und liegt unter der Familie und über der Spezies; "Spezies" bezieht sich hier auf einen niedrigen Rang in der taxonomischen Hierarchie, der unter der Gattungsebene liegt und die Grenze bei Organismen angibt, innerhalb der sich Organismen miteinander fortpflanzen können; und "Stamm" bezeichnet hier eine taxonomische Ebene unterhalb der Spezies-Ebene und kann eine Populationsvariation innerhalb einer Spezies anzeigen. Demgemäß handelt es sich bei den als "speziesspezifisch" bezeichneten PCR um PCR, die nur für die Amplifikation vorbestimmter DNA-Regionen einer einzigen Spezies ausgelegt sind. PCR, die als "gattungsspezifisch" bezeichnet werden, sind für die Amplifikation vorbestimmter DNA-Regionen einer Mehrzahl von Spezies, innerhalb einer bestimmten Gattung, ausgelegt.

[0059] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Fäkalproben von Hühnern so behandelt, dass die genomische DNA jedes in der Probe vorliegenden parasitären Elementes isoliert wird. Es versteht sich, dass jedes für die Isolierung genomischer DNA von Eimeria geeignete Verfahren angewandt werden kann, jedoch ist ein bevorzugtes verfahren unter der Überschrift "Experimentelle Basis der Erfindung; 1 Parasiten und Isolierung genomischer DNA" beschrieben.

[0060] Hauptsächlich wird die wie oben erwähnt isolierte DNA gemäß der Erfindung anschließend als eine Matrize (das sog. "Template") in einer PCR unter Verwendung eines der neuen erfindungsgemäßen PCR-Primer-Paare eingesetzt; WW1 (SEQ ID NO: 25) und WW3r (SEQ ID NO: 26) oder WW2 (SEQ ID NO: 27) und WW4r (SEQ ID NO: 28). Die Sequenzen jedes dieser Primer sind unter der Unterüberschrift "Experimentelle

Basis der Erfindung; 2 Enzymatische Amplifikation von rDNA" angegeben, und die Position jedes Primers in Bezug auf die ITS-1 und ITS-2 der Eimeria rDNA ist in den Fig. 1 bzw. Fig. 2 wiedergegeben. Die Primer-Paare der vorliegenden Erfindung ermöglichen die gattungsspezifische PCR-Amplifikation von Eimeria-ITS-DNA, so dass jedes Paar auf jede beliebige Probe mit vermuteten Kokzidien anwendbar ist, sowie die Identifizierung einer beliebigen Anzahl verschiedener Spezies innerhalb der Gattung Eimeria.

[0061] Erfindungsgemäß ist ein PCR-Primer (oder Oligonucleotid-Primer) ein Oligonucleotid, dass unter bestimmten PCR-Bedingungen zur spezifischen Hybridisierung an eine Region der Template-DNA in der Lage ist, wobei die Region eine Sequenz aufweist, die im Wesentlichen zu der Primer-Sequenz komplementär und so gestaltet ist, dass sie die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert. Es versteht sich, dass eine komplementäre Sequenz in der Lage ist, zusammen mit ihrem Komplement Watson-Crick-Bindungen zu bilden, wobei Paare aus Adenin mit Thymin oder aus Guanin mit Cytosin gebildet werden. Jeder Primer wird typischerweise als ein Teil eines Primer-Paares verwendet, das einen vorgelagerten 5'-Primer, der mit dem 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Templates hybridisiert, und einen nachgelagerten 3'-Primer, der mit dem Komplement des 3'-Endes der zu amplifizierenden Template-DNA hybridisiert, aufweist.

[0062] Für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der vorliegenden Erfindung ist ersichtlich, dass der Begriff "im Wesentlichen komplementär", wie hier verwendet, bedeutet, dass der Primer möglicherweise nicht 100%ig komplementär zu seiner Ziel-Template-Sequenz und trotzdem noch in der Lage ist, sich an letztere, unter geeigneten PCR-Anlagerungsbedingungen, in einer spezifischen Art und Weise anzulagern.

[0063] Die Primer gemäß der vorliegenden Erfindung können durch eine beliebige Anzahl herkömmlicher DNA-Syntheseverfahren hergestellt werden. Im vorliegenden Fall wurden die Primer von dem Hersteller GeneWorks Pty Ltd., PO Box 11, Rundle Mall, Adelaide, SA 5000, Australien käuflich erworben.

[0064] Gemäß der bevorzugten Ausführungsform wurden optimale Ergebnisse durch Verwendung von Primern erzielt, die in ihrer Länge und Sequenz mit den oben erwähnten Primern WW1 und WW3r und/oder WW2 und WW4r identisch waren. Wie für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet klar ersichtlich, können jedoch Änderungen an den Primern vorgenommen werden, ohne die Gattungsspezifität der PCR-Amplifikation und die Effizienz des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens zu vermindern.

[0065] Zum einen kann die Länge der verwendeten Primer variiert werden. Beispielsweise wird in der vorliegenden Erfindung berücksichtigt, dass kürzere Primer, die wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der Nucleotidsequenzen dieser Primer enthalten, geeignet sein können. In ähnlicher Weise können die Primer auch verlängert werden. Hierbei ist die genaue Obergrenze der Länger der Primer nicht entscheidend. Jedoch enthalten die Primer typischerweise etwa 30 Basen oder weniger, und vorzugsweise 26 Basen oder weniger. Beispielsweise wird berücksichtigt, dass der Primer WW1 um bis zu 10 Nucleotide an seinem 3'-Ende (TCT AAA GGA T), (SEQ ID NO: 3) verlängert werden kann, WW2 um bis zu 4 Nucleotide an seinem 5'-Ende (CAGC), (SEQ ID NO: 4), WW3r um bis zu 5 Nucleotide an seinem 3'-Ende (GTT TT), (SEQ ID NO: 5) oder um bis zu 10 Nucleotide an seinem 5'-Ende (ATG CGT GAG C), (SEQ ID NO:6) und WW4r um bis zu 10 Nucleotide an beiden Enden (3'-Ende, ACT GAT TTC A, (SEQ ID NO: 7) und 5'-Ende, TGA TAT GCT T, (SEQ ID NO: 8)). Zusätzlich können auch nichtkomplementäre Nucleotidfragmente an dem 5'-Ende der Primer angefügt werden, wodurch deren Länge effektiv vergrößert wird.

[0066] Zum anderen werden in der vorliegenden Erfindung kleinere Änderungen (bzw. zurückhaltende Änderungen) an der Sequenz der Primer berücksichtigt, welche die Fähigkeit zur Anlagerung an deren spezifische Ziel-DNA sowie zur anschließenden Initiierung der Verlängerung während der PCR nicht wesentlich beeinträchtigen. Beispielsweise kann jedes beliebige einzelne Nucleotid, oder eine Mehrzahl von Nucleotiden, eines Primers durch alternative Nucleotide ersetzt werden, die an der betreffenden Stelle der Änderung bei der Anlagerung des Primers an die Template-DNA während der PCR keine Watson-Crick-Basenpaarung erlauben, aber trotzdem die Fähigkeit des Primers zur Initiierung der Verlängerung während der PCR nicht wesentlich beeinträchtigen. Solche alternativen Primer können als "anlagernde Äquivalente" der hier beschriebenen Primer WW1, WW3r, WW2 oder WW4r und deren Varianten bezeichnet werden. Derartige anlagernde Äquivalente enthalten mindestens 15 Nucleotide und sind so gestaltet, dass sie sich an eine Zielsequenz unter geeigneten PCR-Anlagerungsbedingungen anlagern. Im Allgemeinen umfassen für solche anlagernden Äquivalente geeignete PCR-Anlagerungsbedingungen die Verwendung einer PCR-Reaktionsmischung oder Puffers mit 3–7 mM $MgCl_2$. Es wird erachtet, dass Anlagerungstemperaturen zwischen 45 °C und 52 °C für die meisten anlagernden Äquivalente geeignet sein können. Zur weiteren Verdeutlichung sei erwähnt, dass bei Änderung von 5 Nucleotiden innerhalb einer bestimmten Primersequenz in einer in diesem Abschnitt beschriebenen Weise und einer zentralen Verteilung dieser Änderungen entlang der Primersequenz, so sinkt die bevorzugte An-

lagarungstemperatur dieses Primers wahrscheinlich um etwa 5 °C. Der Begriff "Zielsequenz", wie in diesem Abschnitt verwendet, bezeichnet eine Sequenz, die zu mindestens 15 aufeinander folgenden Basen der Sequenz eines der Primer WW1, WW3r, WW2 oder WW4r komplementär ist.

[0067] Es ist ersichtlich, dass die Nützlichkeit von alternativen Sätzen von Primern gemäß der vorliegenden Erfindung, welche um die erfindungsgemäßen Primer WW1 und WW3r, und/oder WW2 und WW4r entworfen wurden, zumindest theoretisch, mittels geeigneter Software und der DNA-Sequenz-Information bezüglich der ITS-1- und ITS-2- und flankierender Regionen bewertet werden kann. Zu derartigen Software-Paketen zählen z.B. PC Oligo5 (National Bioscience Inc) oder Amplify (University of Wisconsin).

[0068] Beispiele für Variationen der Primer WW1, WW3r, WW2 und WW4r, die für die vorliegende Erfindung geeignet sein können, sind:

Tabelle 1A:

Variationen von WW1 (5'-3')	Variationen von WW3r (5'-3')
AGTTGCGTAAATAGAGCCC (SEQ ID NO: 9)	AAGACATCCATTGCTGAAA (SEQ ID NO: 10)
AAGTTGCGTAAAAG AGCC (SEQ ID NO: 11)	CAAGACATCCATTGC TGAA (SEQ ID NO: 12)
AAGTTGCGTAAATAGAGC (SEQ ID NO: 13)	CAAGACATCCATTGCTGA (SEQ ID NO: 14)
TTGCGTAAATAGAGCCC (SEQ ID NO: 15)	GACATCCATTGCTGAAA (SEQ ID NO: 16)

Variationen von WW2 (5'-3')	Variationen von WW4r (5'-3')
CGTCTGTTTCAGTGTCT (SEQ ID NO: 17)	AATTCAGCGGGTAACCTCG (SEQ ID NO: 18)
ACGTCTGTTTCAGTGTC (SEQ ID NO: 19)	AAATTCAGCGGGTAACCTC (SEQ ID NO: 20)
ACGTCTGTTTCAGTG CT (SEQ ID NO: 21)	AAATTCAGCGGGTAACCT (SEQ ID NO: 22)
GTCTGTTTCAGTGTCT (SEQ ID NO: 23)	TTCAGCGGGTAACCTCG (SEQ ID NO: 24)

[0069] Zwar wurden die hier offenbarten neuen Oligonucleotide oder Primer und deren Varianten entwickelt, um die gattungsspezifische PCR-Amplifikation von ITS-1- und ITS-2-Regionen zu ermöglichen, doch ist ersichtlich, dass sie ebenfalls, entweder einzeln oder kombiniert, für verschiedene andere Anwendungen geeignet sind. So können sie beispielsweise als molekulare Sonden oder Primer für andere Diagnoseverfahren (wie z.B. LCR, Ligase-Kettenreaktion, oder quantitative PCR) eingesetzt werden. Für den Fachmann auf dem Gebiet ist es leicht ersichtlich, mit welchen Mitteln solche Anwendungen unter Verwendung von Standardverfahren des Standes der Technik realisiert werden können.

[0070] Im Allgemeinen ist lediglich eine PCR, unter Verwendung eines einzigen Primer-Satzes, erforderlich, um die in einer Probe vorliegenden Eimeria-Spezies zu identifizieren. Jedoch ist ersichtlich, dass gegebenenfalls eine parallele PCR unter Verwendung des zweiten Primer-Satzes, durchgeführt werden kann, um eine weitere Klärung der Identität einer in einer Probe vorliegenden Spezies zu erreichen. In ähnlicher Weise können bei einer Optimierung der PCR-Bedingungen beide neuen Primer-Sätze in einer einzigen PCR verwendet werden.

[0071] Zur anschließenden Detektion der PCR-Produkte werden die Primer vorzugsweise mit [γ-^{33}P]ATP endmarkiert. Alternativ hierzu können andere Mittel zur Markierung der PCR-Produkte eingesetzt werden; bei-

spielsweise die Einfügung von [α-^{32}P]dNTP während der PCR-Amplifikation. Mit größerem Vorzug können nichtradioaktive Markierungssysteme, unter Verwendung von Digoxygenin, Biotin und dergleichen, verwendet werden. Derartige nichtradioaktive Markierungssysteme sind im Stand der Technik wohlbekannt und können dementsprechend von einem Durchschnittsfachmann ohne Schwierigkeiten angewendet werden. Ein Beispiel hierfür ist jedoch unter der Überschrift "Experimentelle Basis der Erfindung – 7 Beispiel für die Verwendung einer fluoreszenzbasierten Elektrophorese-Detektion" aufgeführt. Es ist ersichtlich, dass die nichtradioaktive Markierung zur Endmarkierung eines bestimmten Primers verwendet oder dass sie in den Primer und/oder das PCR-Produkt eingearbeitet werden kann.

[0072] Jede PCR wird mit wenigstens einer monospezifischen Kontrollprobe oder einem Standard bekannter Speziesidentität durchgeführt. Wie ersichtlich, können Kontrollproben, die mehr als eine bekannte Spezies enthalten, verwendet werden. Negativ-Kontrollen, die keine Eimeria-Template-DNA enthalten, werden ebenfalls mit den Proben verglichen. Es ist ersichtlich, dass andere Standardkontrollen, welche routinemäßig im Stand der Technik eingesetzt werden, ebenfalls mit den Proben verglichen werden können.

[0073] Die genomische Eimeria-DNA der Kontrolle oder der Standards mit bekannten Eimeria-Arten kann in ähnlicher weise wie die genomische DNA unbekannter Proben gereinigt werden. Zu diesem Zweck können beispielsweise die von Medichick Laboratories (Australien) oder Animal Research Institute des Queensland Department of Primery Industries (Australien) erhältlichen Laborlinien von Eimeria-Spezies bekannter Identität Verwendung finden.

[0074] Die Amplifikation wird gemäß Verfahrensabläufen durchgeführt, welche herkömmlicher Weise auf dem technischen Gebiet, auf das sich diese Erfindung bezieht, verwendet werden; Beispiele hierfür sind in dem US-Patent 4,683,202 beschrieben. Vorzugsweise enthalten Standard-PCR gemäß der vorliegenden Erfindung 0,1 μM–1 μM jedes Primers, 200 μM jedes dNTP, 3–7 mM $MgCl_2$ und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Promega). Typischerweise ist jede PCR mit einem Mineralöl oder dergleichen bedeckt, um ein Verdampfen der Reaktionsmischung während des Zyklierens zu verhindern. Die PCR-Zyklen laufen vorzugsweise unter den folgenden Bedingungen ab: Denaturierung bei einer Temperatur von 94 °C für etwa 15 bis 30 Sekunden, Anlagern ("Annealing") bei einer Temperatur von 45 °C bis 60 °C für 15 bis 30 Sekunden und Verlängerung ("Extension") bei einer Temperatur von 72 °C für 15 bis 30 Sekunden. Vorzugsweise werden 30 bis 35 Zyklen durchgeführt. Insbesondere können die folgenden PCR-Bedingungen für die bevorzugten Primerpaare, WW1 und WW3r, sowie WW2 und WW4r, der Erfindung geeignet sein:

Denaturierung	Anlagerung ("Annealing")	Verlängerung ("Extension")	Zyklen
94 °C, 30 s	45 °C, 30 s	72 °C, 30 s	30
94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 30 s	30
94 °C, 30 s	60 °C, 30 s	72 °C, 30 s	30
94 °C, 15 s	60 °C, 15 s	72 °C, 30 s	30

[0075] Wie für den Durchschnittsfachmann auf diesem Gebiet ersichtlich, sind die hierin genannten PCR-Bedingungen lediglich als Beispiele aufgeführt und können variiert werden, um die Bedingungen beispielsweise für solche Fälle, in denen alternative PCR-Zyklierer oder DNA-Polymerasen eingesetzt werden, die Template-DNA in einer anderen Qualität vorliegt oder in denen Primer-Varianten, die hier nicht spezifisch aufgeführt sind, verwendet werden, zu optimieren, ohne dabei den Schutzumfang der vorliegenden Erfindung zu verlassen. Die PCR-Bedingungen können beispielsweise durch Änderung der Konzentration der verschiedenen Komponenten in der Reaktion und/oder durch Änderung der Komponenten der Reaktion, Ändern der Anzahl der Amplifikationszyklen, der Denaturierungs-, Anlagerungs- oder Verlängerungszeiten oder -temperaturen oder der Menge der Template-DNA verändert oder optimiert werden. Für den Fachmann ist ersichtlich, dass es auch eine Reihe von anderen Möglichkeiten gibt, um die PCR-Bedingungen zu optimieren und somit die Variabilität zwischen den Reaktionen zu überwinden. Die PCR-Bedingungen können durch eine Routine-Analyse auf der Basis der oben genannten Faktoren, welche im Stand der Technik wohl bekannt sind, optimiert werden.

[0076] Wie ersichtlich können geeignete PCR-Anlagerungstemperaturen für einen jeglichen Primer, der im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung liegt, falls in dieser Beschreibung nicht im Einzelnen aufgeführt, aus

der berechneten Schmelztemperatur des betreffenden Primers hergeleitet werden. Solche Schmelztemperaturen können unter Anwendung von Standardformeln, wie die in Sambrook, 1989, beschriebene, berechnet werden. Es versteht sich für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, dass die Anlagerungstemperaturen über oder unter den Schmelztemperaturen liegen können, jedoch ist im Allgemeinen eine Anlagerungstemperatur, die etwa 5 °C über der errechneten Schmelztemperatur des Primers liegt, geeignet.

[0077] PCR-Produkte, die durch Amplifikation von ITS-1- und ITS-2-Regionen sowohl von unbekannten Proben als auch von relevanten Kontrollproben oder Standards bekannter Identität erhalten wurden, können mittels elektrophoretischer Trennung detektiert werden. Elektrophorese-Verfahren, die für geringfügige Unterschiede in der Größe von PCR-Produkten und/oder in deren Sequenz empfindlich sind, sind bevorzugt. Besonders geeignet sind bei optimierten Bedingungen beispielsweise die Yerfahren der SSCP ("single-strand conformation polymorphism") und/oder DPGE ("denaturing polyacrylamide gel electrophoresis"), da man mit ihnen in der Lage ist, zwischen den untersuchten Proben Unterschiede bezüglich einer einzelnen Base in der Sequenz oder die Veränderung der Länge durch ein einziges Nucleotid zu detektieren. Außerdem sind diese Verfahren gut für das Screening von großen Probenzahlen geeignet.

[0078] Die SSCP-Analyse ist bereits beschrieben worden (Orita et al, 1989). Im Allgemeinen kann jedes PCR-Produkt als Einzelstrang-Moleküle durch Elektrophorese in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt werden. Die Technik basiert auf der Tatsache, dass sich ein Einzelstrang-DNA-Molekül anders faltet als ein anderes Einzelstrang-DNA-Molekül, wenn sich seine Sequenz in einer einzelnen Base oder in mehreren Basen unterscheidet; Unterschiede in der Tertiärstruktur führen zu Unterschieden in der Mobilität während der Elektrophorese.

[0079] Für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, versteht sich, dass sich die Tertiärstruktur einer Einzelstrang-DNA unter unterschiedlichen physikalischen Bedingungen, z.B. Temperatur und Ionenumgebung, verändert. Folglich hängt die Empfindlichkeit der SSCP von diesen wie auch von vielen anderen Bedingungen ab, wie etwa der Länge des PCR-Produktes. Im Falle der vorliegenden Erfindung hat sich herausgestellt, dass die folgenden Bedingungen bevorzugt sind, allerdings versteht sich, dass diese Bedingungen geändert werden können, um unterschiedliche Laborbedingungen und -ausrüstung zu berücksichtigen: 0,4 bis 0,6× MDE ("mutation detection enhancement"; FMC BioProducts), enthaltend 0,5 bis 1,5× TBE, und Elektrophorese bei 7 bis 40 W für etwa 17 h bei 15 °C. Insbesondere können die folgenden Bedingungen mit der Erfindung angewendet werden:

Gel	Leistung (W)	Zeit (h)	Temperatur (°C)
0,5xMDE, enthaltend 0,6xTBE	7	17	15
0,4xMDE, enthaltend 0,6xTBE	7	17	15
0,6xMDE, enthaltend 0,6xTBE	20	17	15
0,6xMDE, enthaltend 0,6xTBE	30	17	15
0,6xMDE, enthaltend 0,6xTBE	40	17	15
0,6xMDE, enthaltend 0,5xTBE	20	17	15
0,6xMDE, enthaltend 1,0xTBE	30	17	15
0,6xMDE, enthaltend 1,5xTBE	40	17	15

[0080] DPGE ist bereits beschrieben worden und auf dem Gebiet, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, wohlbekannt. Bei der DPGE wird jeder Strang eines DNA-Moleküls von seinem komplementären Strang getrennt und unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel laufen gelassen. Unter solchen Bedingungen werden die beiden Stränge eines beliebigen DNA-Moleküls daran gehindert, während der Elektrophorese wieder miteinander zu hybridisieren, so dass die einzelnen Stränge getrennt voneinander innerhalb des Gels wandern. DPGE ist ein empfindliches System, das in der Lage ist, Unterschiede in der Länge von zwei beliebigen DNA-Molekülen zu identifizieren, bis hin zu einem Unterschied von einem einzigen Nucleotid.

[0081] Für die DPGE ist die folgende Bandbreite von Bedingungen bevorzugt, allerdings können diese, wie im Falle der SSCP, geändert werden, um eine Vielzahl anderer Laborvariablen zu berücksichtigen, ohne dabei

den Schutzumfang der vorliegenden Erfindung zu verlassen: 0,4 mm dickes Gel aus 4 bis 6 Polyacrylamid, das 42 % Harnstoff und 1×TBE enthält und einer Elektrophorese bei 20 bis 50 W für etwa 4 h bei 40 °C unterzogen wird. Insbesondere können die folgenden Bedingungen in der vorliegenden Erfindung zum Einsatz kommen:

Gel (Polyacrylamid)	Leistung (W)	Zeit (h)	Temperatur (°C)
0,4 mm dick (6 %), enthaltend 42 % Harnstoff und 1xTBE	40	4	40
0,4 mm dick (4 %), enthaltend 42 % Harnstoff und 1xTBE	40	4	40
0,4 mm dick (5,5 %), enthaltend 42 % Harnstoff und 1xTBE	40	4	40
0,4 mm dick (5 %), enthaltend 42 % Harnstoff und 1xTBE	20	4	40
0,4 mm dick (5 %), enthaltend 42 % Harnstoff und 1xTBE	30	4	40
0,4 mm dick (5 %), enthaltend 42 % Harnstoff und 1xTBE	50	4	40

[0082] Es ist zu beachten, dass DPGE für die Identifizierung von Spezies bevorzugt ist, während SSCP für die Detektion von Populationsvariationen innerhalb einer Spezies bevorzugt wird, obwohl beide Verfahren für die Identifizierung von Spezies geeignet sind. Es versteht sich daher, dass entweder SSCP oder DPGE alleine angewendet werden können, um Eimeria-Spezies zu identifizieren oder diagnostizieren. Jedoch umfasst die vorliegende Erfindung auch die parallele Anwendung beider Techniken, um zu einem besseren Verständnis der Identität der in einer bestimmten Probe enthaltenen Eimeria-Spezies zu gelangen. In ähnlicher Weise umfasst die vorliegende Erfindung die Anwendung anderer komplementärer Verfahren wie beispielsweise die Agarosegelelektrophorese und die DNA-Sequenzierung.

[0083] Nach der Trennung der PCR-Produkte mittels Elektrophorese können die Gele gemäß Standardverfahren (z.B. im Falle von Polyacrylamidgelen Trocknen auf Filter- oder Löschpapier) behandelt und über einen Zeitraum der ausreicht, um die Position der PCR-Produkt-Banden auf einem Gel zeigen zu können, einer Autoradiographie unterzogen werden.

[0084] Die Methodik der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise auf ein automatisiertes (fluoreszenzbasiertes) elektrophoretisches System ausgerichtet; beispielsweise ein automatisierter Sequenzierer der Fa. Applied Biosystems (ABI), verbunden mit einer geeigneten Computerhardware und -software. Auf diese Weise können spezifische "Fingerabdrücke" einzelner Eimeria-Spezies aufgenommen, gespeichert (für Protokolle und Berichte) und mit Standardproben mit bekanntem Spezies-Status verglichen werden. Solche elektrophoretischen Verfahren sind Standardverfahren, die vom Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet üblicher Weise angewendet und verstanden werden. Ein spezifisches Beispiel für ein solches System ist jedoch in dieser Beschreibung unter der Überschrift "Experimentelle Basis der Erfindung – 7 Beispiel für die Anwendung der fluoreszenzbasierten Elektrophorese-Detektion".

[0085] Es ist ersichtlich, dass falls mit der vorliegenden Erfindung ein automatisiertes System eingesetzt wird, die Standardbedingungen, die im Allgemeinen für die, manuelle SSCP und DPGE, wie sie in dieser Beschreibung beschrieben und erläutert sind, gelten, möglicherweise geändert werden müssen, um dem verwendeten automatisierten System Rechnung zu tragen. Die geeigneten Bedingungen können leicht anhand der Anleitung des Herstellers und dementsprechenden üblichen Optimierungstests, wie sie gewöhnlich im Stand der Technik Anwendung finden, bestimmt werden.

Experimentelle Basis der Erfindung

1 Parasiten und Isolierung genomischer DNA

[0086] Australische Isolate von Eimeria (die monospezifische Linien repräsentieren; Tabelle 1) wurden in

Hühnern, die frei von spezifischen Pathogenen (SPF) waren, passiert; die Hühner wurden in speziell angefertigten Isolatoren unter stringenten Bedingungen gehalten, um eine Kreuzkontamination zu verhindern. Die Identifikation der in den Isolaten vorhandenen Spezies erfolgte auf der Basis der Morphometrie sporulierter Oozysten, der Präpatentperiode und der Lage großer Läsionen im Darm/den Därmen. Um putative Kontamination von Isolaten mit einer oder mehreren heterologen Spezies auszuschließen, wurde das 18S-rRNA-Gen, das ebenfalls eine Identifizierung auf Spezies-Ebene erlaubt (Barta et al., 1997), aus PCR-Produkten, die aus ausgewählten Oozysten hergeleitet wurden (siehe 4 unten), sequenziert. Die für einzelne Spezies bestimmten 18S-Sequenzen waren zu 99–100 % mit den jüngst von anderen Wissenschaftlern (Barta et al., 1997) veröffentlichten Sequenzen identisch.

[0087] Für jedes Isolat wurde Kot von Gruppen von Hühnern gesammelt, und man ließ die Eimeria-Oozysten unter ständiger Belüftung bei 30 °C für mindestens 48 h sporulieren. Die Oozysten wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (Shirley et al, 1995) isoliert, ausgiebig in 50 ml Volumina H_2O gewaschen und es wurde letztendlich eine wässrige Suspension (10 ml, enthaltend 5×10^6 Oozysten) hergestellt. Die Oozysten wurden sodann unter Verwendung eines Sucrose-Gradienten-Zentrifugationsverfahrens (Gasser et al, 1987) gereinigt, wodurch PCR-inhibierende Fäzes-Bestandteile beseitigt wurden, gewaschen (wie oben angegeben) und dann in 1 ml H_2O resuspendiert. DNA wurde aus den Oozysten unter Verwendung eines Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA) isoliert. Kurz gesagt, wurde jede wässrige Suspension von Oozysten in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen übertragen, bei 13000 g 5 min lang zentrifugiert und in 300 µl Nuclei Lysis Solution (Promega, WI, USA) resuspendiert. Das gleiche Volumen Glasperlen (2 mm Durchmesser) wurde hinzugefügt und das Röhrchen 3–5 min lang stark gevortext, bis > 90 der Oozysten aufgebrochen waren (ermittelt durch lichtmikroskopische Untersuchung winzig kleiner Subaliquote bei 400facher Vergrößerung). Die Sporozysten enthaltende Suspension wurde dann in neue Eppendorf-Röhrchen transferiert, die Glaskügelchen entfernt, Proteinase K (150 µg ml^{-1}) und Natriumdodecylsulfat (5 % Gew./Vol.) hinzugegeben, anschließend wurde bei 37 °C inkubiert, bis > 90 % der Sporozysten aufgebrochen waren (~4 h). Dieses Lysat wurde dann bei 13000 g 5 min lang zentrifugiert, um die Oozysten- und Sporozystenwände zu pelletieren, und der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert. Die DMA wurde aus dem Überstand gemäß "yeast DNA protocol" (Promega) herausgereinigt und in 50 µl H_2O eluiert. Die einzelne Proben wurden auf mit Ethidiumbromid eingefärbten 2%igen Agarose-Tris-Borat-EDTA-Gelen (TBE = 65 mM Tris-HCl, 27 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 9; Bio-Rad, Richmond, CA, USA) geprüft, und zwar unter Verwendung spezifischer Verdünnungen von γ-Phage-DNA (Promega, WI, US) als Längenstandard, die auch zur annähernden Bestimmung der DNA-Konzentrationen verwendet wurden. Die Mengen der genomischen DNA, die aus den einzelnen Isolaten (+ 5×10^6 Oozysten) isoliert wurden, wurden auf 1–2,5 µg geschätzt.

Tabelle 1. Isolate, die unterschiedliche Eimeria-Spezies repräsentieren. Alle Isolate wurden von Hühnerherden in Australien gewonnen und wurden als monospezifische Linien gehalten. Die MCK-Linien wurden von Medichick Laboratories (Australien) gestellt; die anderen wurden vom Animal Research Institute des Queensland Department of Primery Industries (Australien) erhalten.

Isolate	Spezies	Beschreibung und geographische Herkunft in Australien
A7	*E. acervulina*	Attenuierte RA-Linie gewonnen aus einer Herde in Queensland [11]
A2	*E. acervulina*	6. Passage von A7
A12	*E. acervulina*	15 Jahre alte Laborlinie (MCK), gewonnen aus einer Herde in Victoria
A3	*E. acervulina*	1. Passage von A12
B1	*E. brunetti*	Attenuierte Linie (AM), gewonnen aus einer Herde in Queensland
B5	*E. brunetti*	5. Passage von B1
M1	*E. maxima*	15 Jahre alte Laborlinie (MCK), gewonnen aus einer Herde in Victoria
M2	*E. maxima*	2. Passage von M1
µ2	*E. mitis*	Kelly-Linie, gewonnen aus einer Herde in Queensland
µ3	*E. mitis*	Beerwah-Linie, gewonnen aus einer Herde in Queensland
µ4	*E. mitis*	Jorgensen-Linie, gewonnen aus einer Herde in Queensland
µ5	*E. mitis*	Redlands-Linie, gewonnen aus einer Herde in Queensland
N1	*E. necatrix*	15 Jahre alte Laborlinie (MCK), gewonnen aus einer Herde in Victoria
N5	*E. necatrix*	2. Passage von N1
N10	*E. necatrix*	8. Passage des attenuierten Derivats von N1
P2	*E. praecox*	MCK-Linie, gewonnen aus einer Herde in Victoria
P4	*E. praecox*	ARI-Linie, gewonnen aus einer Herde in Queensland
T6	*E. tenella*	Feldisolat (DARRYL) aus Queensland
T5	*E. tenella*	4. Passage von T6
T7	*E. tenella*	Attenuierte Laborlinie (Rt3+15)
T3	*E. tenella*	4. Passage von T7
T4	*E. tenella*	15 Jahre alte Laborlinie (MCK), gewonnen aus einer Herde in Victoria

2 Enzymatische Amplifikation von rDNA

[0088] Oligonucleotid-Primer wurden entsprechend den Bereichen der 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA-Gensequenzen, die als für die Gattung Eimeria spezifisch erachtet werden, entworfen. Die ITS-1 (plus die flankierende Sequenz) wurde durch PCR unter Verwendung der Primer WW1 (vorwärts: 5'-AAG TTG CGT AAA TAG AGC CC-3') und WW3r (rückwärts: 5'-CAA GAC ATC CAT TGC TGA AA-3') amplifiziert, während ITS-2 unter Verwendung der Primer WW2 (vorwärts: 5'-ACG TCT GTT TCA GTG TCT-3') und WW4r (rückwärts: 5'-AAA TTC AGC GGG TAA CCT CG-3') amplifiziert wurde. Das 18S-Gen wurde unter Verwendung der Primer WW5 (5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA G-3'), (SEQ ID NO: 29), und WW6r (5'-CTT CCG CAG GTT CAC CTA

CGG-3'), (SEQ ID NO: 30) amplifiziert. Die für die Amplifikation von ITS-1 oder ITS-2 verwendeten Primer wurden endmarkiert mit [γ-^{33}P]ATP (NEN Life Science Products), und zwar unter Verwendung von T4-Polynucleotidkinase gemäß dem Protokoll des Herstellers (Promega, WI, USA). PCR-Reaktionen erfolgten in 30 µl-Volumina unter Verwendung von ~50 ng Template-DNA, 50 pmol Primer, jeweils 200 µM dNTP, 7 mM $MgCl_2$ (für ITS-1) oder 3 mM $MgCl_2$ (für ITS-2) und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Promega, WI, USA) unter den folgenden Thermocyclierungsbedingungen: 94 °C, 30 s (Denaturierung); 55 °C, 30 s (Anlagerung); 72 °C, 30 s (Verlängerung) für 30 Zyklen in einem DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, USA). Kontrollproben ohne DNA liefen in jedem PCR-Durchlauf mit. Außerdem wurde die Spezifität der PCR für beide Primer-Sätze getestet, wobei DNA (~100 ng) von Hühnermuskulatur und -Kot (von denen bekannt war, dass sie keine Eimeria enthielten) verwendet wurden, und nach 24stündiger Autoradiographie von DPGE-Gelen wurden in keiner dieser Kontrollproben PCR-Produkte detektiert.

[0089] Die einzelnen PCR-Produkte wurden mit einem gleich großen Volumen Auftragspuffer (10 mM NaOH, 95 % Formamid, 0,05 % Bromophenolblau und 0,05 % Xylencyanol) gemischt und ihre Intensität wurde auf mit Ethidiumbromid gefärbten 2,5 % Agarose-TBE-Gelen, unter Verwendung einer 100 bp-Leiter (Promega, WI, USA) als Größen-Marker, verifiziert. Die kleinste Menge Eimeria-DNA, welche für eine effiziente Amplifikation (für beide Primer-Sätze) und für die visuelle Detektion auf Agarose-Gelen erforderlich war, betrug ~5 pg (dies entsprach ~5–50 Oozysten), was mit früheren Studien (Stucki et al, 1993; Schnitzler et al, 1998; Molloy et al, 1998) vergleichbar ist.

3 Hochauflösende Elektrophorese

[0090] PCR-Produkte wurden bei 95 °C 5 min lang denaturiert und auf einem Gefrierblock (–20 °C) 2 min lang abgeschreckt, bevor sie auf die Gele aufgetragen wurden. Für die DPGE wurden 5 µl jeder Probe in die Löcher eines 0,4 mm-dicken 5%igen Polyacrylamidgels eingetragen, das 42 % Harnstoff und 1 × TBE enthielt, und bei 40 W für 4 h bei 40 °C einer Elektrophorese unterzogen. Für den Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) wurden 3µl jeder Probe in die Löcher eines 0,4 mm-dicken nichtdenaturierenden Gels (0,6 × MDE™, mutation detection enhancement; FMC BioProducts, Rockland, ME, USA), das 0,6 × TBE enthielt, eingetragen, und die Elektrophorese wurde bei 7 W für 17 h bei 15 °C durchgeführt. Die Optimierung erfolgte wie zuvor beschrieben (Zhu und Gasser, 1998). Beide elektrophoretischen Verfahren wurden in einer herkömmlichen Sequenziervorrichtung (BaseRunner; IBI, New Haven, CT, USA) durchgeführt. Die Gele wurden auf Löschpapier getrocknet und unter Verwendung von RP1-Film (Agfa) einer Autoradiographie unterzogen.

4 DNA-Sequenzierung

[0091] Die PCR-Produkte wurden über Wizard® PCR Preps-Säulen (Promega, WI, USA) gereinigt und in 40 µl H_2O eluiert. Zur Sequenzierung des 18S-rRNA-Gens wurde ein Aliquot (1 µl) unmittelbar der Zyklus-Sequenzierung mit dem fmol® DNA Cycle Sequencing System (Promega, WI, USA) unterzogen, und zwar unter Verwendung der gleichen Primer wie für die PCR und einer Anlagerungstemperatur von 55 °C. Zur Sequenzierung von ITS-1, wurde ein Aliquot eines säulengereinigten PCR-Produktes (100 ng) in den pGEM®-T-Plasmid-Vektor (Promega, WI, USA) geklont, und 12 Klone (pro PCR-Produkt) wurden für die Zyklus-Sequenzierung isoliert.

5 Ergebnisse

[0092] Auf den Agarose-Gelen (**Fig. 3**) variierten die Größen der ITS-1-PCR-Produkte von ~450–770 bp, während die Größen der ITS-2-Produkte ~370–620 bp betrug (Tabelle 2). Sowohl für ITS-1 als auch ITS-2 hatte jede Spezies eine eigene Bandengröße/eigene Bandengrößen, da zwischen oder bei der Mehrzahl an Isolaten keine intraspezifische Variation in den Bandenprofilen detektiert wurde. Für die ITS-I-PCR-Produkte wurde eine Bande für E. acervulina und E. tenella detektiert, während 2–3 Banden für die übrigen 3 Spezies (Tabelle 2) aufgelöst wurden (Tabelle 2). Für die ITS-2-PCR-Produkte wurde eine Bande für E. tenella detektiert, während 2 Banden für alle anderen Spezies erschienen (Tabelle 2). Die Auflösung von mehreren ITS-Banden auf Agarose-Gelen für einige Spezies wies auf die Existenz unterschiedlicher Sequenztypen innerhalb eines PCR-Produktes hin. Dies wurde bestätigt durch Sequenzierung (durch Klonieren) der ITS-1-PCR-Produkte für ausgewählte Proben, welche jede der Spezies (A7, B1, M1, N1 und T6, Tabelle 1) repräsentierten, sowie durch den Vergleich mit zuvor veröffentlichten Sequenzen (Schnitzler et al, 1998; Schnitzler et al, 1999; Barta et al, 1998). Die Sequenzierung (von 12 Klonen pro Spezies) zeigte, dass einzelne ITS-I-PCR-Produkte die richtigen Spezies repräsentierten, obwohl neue ITS-1-Sequenztypen (nicht dargestellt) für E. brunetti, E. maxima und E. necatrix detektiert wurden.

[0093] DPGE und SSCP wurden dann bezüglich ihrer Fähigkeit zur Anzeige von Größen- oder Sequenzvariationen bei denaturierten PCR-Produkten evaluiert. Beide Techniken erlaubten die unzweideutige Identifizierung aller Eimeria-Spezies unter Verwendung von ITS-1- und/oder ITS-2-PCR-Produkten (Fig. 4 und Fig. 5). Für DPGE (Fig. 4) waren die Bandenprofile relativ einfach – jedes bestand aus 2–5 Einzelstrangbanden, wobei keine Unterschiede in der Anzahl oder der Größe/den Größen der Banden zwischen der Mehrzahl an Isolaten derselben Spezies entdeckt wurden. Wie aufgrund der Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese erwartet (Tabelle 2), wurden keine Banden, die eine bestimmte Spezies repräsentierten, mit den heterologen Spezies geteilt. Zwar waren die ITS-1-Bandenprofile für E. acervulina und E. brunetti einander ähnlich, doch konnten diese beiden Spezies leichter voneinander unterschieden werden, wenn ITS-2 verwendet wurde. Umgekehrt konnten E. necatrix und E. tenella leichter unterschieden werden, wenn das ITS-1- anstelle des ITS-2-Profils verwendet wurde. Für SSCP (Fig. 5) waren die Bandenprofile relativ komplex, wobei jede Bande aus ~6–15 Einzelstrangbanden (abhängig von der ITS-Region und der Spezies) bestand. Die komplexen Profile sind das Ergebnis der Bildung mehrerer konformativer Typen eines Einzelstrangmoleküls oder von Einzelstrangmolekülen. Bei mehreren Isolaten, welche dieselbe Laborlinie für jede der fünf Spezies repräsentierten, wurde keine Variation der ITS-1- oder der ITS-2-Profile nachgewiesen (vgl. Tabelle 1). In ähnlicher Weise wurden keine Unterschiede bei mehreren verschiedenen Laborlinien sowohl für E. necatrix wie auch für E. tenella detektiert. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Unterschied bei den ITS-1- und ITS-2-Profilen zwischen den Isolaten festgestellt, die die RA- und MCK-Linien von E. acervulina repräsentierten; dieser Unterschied blieb bei der DPGE (Fig. 1; Spuren A7 und A2 versus Spuren A12 und A3) unentdeckt. Dieser Unterschied bezog sich auf den Polymorphismus (oder ~1 %-Unterschied) bei den ITS-1- als auch den ITS-2-Sequenzen zwischen diesen Laborlinien (nicht veröffentlicht).

[0094] Die in Fig. 7 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die Wirksamkeit der Anwendung eines DPGE-Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung.

Tabelle 2. Anzahl und ungefähre Größen von ITS-1- und ITS-2-PCR-Produkten von Eimeria-Spezies

[0095] Die Größen wurden in 2,5%iger Agarose in 0,5 × TBE durch Vergleich mit bekannten Größenstandards bestimmt. Die PCR-Produkt-Größen wurden unter Verwendung einer Formel interpoliert, die durch lineare Regression von Molekulargewichtsstandards, verglichen mit dem log ihrer Laufstrecken, hergeleitet wurde.

ITS-1

Spezies	Anzahl der Banden	Ungefähre Bandengrößen (bp)
E. acervulina	1	520
E. brunetti	2	530, 580
E. maxima	3	450, 560, 610
E. necatrix	3	630, 715, 770
E. tenella	1	700

ITS-2

Spezies	Anzahl der Banden	Ungefähre Bandengrößen (bp)
E. acervulina	2	440, 490
E. brunetti	2	470, 550
E. maxima	2	370, 420
E. necatrix	2	590, 620
E. tenella	1	580

6 Spezifität des Tests – mehrere Eimeria-Spezies pro Probe

[0096] Da Hühner, die mit Eimeria auf natürliche Weise in Kontakt kommen, gleichzeitig mehr als eine Spezies von Eimeria (McDougald et al, 1997) beherbergen können, ist es wichtig, die Fähigkeit des Verfahrens zur spezifischen Detektion von DNA in Proben, die mehr als eine Spezies enthalten, zu ermitteln. Dies wurde unter Verwendung von ITS-2 als Beispiel untersucht. 20 ng der genomischen DNA jeder Spezies wurden versetzt

mit: 2 ng, 200 pg, 20 pg oder 2 pg der DNA einer heterologen Spezies (in Verhältnissen von $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$ oder $1:10^{-4}$). Die Mischungen der Template-DNA wurden dann einer PCR unterzogen, die PCR-Produkte wurden mittels DPGE analysiert und ein Autoradiographiefilm mit den Gelen belichtet (96 h). Als Beispiel sind die Ergebnisse für E. acervulina in Mischung, in unterschiedlichen Verhältnissen, mit E. maxima in **Fig.** 6A dargestellt. Bei einem Template-Verhältnis von $1:10^{-4}$ wurde eine Bande, welche die erste Spezies repräsentiert, detektiert, während bei Verwendung eines Template-Verhältnisses von $1:10^{-3}$ bei den meisten Proben schwache Banden festgestellt wurden, die die zweite Spezies repräsentierten (nicht alle Ergebnisse dargestellt). Bei einem Verdünriungsverhältnis von $1:10^{-2}$ wurde die bei der unteren Konzentration der genomischen DNA vorliegende Spezies bei allen Kombinationen (**Fig.** 6B) detektiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass die DNA einer bestimmten Spezies durch PCR detektiert werden konnte, und zwar auch bei Vorliegen eines Überschusses (das 100–1000fache der Menge) an Template-DNA einer heterologen Spezies. Außerdem wurde die DPGE von ITS-2 (in einem Blind-Test) zur korrekten Identifizierung aller Spezies, die in gemischten Oozysten-Isolaten vorlagen, verwendet, wodurch gezeigt wurde, dass dieses Verfahren für den Nachweis von Infektionen mit mehreren Spezies bei Hühnern nützlich ist.

7. Beispiel für die Verwendung von fluoreszenzbasierter elektrophoretischer Detektion

[0097] Man ließ Eimeria-Oozysten in Kotproben unter konstanter Belüftung bei 30 °C mindestens 48 h sporulieren. Anschließend wurden sie mit gesättigter NaCl (Shirley, 1995) isoliert, ausgiebig in 50 ml-Volumina H_2O gewaschen, und letztendlich wurde eine wässrige Suspension (10 ml, enthaltend 5×10^6 Oozysten) hergestellt. Die Oozysten wurden dann über einem Sucrose-Gradienten (Gasser et al., 1978) auf gereinigt, wodurch PCR-inhibierende Kotbestandteile entfernt wurden, gewaschen und dann in 0,5 ml H_2O resuspendiert. Das gleiche Volumen an Glasperlen (2 mm Durchmesser) wurde hinzugegeben und die Mischung kräftig für 3–5 min gemischt, bis > 90 der Oozysten aufgebrochen waren (ermittelt durch lichtmikroskopische Untersuchung bei 400facher Vergrößerung). Die Sporozysten enthaltende Suspension wurde dann in ein neues Eppendorf-Röhrchen transferiert, Proteinase K (150 µg ml^{-1}) und Natriumdodecylsulfat (5 % Gew./Vol.) hinzugegeben, und dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Festes Material wurde durch Zentrifugieren bei 13000 g 5 min lang pelletiert und die DNA aus dem Überstand unter Verwendung eines Wizard® DNA Clean-Up Kit (Promega, WI, USA) isoliert.

[0098] Die ITS-2-Region (plus flankierende Sequenz) wurde aus einzelnen Proben genomischer DNA mittels PCR amplifiziert – unter Verwendung der Primer WW2 und WW4r. Der Primer WW2 wurde am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff, FAM (Fluorescein) markiert. Die PCR-Reaktionen erfolgten in 25 µl-Volumina, welche normalerweise 1–20 ng genomischer Template-DNA, 50 pmol Primer, 200 µM jedes dNTP, 3 mM $MgCl_2$ und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Promega, WI, USA) enthielten, unter den folgenden Thermozyklierungsbedingungen: 94 °C, 15 s (Denaturierung); 60 °C, 15 s (Anlagerung); 72 °C, 30 s (Verlängerung) für 30 Zyklen in einem DNA-Thermal Cycler 2400 (Perkin Elmer). Proben ohne DNA (keine DNA) oder mit Hühner-DNA (gereinigt wie bei Eimeria-DNA) wurden als Kontroll-Reaktionen verwendet. Die kleinste Menge an genomischer Template-DNA, aus der sich die ITS-2-Sequenz effektiv amplifizieren ließ und die auf einem Agarosegel detektierbar war, wurde auf 100 bis 1000 pg (= X Oozysten-Äquivalente) geschätzt, sogar bei Vorliegen eines 1000fachen DNA-Überschusses einer heterologen Spezies oder des Wirtes (d.h. Muskel- oder Fäzes-DNA).

[0099] Amplikone wurden untersucht und ihre Intensität auf mit Ethidiumbromid gefärbten 2,5%igen Agarosegelen, unter Verwendung von 65 mM Tris-HCl, 27 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 9 (TBE) als Puffer und einer 100 bp-Leiter (Promega, WI, USA) als Größenmarker, verifiziert. Danach wurde jede Probe 1:4 mit H_2O verdünnt, und 1,5 µl davon wurden mit 2 µl 4,1 mM EDTA, 88,25 % Formamid, 15 mg/ml Dextranblau (Promega) und 0,6 µl des GeneScan®-2500[TAMRA]-Größenstandards (Applied Biosystems) gemischt. Die Proben wurden bei 95 °C 2 min lang denaturiert, auf ein 5%iges LongRanger®-Gel (FMC) in einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) aufgetragen (2 µl) und dann einer Elektrophorese bei 200 W (3000 V und 60 mA) für 3,5 h unterzogen. Das erhaltene Gelbild, dass alle Proben repräsentierte, wurde festgehalten und die Chromatogramme analysiert und unter Verwendung von GeneScan® 3.1-Software (Applied Biosystems) verglichen. Jeder einzelne Peak repräsentierte die Position des Sinnstrangs eines denaturierten Amplikons. Die Intensitätsskala (Ordinate) der Chromatogramme wurde so eingestellt, dass die Hintergrundfluoreszenz dargestellt wurde, somit blieben keine Peaks unentdeckt.

8 Ergebnisse der Beispielstudie über die Verwendung der fluoreszenzbasierten elektrophoretischen Detektion

[0100] Achtzehn DNA-Referenzproben, die monospezifische Eimeria-Oozysten repräsentierten, wurden hergestellt (Tabelle 1). Die agarosegel-elektrophoretische Analyse der ITS-2-PCR-Produkte, die (einzeln) aus allen monospezifischen Proben amplifiziert wurden, führte zur Detektion einer Sande für E. tenella, während

zwei Banden für alle anderen Spezies (nicht dargestell) angezeigt wurden. Die Auflösung mehrerer Banden auf Agarosegelen bei einigen Spezies wies auf die Existenz verschiedener Sequenztypen innerhalb eines Amplikons hin, was mit früheren Erkenntnissen (Woods et al., 2000a,b) übereinstimmt. Dies wurde bestätigt durch die Sequenzierung geklonter ITS-2-Amplikone (3 Klöne wurden sequenziert) von ausgewählten Proben (A7, B1, M1, N1 und T6), die jede Spezies repräsentierten (siehe Tabelle 1). Ferner zeigten die ITS-2-Sequenzen, die für die Isolate M1 (E. maxima) und T6 (E. tenella) (Tabelle 1) bestimmt wurden, Konkordanz zu den Sequenzen, die in der GenBank™ (Accession numbers AF027722, AF027723, AF027724, AF027725, AF027726 und AF026388) hinterlegt sind. Einige neue ITS-2-Sequenztypen wurden für E. mitis und praecox detektiert, was nicht unerwartet war, da es bisher keine Studie gibt, die die Sequenzvariabilität in der ITS-2-Region innerhalb einer Spezies oder eines Isolats gründlich untersucht hat.

[0101] Die aus allen monospezifischen Eimeria-DNA-Proben (Tabelle 1) gewonnenen Amplikone wurden anschließend in dem automatischen Sequenzierer analysiert. Repräsentative Chromatogramme sind in **Fig. 8** wiedergegeben. Für E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix und E. tenella waren keine merklichen Unterschiede in der Anzahl und der Position der Peaks der Chromatogrammprofile zwischen den Proben (dargestellt sind ausgewählte Proben) festgestellt worden, allerdings wurden einige Unterschiede in der relativen Peak-Intensität zwischen einigen Proben festgestellt, die eine Spezies repräsentierten (**Fig. 8**). Sowohl für E. mitis als auch E. praecox wurden einige Unterschiede in der Position/den Positionen kleinerer Peaks festgestellt, die eine Populationsvariation anzeigen (**Fig. 9**). Unabhängig von einer solchen intraspezifischen Variabilität in den Chromatogrammprofilen blieb die Position der höchsten/Haupt-Peaks (mit Pfeilen gekennzeichnet) bei allen Proben für jede Spezies gleich. Zwar gab es eine gewisse Überlappung in den Profilen von E. brunetti, E. mitis und E. praecox, doch konnten speziesspezifische chromatographische Peaks für jede der sieben Eimeria-Spezies definiert werden (Sternchen in **Fig. 8**).

[0102] Da auf natürliche weise infizierte Hühner gleichzeitig mehr als eine Spezies von Eimeria beherbergen können, wurde die Fähigkeit des automatisierten, fluoreszenzbasierten elektrophoretischen Verfahrens zur spezifischen Detektion von DNA in Proben, die mehr als eine Spezies enthalten, ermittelt. Dreizehn unbekannte "Feld"-Proben, alle von Gruppen aus mehreren Hühnern gewonnen, wurden getestet (Tabelle 3). Im Vergleich zu Referenzproben (A6, B1 M1, µ2, N1, P4 und T6) konnte die Spezies-Zusammensetzung innerhalb einzelner Proben leicht bestimmt werden (Tabelle 3 und **Fig. 8**), auch bei Proben, die E. brunetti, E. mitis und E. praecox enthielten und deren Profile erhebliche Überlappungen aufwiesen. Die meisten Kotproben enthielten mehrere Spezies, einschließlich E. praecox und E. mitis (n = 1), E. acervulina und E. mitis (n = 1), E. acervulina und E. praecox (n = 2), E. acervulina, E. mitis and E. praecox (n = 1), E. acervulina, E. maxima, E. mitis, E. praecox und E. tenella (n = 1), E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis und E. praecox (n = 1), E. acervulina, E. maxima und E. mitis (n = 1), allerdings enthielten mehrere Proben nur E. praecox (n = 4) oder nur E. mitis (n = 1). Anschließend wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens hinsichtlich der korrekten Identifizierung aller Spezies, die in gemischten Oozysten-Isolaten wie auch in Proben mit absichtlich gemischter DNA vorliegen, in einem Blind-Test evaluiert. Es wurde keine signifikante Variation der Chromatogrammprofile bei verschiedenen Läufen an verschiedenen Tagen festgestellt, und die Spezieszusammensetzung der gemischten Proben war erwartungsgemäß. Diese Ergebnisse belegen, dass dieses verfahren für die Detektierung von Infektionen mit einzelnen und mit einer Mischung von Spezies bei Hühnern von Nutzen ist.

Tabelle 3. Proben von Eimeria, gewonnen aus australischen Geflügelfarmen. Die Spezies-Zusammensetzung wurde durch DPGE-Analyse von fluoreszierend markierten ITS-2-Produkten bestimmt (vgl. Figur 8).

Proben	Detektierte Spezies
X1	*E. acervulina, E. praecox*
X2	*E. mitis, E. praecox*
X4	*E. praecox*
X5	*E. mitis*
X7	*E. acervulina, E. maxima, E. mitis, E. praecox, E. tenella*
X8	*E. acervulina, E. maxima, E. mitis*
X9	*E. acervulina, E. mitis, E. praecox*
X10	*E. praecox*
X11	*E. acervulina, E. mitis*
X13	*E. praecox*
X14	*E. acervulina, E. praecox*
X15	*E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis, E. praecox*
X16	*E. praecox*

VORTEILE UND INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

[0103] Wie sich aus der obigen Beschreibung ergibt, weist der Test gemäß der vorliegenden Erfindung eine Reihe von Vorteilen gegenüber bisher bekannten, zur Identifizierung von Eimeria-Spezies eingesetzten Verfahren auf. So erfordert der vorliegende Test beispielsweise nicht die Verwendung mehrerer Primer-Sätze, die für jede der Eimeria-Spezies, die detektiert werden sollen, spezifisch sind, vielmehr kann ein einziger gattungsspezifischer Primer-Satz verwendet werden. Folglich kann eine Mehrzahl an Spezies gemeinsam aus einer einzigen Test-Probe amplifiziert werden und in einer einzigen Spur auf einem geeigneten Elektrophoresegel laufen.

[0104] Die elektrophoretischen Gelsysteme (SSCP und/oder DFGE), die erfindungsgemäß zur Visualisierung der Amplifikationsprodukte eingesetzt werden, und damit zur Identifizierung der in einer Probe vorliegenden Spezies dienen, sind extrem empfindlich und in der Lage, zwischen Spezies zu unterscheiden, die sich hinsichtlich ihrer Länge nur aufgrund eines einzigen Nucleotids unterscheiden oder die sich durch geringfügige Sequenzvariationen voneinander unterscheiden.

[0105] Das hier beschriebene fluoreszenzbasierte elektrophoretische Detektionsverfahren bietet außerdem große Vorteile gegenüber früheren, zur Identifizierung von Eimeria eingesetzten Verfahren, insbesondere in Kombination mit den neuen Primern der vorliegenden Erfindung. Mit der Anwendung dieses Detektionssystems wird die Notwendigkeit der Verwendung von radioaktiven Nucleotiden beseitigt, somit ist die Durchführung dieses Verfahrens für den Ausführenden sicherer Außerdem erfolgt das Auslesen der Elektrophoresegele automatisch, unter Einsatz eines bildgebenden Computer-Systems, wodurch die Notwendigkeit der Handhabung und der Belichtung der Gele beseitigt und der Zeitaufwand erheblich reduziert wird. Darüber hinaus können die die verschiedenen Proben repräsentierenden Chromatogramme (die auf verschiedenen Gelen an verschiedenen Tagen laufen) elektronisch aufgenommen und gespeichert werden und sind jederzeit für vergleichende Analysen abrufbar. Somit ist dieses automatisierte Elektrophorese-Verfahren zeitsparend. und kostengünstig, außerdem gut geeignet für die Typisierung von großen Mengen von Oozysten-Proben und kann ein nützliches epidemiologisches Instrument für Prävalenz-Studien wie auch für die Überwachung von Kokzidio-

se-Ausbrüchen darstellen.

[0106] Des Weiteren bietet die hier beschriebene Erfindung bedeutende Vorteile gegenüber der RAPD-PCR (Johnston et al, 1995; Greif et al, 1996; Shirley et al, 1994 (Parasitol Res); Shirley et al, 1994 (Res Vet Sci)), insofern als sie wohldefinierte Primer auf eine spezifische Region der rDNA für die PCR mit einer relativ hohen Stringenz anwendet, wodurch Probleme mit der Amplifikation von kontaminierender Wirts-DNA sowie die durch die Nichtspezifität der Primer und die niedrige Annealing-Temperatur bei der PCR verursachten Probleme mit der Reproduzierbarkeit (Ellsworth et al, 1993; MacPherson et al, 1993) auf ein Minimum reduziert werden.

[0107] Zusammengenommen ermöglichen die oben genannten Merkmale ein schnelles, hochauflösendes, qualitatives Screening einer großen Anzahl von Proben nach jeder beliebigen Spezies der Gattung Eimeria. Weiterhin beseitigt die Erfindung die Notwendigkeit der Durchführung von DNA-Sequenzanalysen (in erster Linie), wodurch Zeit- und Arbeitsaufwand sowie Kosten reduziert werden.

[0108] Die vorliegende Erfindung kann experimentell oder in gewerblichem Maßstab als ein Mittel zur Routine-Diagnose und zur Überwachung von Kokzidien, insbesondere von Vogelkokzidien, Anwendung finden. Alternativ hierzu kann die Erfindung in der Qualitätskontrolle des Spezies-Status monospezifischer Laborlinien von Eimeria verwendet werden. Weiterhin kann die Erfindung als ein ergänzendes Werkzeug bei der Entwicklung zukünftiger kommerzieller Impfstoffe und Diagnosetests nützlich sein.

[0109] Bei Eimeria-Spezies gibt es eine intraspezifische und interspezifische DNA-Sequenzvariation. Folglich wurden bei früheren Verfahren zur Detektion von Eimeria-Spezies ausschließlich speziesspezifische PCR angewendet, um die Notwendigkeit einer extensiven Sequenzierung und Charakterisierung der erhaltenen PCR-Produkte für die Identifizierung von Isolaten, zumindest auf der Artebene, zu umgehen. Im Gegensatz hierzu besteht ein Aspekt der vorliegenden Erfindung in der Anwendung genusspezifischer PCR, welche spezifisch auf die Variation von Sequenzen sowohl innerhalb einer Spezies von Eimeria als auch zwischen den Eimeria-Spezies abzielt.

[0110] Die Erfindung wurde mit Bezug auf bestimmte bevorzugte Ausführungsformen beschrieben, um es dem Leser zu ermöglichen, die Erfindung ohne übermäßiges Experimentieren auszuüben. Jedoch ist es für den durchschnittlichen Fachmann auf diesem Gebiet leicht ersichtlich, dass viele der Komponenten und Parameter bis zu einem gewissen Grade verändert oder modifiziert werden können, ohne den Schutzumfang der Erfindung zu verlassen. Weiterhin dienen die hier verwendeten Titel, Überschriften u. ä. dem besseren Verständnis des Lesers und sollten nicht als den Schutzumfang der vorliegenden Erfindung beschränkend interpretiert werden.

BIBLIOGRAPHIE:

Andrews, R. H. und Chilton, N. B., Int. J Parasitol. 1999, 29, 213–253. Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevicz,
M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M. C., Danforth, H. D., Ruff, M. D. und Profous-Juchelka, H., J. Parasitol. 1997, 83, 262–271.
Barta, J. R., Coles, B. A., Schito, M. L., Fernando, M. A., Martin, A. und Danforth, H. D., Int J Parasitol. 1998, 28, 485–492.
Eckert, J., Taylor, M., Catchpole, J., Licois, D., Coudert, P. und Bucklar, H., in : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M. W. und Coudert, P. (Hg.), Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxembourg 1995, S. 103–119.
Ellsworth, D. L., Rittenhouse, K. D. und Honeycutt, R. L., Biotechniques 1993, 14, 214–217.
Gasser, R. B., Eckert, J. und Rohrer, L., Parasitol. Res. 1987, 74, 103–111.
Gasser, R. B., Int. J. Parasitol. 1997, 27, 1449–1463.
Greif, G., Stephan, B. und Haberkorn, A., Parasitol. Res. 1996, 82, 706–714.
Johnston, D. A. und Fernando, M. A., Parasitol. Res. 1995, 81, 91–97.
Johnston, D. A. und Fernando, M. A., Parasitol. Res. 1997, 83, 464–470.
MacPherson, J. M., Eckstein, P. E., Scoles, G. J. und Gajadhar, A. A., Mol. Cell. Probes 1993, 7, 293–299
McDougald, L. R. und Reid, W. M., in: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., McDougald, L. R. und M., S. Y. (Hg.), Diseases of Poultry, 10th Edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa 1997, S. 865–883.
Molloy, J. B., Eaves, F. W., Jeston, P. J., Minchin, C. M., Stewart, N. P., Lew, A.E. und Jorgensen, W. K., Avian Dis. 1998, 42, 119–123.
Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K, Genomics, 1989, 5, 874–879.

Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T, Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbour Press, 1989
Schnitzler, B. E., Thebo, P. L., Mattsson, J. G., Tomley, F. M. und Shirley, M. W., Avian Pathol. 1998, 27, 490–497.
Schnitzler, B. E., Thebo, P. L., Tomley, F. M., Uggla, A. und Shirley, M. W., Avian Pathol. 1999, 28, 89–93.
Shirley, M. W. und Bumstead, N., Parasitol. Res. 1994, 80, 346–351.
Shirley, M. W., Res. Vet. Sci. 1994, 57, 10–14.
Shirley, M. W., in: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M. W. und Coudert, P. (Hg.), Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxembourg 1995, S. 1–24.
Stucki, U., Braun, R. und Roditi, I., Exp. Parasitol. 1993, 76, 68–75.
Zhu, X. Q. und Gasser, R. B., Electrophoresis 1998, 19, 1366–1373.
Woods, W. G., G. Richards, K. G. Whithear, G. R. Anderson, W. K. Jorgensen, und R. B. Gasser. 2000. High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five Eimeria species from chickens und detection of population variation. Electrophoresis: in press.
Woods, W. G., K. G. Whithear, D. G. Richards, G. R. Anderson, W. K. Jorgensen, und R. B. Gasser. 2000. Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of Eimeria from chickens in Australia. Int. J. Parasitol. 30:1019–1023.

SEQUENCE LISTING

<110> GASSER, Robin B.
WOODS, Wayne G.
RICHARDS, David G.
WHITHEAR, Kevin G.
THE UNIVERSITY OF MELBOURNE

<120> PCR-BASIERTE IDENTIFIZIERUNG VON EIMERIA-SPEZIES UND -STÄMMEN

<130> 7464793/PAS/SAR

<140>
<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 626
<212> DNA
<213> Eimeria tenella

<400> 1
tctaaaggat gcaaaagtcg taacacggtt tccgtagtga acctgcggaa ggatcattca 60
cacaattcgc acgcctggaa cgcgctgctg gttttacagg tttcaagcat tcgctttgcc 120
tgggtggcca gcagcaggta gtcgtcggtg ttgttggaaa gaaaacttta gtccatcgca 180
acccttgaat ctgtttttct ctgcaacggt ttttctactt tttaaaaatt gaaggaattt 240
tttgctgctg caaggatata tcgcagtagt atgtacgtgg gcgatcgggg gggtggtggc 300
gcatgcacgg gctcgcgtgg ggcctgtcgg tggcagcccc agcgcgccgg cgcagccccg 360
tgatcgtcga tcgcgcacgt acgtggaggg gattatgaga ggagaagacg cgcacggggc 420
tgtgtcgtat gcagagcgct cgcggctcgg gcgattgttc cgtgttgtgt gctctgctgc 480
atgctggtgt gtgcgttctg tctctctctc tctccgttac atgctgcttg gaactttgct 540
tcagcaagaa acctttgctc actaaggtga atcgaatcac ttttgttgat gagcagaagg 600
aagaataggt agaaatcgga aaaaac 626

<210> 2
<211> 512
<212> DNA
<213> Eimeria tenella

<400> 2
cttaacaact cctactagta ggccatgctg ctgtctgtct ctgttccttg tggtcctgtg 60
agggttcggc gatgctgccg acagaagtga gtgctttgct cgtttctgtt ttgtgtcgcg 120
gaatttttc gggtcaccaa aggggaggta gaagcatgtt tggtttcatt tgagtgtcgt 180
tgcattggtt ttgaaggaga tgcggcgtct ctcgaaattg ttgtcggcag cggtgctgtg 240
tgtctgcaca gtgtgccgtt ttccatgcct gtgctttcta tagtgtcgtc gtatgctcct 300
ttcattcgga aagagagaga tacggtggtt gtattttatg caacgttgtt tgtctcgttc 360
tggacgaatg ttttgagcag ggctagggcg aggtataata gtgcatgggt atgcgacaac 420
gtgaaacgac atatagtaca cggcaccatg gacgtgttgc atgcgtcgtt ttttttcggt 480
attacacatg tatgtataga cctgaaatca gt 512

<210> 3
<211> 10
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 3
tctaaaggat 10

<210> 4
<211> 4
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 4
cagc 4

<210> 5
<211> 5
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 5
gtttt 5

<210> 6
<211> 10
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 6
atgcgtgagc 10

<210> 7
<211> 10
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 7
actgatttca 10

<210> 8
<211> 10
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 8
tgatatgctt 10

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 9
agttgcgtaa atagagccc 19

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 10
aagacatcca ttgctgaaa 19

<210> 11

<211> 18
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 11
aagttgcgta aaagagcc 18

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 12
caagacatcc attgctgaa 19

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 13
aagttgcgta aatagagc 18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 14
caagacatcc attgctga 18

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 15
ttgcgtaaat agagccc 17

<210> 16
<211> 17
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 16
gacatccatt gctgaaa 17

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 17
cgtctgtttc agtgtct 17

<210> 18
<211> 19

<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 18
aattcagcgg gtaacctcg 19

<210> 19
<211> 17
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 19
acgtctgttt cagtgtc 17

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 20
aaattcagcg ggtaacctc 19

<210> 21
<211> 17
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 21
acgtctgttt cagtgct 17

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 22
aaattcagcg ggtaacct 18

<210> 23
<211> 16
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 23
gtctgtttca gtgtct 16

<210> 24
<211> 17
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 24
ttcagcgggt aacctcg 17

<210> 25
<211> 20
<212> DNA

<213> synthetisches Konstrukt

<400> 25
aagttgcgta aatagagccc 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 26
caagacatcc attgctgaaa 20

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 27
acgtctgttt cagtgtct 18

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 28
aaattcagcg ggtaacctcg 20

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 29
acctggttga tcctgccag 19

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> synthetisches Konstrukt

<400> 30
cttccgcagg ttcacctacg g 21

Patentansprüche

1. Oligonucleotid, umfassend wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 25 bezeichneten DNA-Sequenz, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

2. Oligonucleotid nach Anspruch 1, umfassend die als SEQ ID NO: 25 bezeichnete Sequenz.

3. Oligonucleotid-Sequenz nach Anspruch 1, wobei das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 15 ausgewählt ist.

4. Oligonucleotid, umfassend wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 26 bezeichneten DNA-Sequenz, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

5. Oligonucleotid nach Anspruch 4, umfassend die mit SEQ ID NO: 26 bezeichnete Sequenz.

6. Oligonucleotid nach Anspruch 4, wobei das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 und SEQ ID NO: 16 ausgewählt ist.

7. Oligonucleotid, umfassend wenigstens 15 Basen der als SEQ ID NO: 27 bezeichneten DNA-Sequenz, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

8. Oligonucleotid nach Anspruch 7, umfassend die als SEQ ID NO: 27 bezeichnete Sequenz.

9. Oligonucleotid nach Anspruch 7, wobei das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 23 ausgewählt ist.

10. Oligonucleotid, umfassend wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 28 bezeichneten DNA-Sequenz, oder ein anlagerndes Äquivalent davon, wobei das Oligonucleotid unter den Bedingungen einer PCR zur spezifischen Hybridisierung an eine zu den wenigstens 15 aufeinander folgenden Basen komplementäre Zielsequenz in der Lage ist und wobei das Oligonucleotid so gestaltet ist, dass es die Verlängerung der DNA während der PCR initiiert.

11. Oligonucleotid nach Anspruch 10, umfassend eine als SEQ ID NO: 28 bezeichnete Sequenz.

12. Oligonucleotid nach Anspruch 10, wobei das Oligonucleotid aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 und SEQ ID NO: 24 ausgewählt ist.

13. PCR-Primer-Paar, wobei es sich bei einem der Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 25 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon, und wobei es sich bei dem zweiten Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 26 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon.

14. PCR-Primer-Paar nach Anspruch 13, wobei das PCR-Primer-Paar einen Primer umfasst, der eine als SEQ ID NO: 25 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst, sowie einen zweiten Primer, der eine als SEQ ID NO: 26 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst.

15. PCR-Primer-Paar nach Anspruch 13, wobei das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 umfasst.

16. PCR-Primer-Paar, wobei es sich bei einem der Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 27 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon, und wobei es sich bei dem zweiten Primer um einen Primer handelt, der wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 28 bezeichneten DNA-Sequenz umfasst, oder um ein anlagerndes Äquivalent davon.

17. PCR-Primer-Paar nach Anspruch 16, wobei das PCR-Primer-Paar einen Primer umfasst, der die als SEQ ID NO: 27 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst, und einen Primer, der die als SEQ ID NO: 28 bezeichnete DNA-Sequenz umfasst.

18. PCR-Primer-Paar nach Anspruch 16, wobei das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 oder SEQ ID NO: 23, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 oder SEQ ID NO: 24 umfasst.

19. verfahren zur Identifizierung von Eimeria in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
– Bereitstellen einer Probe, welche die zu testende genomische Original-DNA umfasst;
– Bereitstellen genomischer DNA eines oder mehrerer Standards bekannter Identität;
– Bereitstellen eines PCR-Primer-Paares, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
(i) Primern, die wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 25 und SEQ ID NO: 26 bezeichneten DNA-Sequenz umfassen, oder anlagernden Äquivalenten davon; oder

(ii) Primern, die wenigstens 15 aufeinander folgende Basen der als SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 28 bezeichneten DNA-Sequenzen umfassen, oder anlagernden Äquivalenten davon;
– Amplifizieren eines Abschnitts originaler DNA mittels PCR unter Verwendung des Primer-Paares, um aus der Probe ein PCR-Produkt oder mehrere PCR-Produkte zu erzeugen und um den besagten einen Standard oder die besagten mehreren Standards bekannter Identität zu erzeugen;
– Vergleichen des besagten einen, aus der Probe gewonnenen PCR-Produktes oder der besagten mehreren, aus der Probe gewonnenen PCR-Produkte mit einem oder mehreren PCR-Produkten des besagten einen Standards oder der besagten mehreren Standards bekannter Identität; und
– Identifizieren der in der Probe vorliegenden Eimeria-Spezies.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das PCR-Primer-Paar Primer umfasst, welche die als SEQ ID NO: 25 und SEQ ID NO: 26 bezeichneten Sequenzen umfassen.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das PCR-Primer-Paar die Primer umfasst, welche die als SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 28 bezeichneten Sequenzen umfasst.

23. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das PCR-Primer-Paar eine der Sequenzen SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 oder SEQ ID NO: 23, und eine der Sequenzen SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 oder SEQ ID NO: 24 umfasst.

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 19 bis 23, wobei pro zu testender Probe zwei PCR durchgeführt werden und wobei für jede PCR jeweils ein unterschiedliches Primer-Paar verwendet wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei pro zu testender Probe eine PCR durchgeführt wird und beide Primer-Paare innerhalb dieser einen PCR bereitgestellt werden.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 25, wobei das besagte eine, aus der Probe gewonnene PCR-Produkt oder die besagten mehreren, aus der Probe gewonnenen PCR-Produkte mit dem besagten einen PCR-Produkt oder den besagten mehreren PCR-Produkten des besagten einen Standards oder der besagten mehreren Standards bekannter Identität mittels Gel-Elektrophorese verglichen werden.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei es sich bei der Gel-Elektrophorese um DPGE handelt.

28. Verfahren nach Anspruch 26, wobei es sich bei der Gel-Elektrophorese um SSCP handelt.

29. Verfahren nach Anspruch 26, wobei sowohl DPGE als auch SSCP eingesetzt werden.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29, wobei die Gel-Elektrophorese in einem automatisierten System durchgeführt wird.

31. Verwendung eines der in den Ansprüchen 1 bis 12 definierten Oligonucleotide, oder eines der anlagernden Äquivalente davon, zur Identifizierung von Eimeria-Spezies.

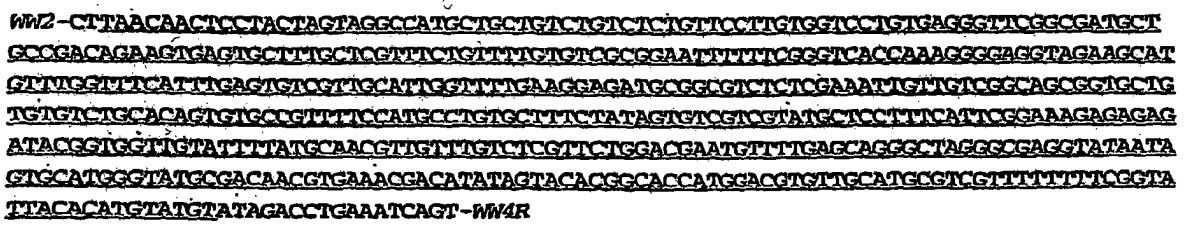
Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

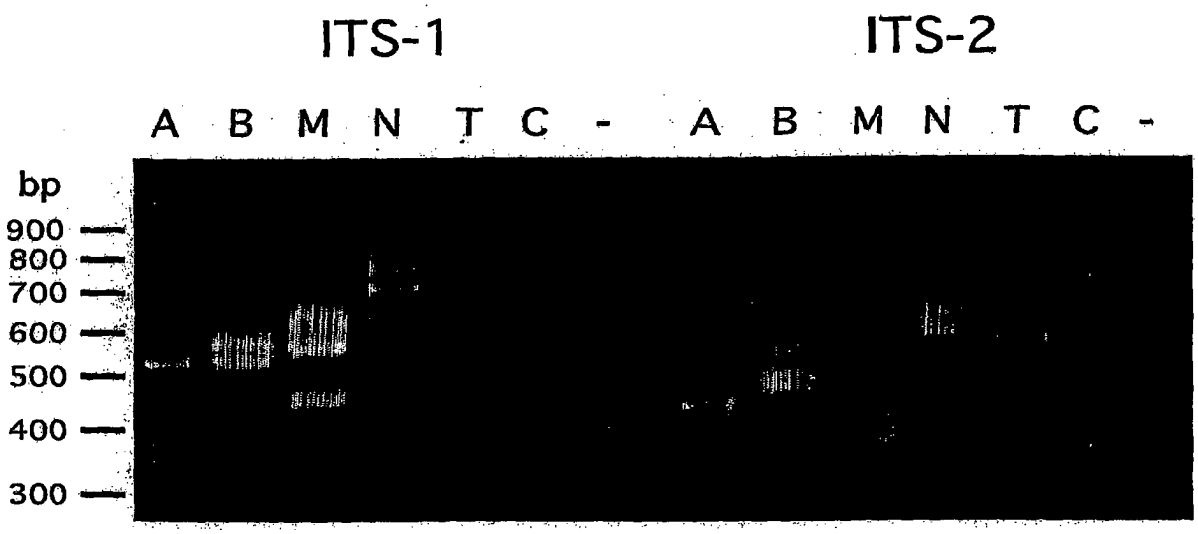
Figur 1

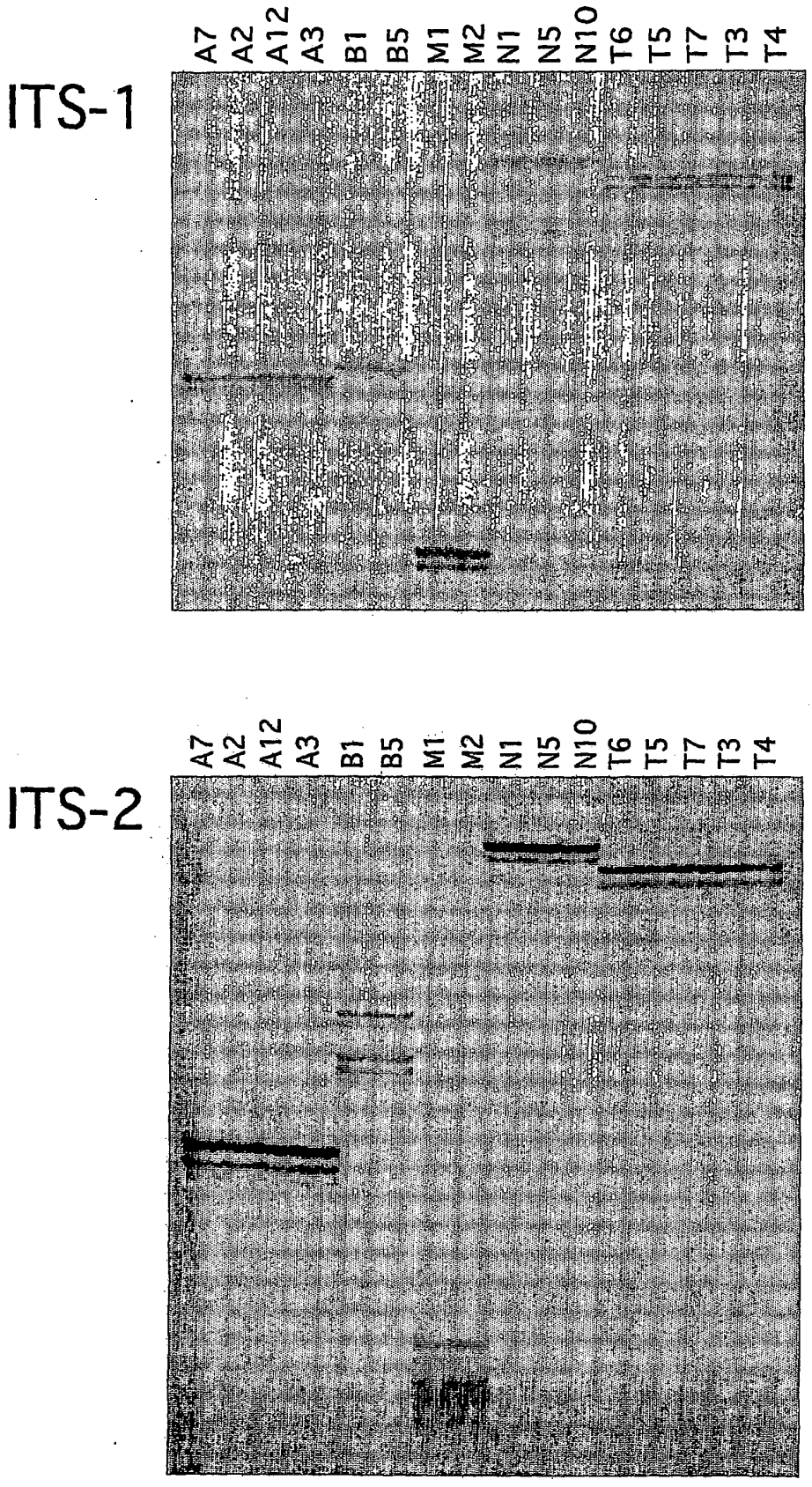


Figur 2

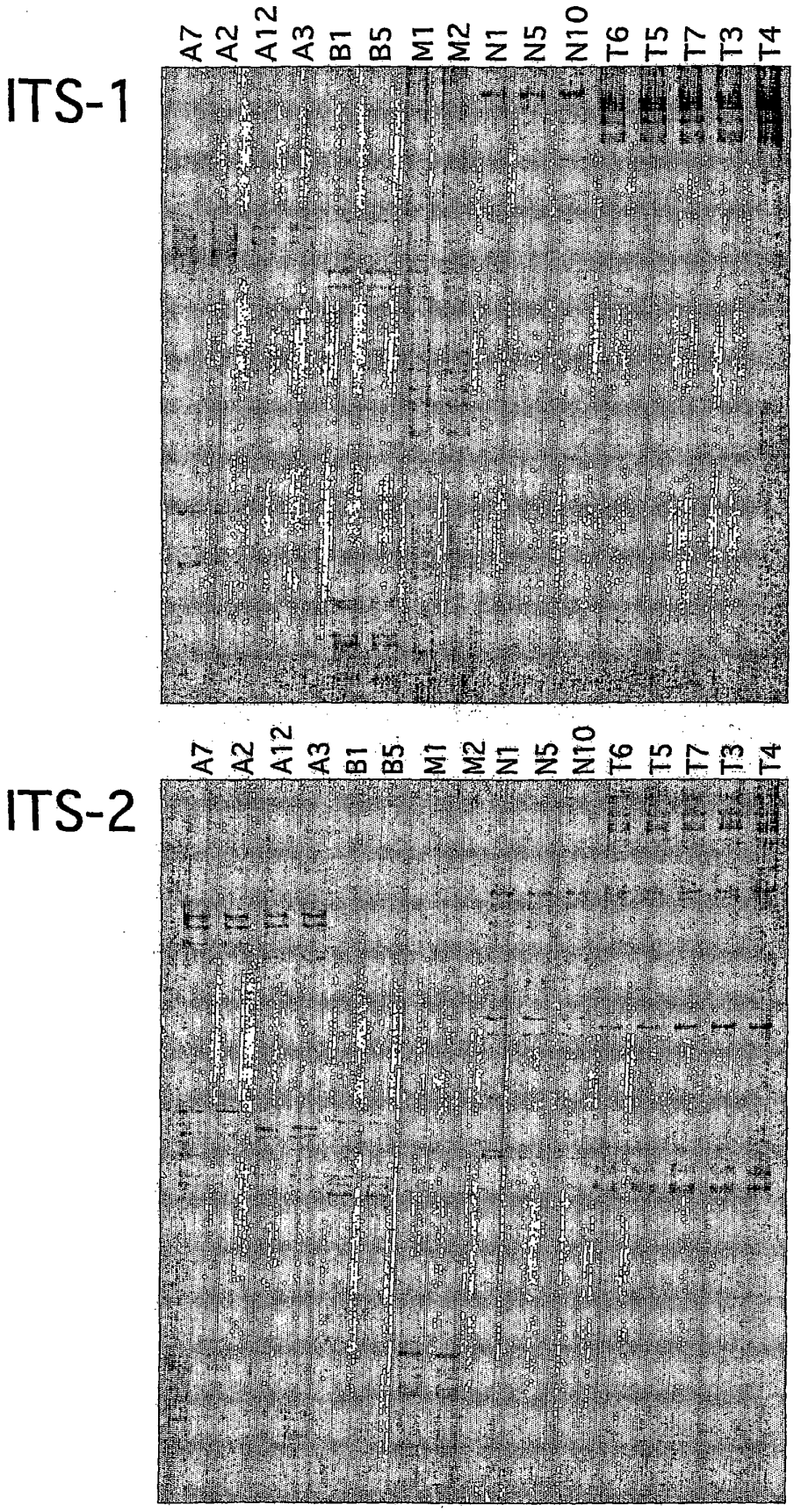


Figur 3



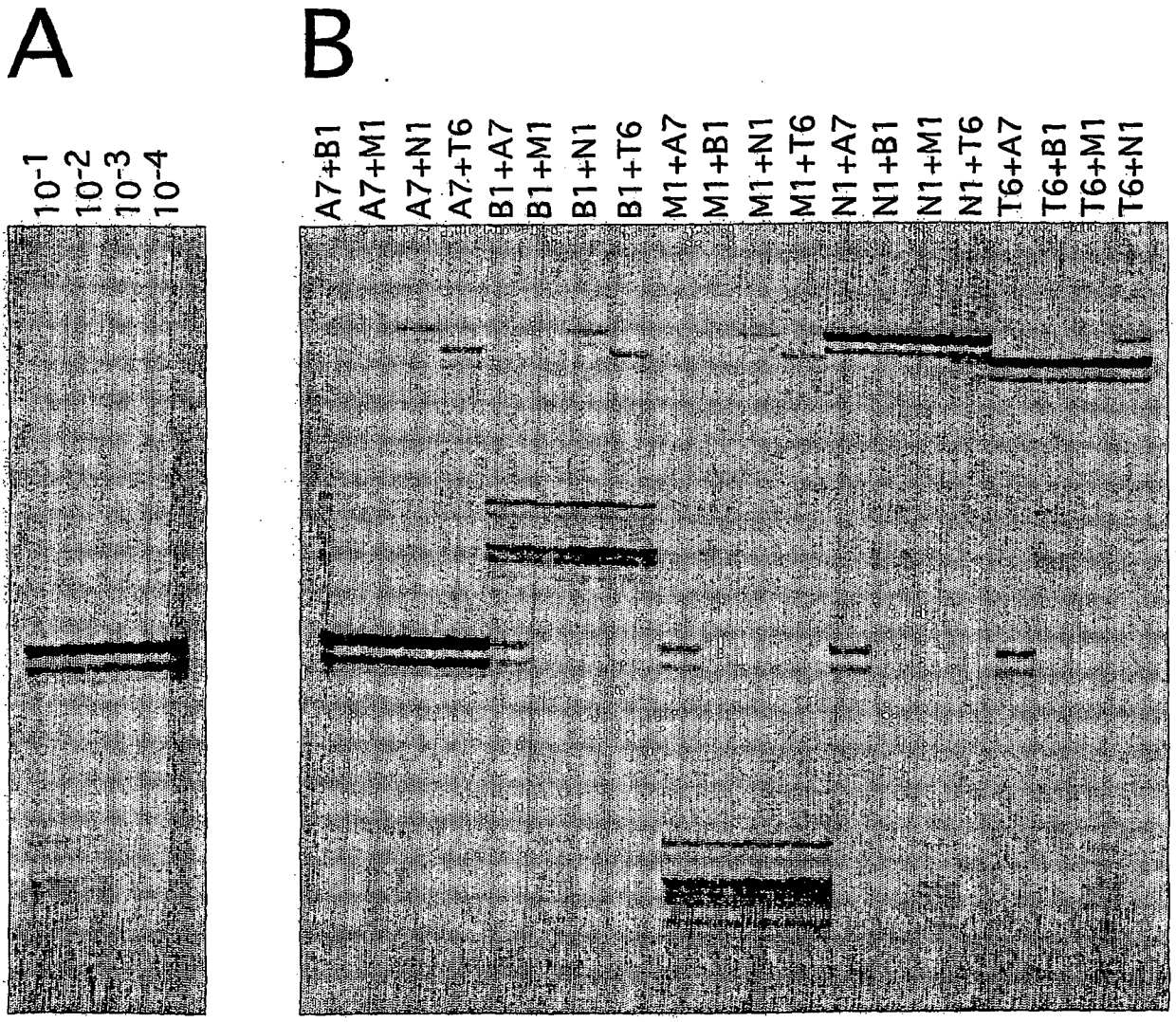

ITS-1
A7
A2
A12
A3
B1
B5
M1
M2
N1
N5
N10
T6
T5
T7
T3
T4
ITS-2
A7
A2
A12
A3
B1
B5
M1
M2
N1
N5
N10
T6
T5
T7
T3
T4

Figur 4

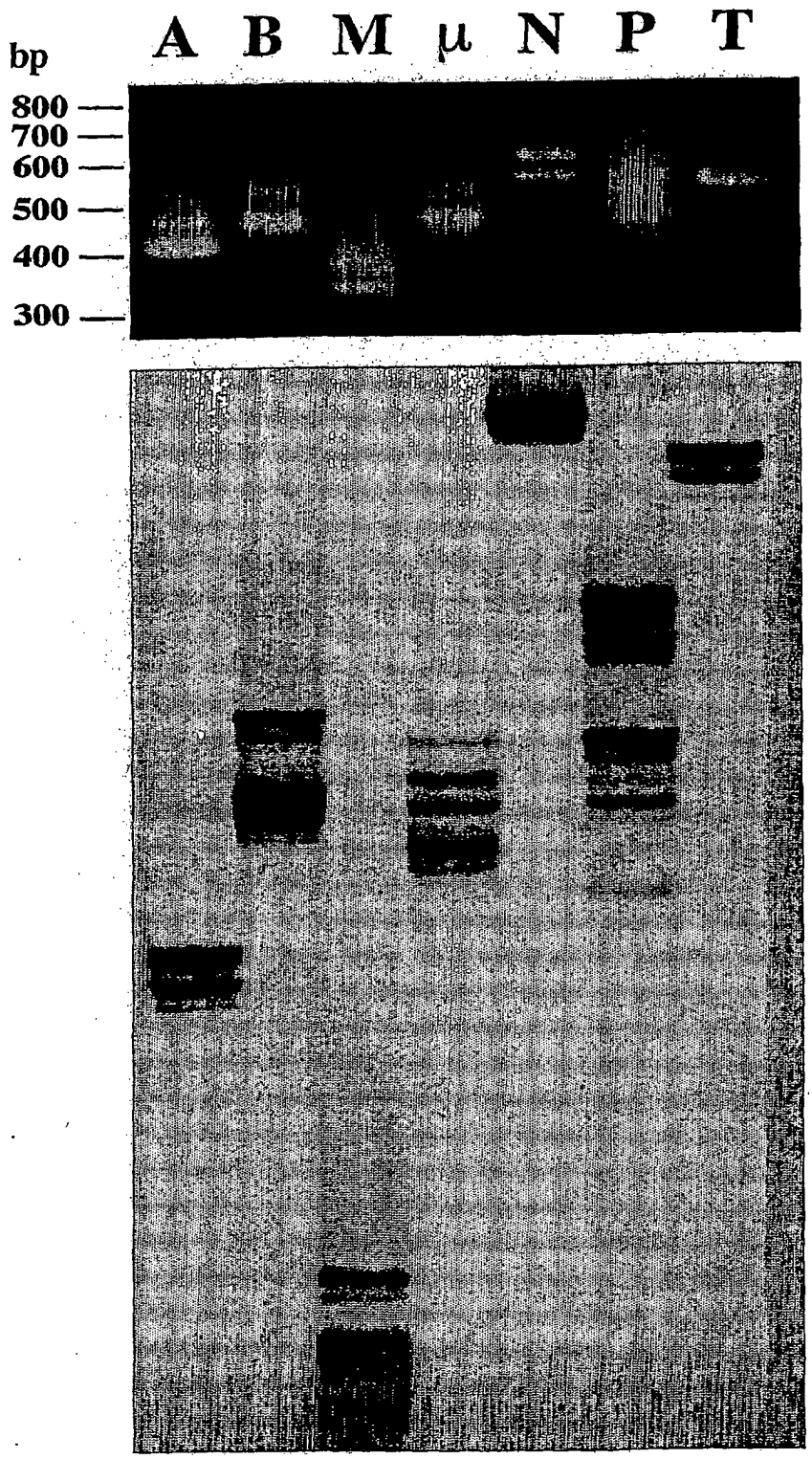

ITS-1
A7 A2 A12 A3 B1 B5 M1 M2 N1 N5 N10 T6 T5 T7 T3 T4
ITS-2
A7 A2 A12 A3 B1 B5 M1 M2 N1 N5 N10 T6 T5 T7 T3 T4

Figur 5

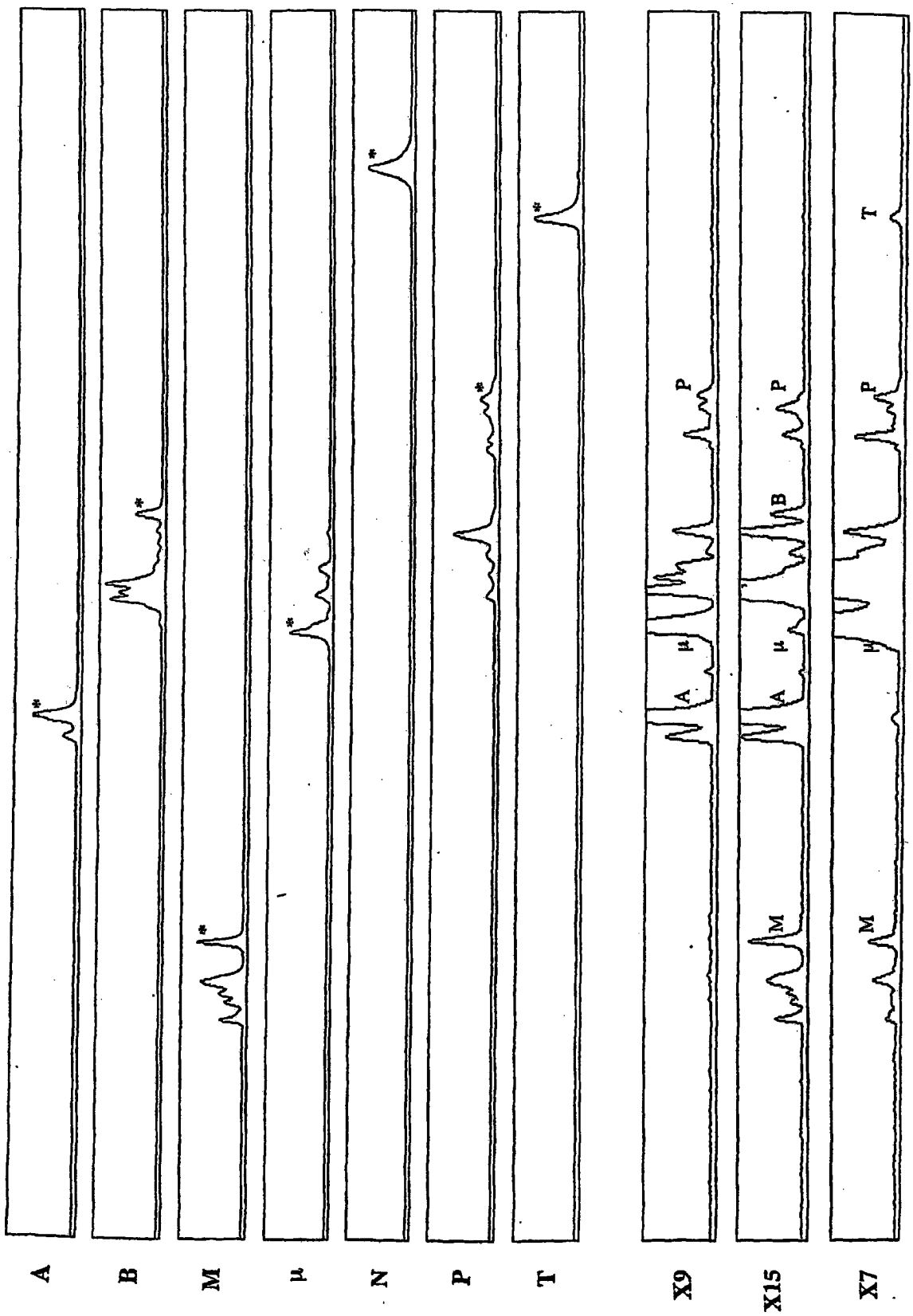
Figur 6


A
B
10-1
10-2
10-3
10-4
A7+B1
A7+M1
A7+N1
A7+T6
B1+A7
B1+M1
B1+N1
B1+T6
M1+A7
M1+B1
M1+N1
M1+T6
N1+A7
N1+B1
N1+M1
N1+T6
T6+A7
T6+B1
T6+M1
T6+N1

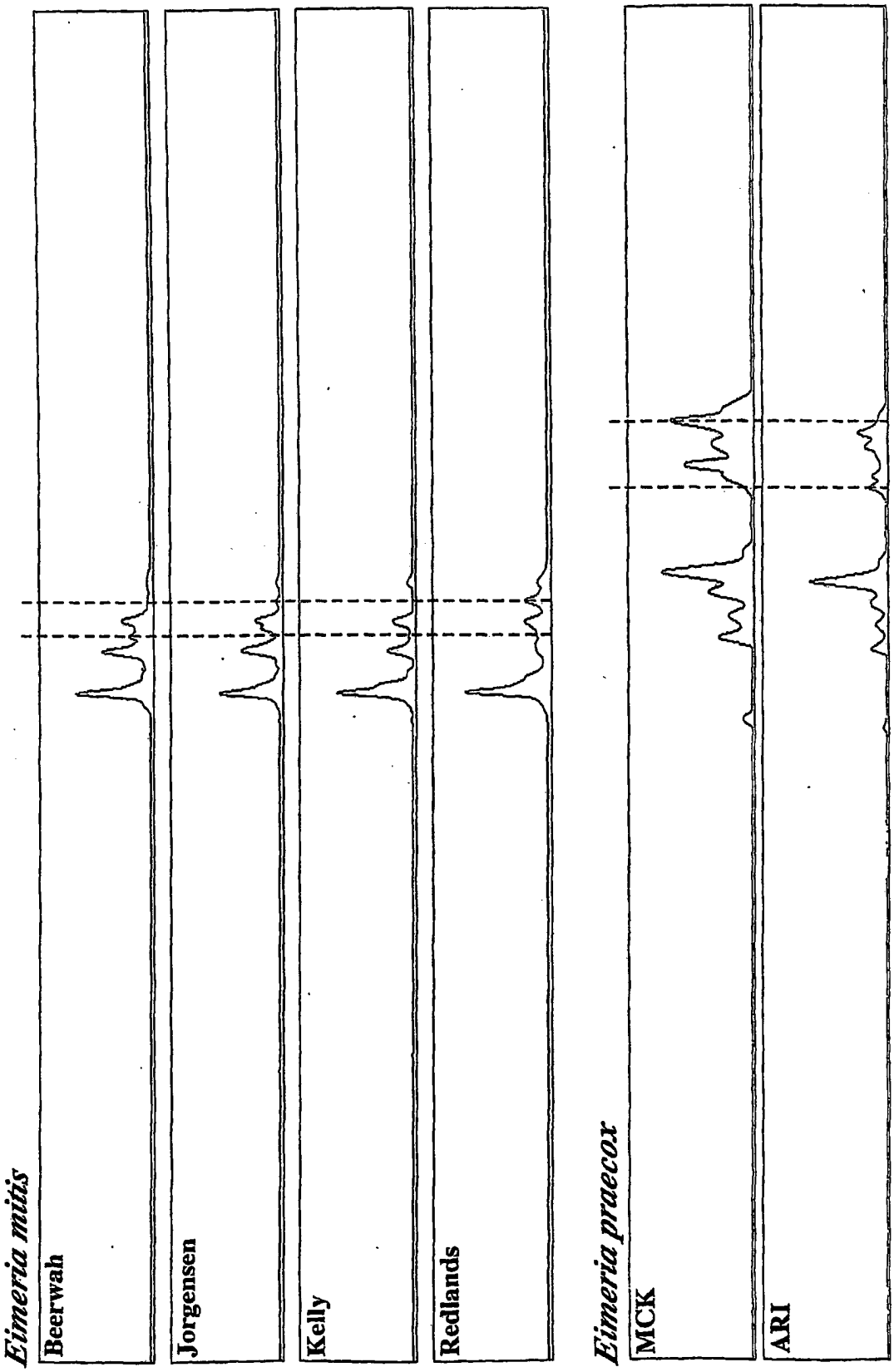
Figur 7



Figur 8



Figur 9


Eimeria mitis
Beerwah
Jorgensen
Kelly
Redlands
Eimeria praecox
MCK
ARI