

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 957**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08839398 .8**

96 Fecha de presentación: **10.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2201139**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **DETECCIÓN DE GÉRMENES ASOCIADOS A PERIODONTITIS.**

30 Prioridad:  
**10.10.2007 AT 16172007**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.12.2011**

73 Titular/es:  
**GREINER BIO-ONE GMBH  
MAYBACHSTRASSE 2  
72636 FRICKENHAUSEN, DE**

72 Inventor/es:  
**WINKLEHNER, Peter, Johannes y  
MITTERMAYR, Christian, Rudolf**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 957 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Detección de gérmenes asociados a periodontitis

La presente invención describe un procedimiento, un dispositivo microfluídico, así como un kit para la detección y/o para la determinación de bacterias asociadas a periodontitis de una muestra biológica.

- 5 La periodontitis es una inflamación causada por bacterias y que se manifiesta en una destrucción ampliamente irreversible del aparato de soporte dental (periodoncio).

10 La periodontitis es producida por la placa bacteriana (sarro), una biopelícula resistente adherente. La principal característica distintiva es la descalcificación ósea radiográficamente detectable existente en la periodontitis, mientras que las bolsas gingivales profundizadas en una gingivitis se producen debido a la hinchazón inflamatoria de la encía. Tanto en la gingivitis como también en la periodontitis se liberan productos del metabolismo y de la descomposición bacteriana de la biopelícula que producen reacciones de defensa del cuerpo. El sistema inmunitario autólogo desempeña la función principal en la propia destrucción de tejido que intenta eliminar las bacterias. Esta resistencia inmunológica está constituida por una variada sucesión de reacciones y acciones en las que participan las distintas sustancias y células inflamatorias. Entre otros se forman enzimas que destruirán las bacterias, sin embargo también conducen a una destrucción del tejido autólogo. Esto conduce por último a la pérdida de tejido conjuntivo y huesos. El resultado de la reacción sobre las bacterias son sangrados gingivales, formación de bolsas, retracción de la encía y finalmente aflojamiento y pérdida de los dientes.

15 A partir de los treinta y cinco años los seres humanos pierden más dientes por periodontitis que por caries. Es en gran medida desconocido que la encía enferma también puede cargar gravemente otros órganos. La periodontitis es una enfermedad muy frecuente en la que en el transcurso de los años se daña la encía o el aparato de soporte dental por la falta de higiene bucal. Especialmente sin un tratamiento de la periodontitis existe el riesgo de la pérdida de los dientes.

20 En la mayoría de los casos se trata de un acontecimiento que transcurre de forma crónica. Ésta aparece predominantemente en adultos, sólo es raramente dolorosa y sólo después de años conduce a aflojamientos de los dientes al menos la mayoría de las veces de forma desapercibida para los afectados. Por tanto, el borde gingival ofrece para las bacterias una protección relativa de la cavidad bucal autolimpiante por la lengua y la saliva. En personas sanas, el llamado epitelio del borde garantiza una superficie continua entre la encía y el diente debido a su adhesión al esmalte dental. Si la placa en estos nichos no se elimina cuidadosamente, los productos de secreción de los microorganismos (exotoxinas) atacan el epitelio del borde y algunas bacterias pueden incluso cruzar el epitelio. El cuerpo reacciona a tales ataques con la inmigración de células de defensa de la sangre. Así, poco a poco se destruyen y se fagocitan los intrusos. A este respecto se liberan distintas endotoxinas. Tanto las exotoxinas como también las endotoxinas y algunos productos de descomposición de las células de defensa del cuerpo producen un estímulo. Para proteger el tejido de los alrededores de estos estímulos y prevenir una penetración de la inflamación en la mandíbula, el cuerpo también activa, entre otros, osteoclastos. Su objetivo consiste en la reducción y la conversión específica de tejido óseo.

25 Con unas buenas defensas del cuerpo puede impedirse durante un largo tiempo que los microorganismos penetren en la mandíbula. Sin embargo, las relaciones de fuerza en esta lucha son muy lábiles. Un empeoramiento de las defensas del cuerpo, una fuerte multiplicación de bacterias o un cambio de la agresividad de los microorganismos conduce entonces a otra propagación del acontecimiento de inflamación en la profundidad. Así, en el transcurso se produce una pérdida ósea continua que sólo puede detenerse por una eliminación completa de los estímulos. La pérdida ósea aparece predominantemente horizontalmente en las radiografías ya que los osteoclastos en las fases de reposo de la inflamación transforman el tejido óseo segmentado y así se adaptan a las nuevas circunstancias. Debido al desarrollo lento y largo de la enfermedad, esta forma de inflamación se denomina periodontitis crónica. De ésta se diferencia la periodontitis agresiva, que conduce rápidamente a una extensa pérdida ósea y algunas veces también aparece ya en la infancia.

30 De las aproximadamente 500 especies de bacterias distintas que pueden existir en la cavidad bucal, solo algunas son patógenos periodontales. Éstos también se denominan gérmenes conductores principales y forman las llamadas agrupaciones, que son específicas en su asociación. Son especies de bacterias estrictamente o facultativamente anaerobias, Gram-negativas, pigmentadas de negro como el llamado complejo rojo (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis*, así como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* subtipo B).

35 La terapia consiste hoy en día en suprimir el estado de inflamación de la encía y del aparato de soporte dental y suprimir la placa y el sarro, así como los factores promotores de la inflamación. El tratamiento se subdivide en distintas fases en las que pueden tomarse diferentes medidas. La primera fase representa un amplio diagnóstico con el que pueden determinarse el tipo, la gravedad y el desarrollo de la enfermedad. Además de las radiografías todavía

sigue una valoración clínica del estado total de la dentadura. Entretanto, en muchos casos se realizan complementariamente pruebas microbiológicas (detección de determinadas bacterias patógenas periodontales). Si la periodontitis está tan fuertemente acentuada que deben administrarse antibióticos es ventajoso realizar previamente una determinación de gérmenes para poderla tratar de forma específica.

5 La periodontitis sin tratar conduce casi siempre a la pérdida de dientes y, como consecuencia de esto, a perjuicios estéticos y funcionales. Además, la periodontitis es un factor de riesgo para las enfermedades médicas en general. Por tanto, se considera científicamente probada una relación entre enfermedades periodontales y el elevado riesgo de aparición de infartos de miocardio y enfermedades del espectro de alteraciones reumáticas. En las últimas investigaciones pudo además mostrarse que una periodontitis sin tratar aumenta siete veces el riesgo de partos prematuros y un bajo peso de nacimiento también puede estar relacionado causalmente con la periodontitis.

10 Por el documento AT 411 174 B se conoce un procedimiento y un kit para el análisis de ácidos nucleicos que se usan para la identificación de bacterias asociadas a periodontitis. Aquí, sobre la superficie de un soporte sobre el que están dispuestos al menos una zona de análisis predefinida y una zona de control predefinida está aplicado un oligonucleótido con una secuencia que es complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana. Se aplican oligonucleótidos para la identificación de diversas bacterias asociadas a periodontitis que están constituidos preferiblemente por 10 a 120 nucleótidos. Como soporte se describe un biochip sobre el que se colocan los oligonucleótidos específicos. Antes de ponerse en contacto la muestra biológica con el biochip, el ADN de bacterias existente en la muestra biológica se amplifica mediante secuencias de cebadores específicos.

15 El documento DE 699 24 741 T2 describe una composición para la preparación de un fármaco para la prevención y el tratamiento de periodontitis. A este respecto, la periodontitis se combate eficazmente mediante el uso de un barniz que contiene un principio activo antimicrobiano. Se usa una composición antimicrobiana que comprende una base de barniz transparente fisiológicamente compatible y disuelto en ella un principio activo antimicrobiano.

20 Por el documento DE 101 54 290 A1 también se conoce un procedimiento para la detección de bacterias asociadas a periodontitis y a caries. La invención se refiere especialmente a procedimientos de hibridación y procedimientos de amplificación, así como a procedimientos de amplificación / hibridación acoplados con sondas o cebadores específicos de secuencia. Para la amplificación se usa preferiblemente la reacción en cadena de la polimerasa. En la forma más sencilla de detección del ácido nucleico que va a detectarse, el amplificado, por ejemplo, se corta específicamente mediante digestión con una enzima de restricción y los fragmentos formados se analizan en un gel de agarosa. También están muy extendidos los sistemas de hibridación, teniendo lugar la hibridación normalmente de forma que o bien la composición que contiene el producto de amplificación o una parte del mismo o bien la sonda se inmoviliza sobre una fase sólida y se pone en contacto con el otro componente de hibridación respectivo. Como fase sólida son imaginables distintos materiales como, por ejemplo, una placa de microtitulación. A este respecto, la secuencia diana también puede hibridarse previamente en disolución con una sonda de captura y después la sonda de captura se une a una fase sólida. Generalmente, por lo menos una sonda o por lo menos un cebador está marcado en la amplificación o ácido nucleico que va a detectarse.

25 El documento WO 2007/056680 A describe un procedimiento y matrices para la detección de la microflora humana, entre otros también secuencias de oligonucleótidos para la detección de periodontitis.

30 Además, el documento WO 89/06704 A describe oligonucleótidos que están asociados a gérmenes asociados a periodontitis, especialmente las secuencias de oligonucleótidos Bf-3B, Bg-3B y Bi-5B. También tiras reactivas constituidas por una fase sólida a la que está unida la al menos una sonda de oligonucleótidos sin marcar que se une específicamente al ARNr 16S o al ARNr 23S de la bacteria que va a detectarse. Además, se describe un procedimiento para la detección de bacterias asociadas a enfermedades periodontales, lisándose una muestra obtenida de la boca de un paciente e hibridándose el ARNr liberado con sondas específicas de la especie. La detección de los complejos de hibridación muestra la presencia de una bacteria correspondiente en la muestra.

35 Por tanto, es objetivo de la presente invención poner a disposición un procedimiento y un dispositivo para la detección y/o determinación de bacterias asociadas a periodontitis, presentándose rápidamente el resultado y siendo el dispositivo fácil de fabricar y de manipular.

40 El objetivo según la invención se alcanza respectivamente independientemente por un procedimiento para la detección y/o para la determinación de bacterias asociadas a periodontitis de una muestra biológica con al menos uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5; por una unidad microfluidica que comprende un soporte de al menos una parte de fondo con una superficie y al menos un oligonucleótido o molécula de ácido nucleico unida a la superficie del soporte, caracterizada porque está unida al menos uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5, así como opcionalmente al menos otro oligonucleótido que se selecciona del grupo que contiene: i) oligonucleótido de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, ii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos mutada en comparación con uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, especialmente una adición o delección

de 1 a 10 nucleótidos o una sustitución de 1 a 3 nucleótidos en una de las secuencias de nucleótidos, iii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es complementaria al menos por zonas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8; así como por un kit que comprende a) al menos un soporte, preferiblemente un dispositivo microfluidico, con al menos un oligonucleótido inmovilizado o una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5, así como opcionalmente al menos otro oligonucleótido que se selecciona del grupo que contiene: i) oligonucleótido de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, ii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos mutada en comparación con uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, especialmente una adición o deleción de 1 a 10 nucleótidos o una sustitución de 1 a 3 nucleótidos en una de las secuencias de nucleótidos, iii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es complementaria al menos por zonas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8; y b) al menos un recipiente con una solución universal que comprende al menos un reactivo caotrópico, así como al menos un oligonucleótido.

A este respecto resulta ventajoso que mediante las secuencias específicas de la especie es posible una identificación exacta de las bacterias y, por tanto, puede realizarse una clara asignación a un patrón patológico.

En un perfeccionamiento, el procedimiento comprende las siguientes etapas: a) transferencia de la muestra biológica a una solución universal en un recipiente, estando contenido al menos un oligonucleótido de tipo sándwich, preferiblemente el oligonucleótido de SEQ ID N° 6, b) desnaturalización de la muestra, especialmente mediante calentamiento del contenido del recipiente, c) transferencia de al menos una parte de la solución a o sobre un soporte con al menos un oligonucleótido inmovilizado de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5 y dado el caso de SEQ ID N° 1, 2, 3, 7 y/u 8, d) hibridación y dado el caso incubación, y e) detección. A este respecto resulta ventajoso que la muestra biológica se marca mediante el oligonucleótido de SEQ ID N° 6 que se une a una región altamente conservada y que mediante las sondas específicas de la especie que están inmovilizadas sobre el soporte pueden unirse y detectarse y asignarse determinadas bacterias. Un control de la hibridación o general del procedimiento puede realizarse mediante secuencias de control como el oligonucleótido de SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 8.

El procedimiento se mejora mediante la aplicación en o sobre el soporte de al menos otra solución de reacción como solución de marcado, solución enzimática, solución de lavado, solución de reacción colorimétrica, pudiendo evitarse, por ejemplo, en la detección señales interferentes mediante la solución de lavado o pudiendo reducirse el límite de detección mediante una solución enzimática y de reacción colorimétrica correspondiente.

El análisis de un ácido nucleico contenido en la muestra biológica se realiza por hibridación con al menos una sonda, seleccionándose la sonda de un grupo que contiene i) oligonucleótido de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5. A este respecto resulta ventajoso que la detección y/o la determinación de esas bacterias asociadas a periodontitis puede conseguirse muy rápidamente, preferiblemente en menos de 15 min. Además, es ventajoso que el procedimiento de detección sea muy sensible y que las bacterias ya puedan detectarse en un número de menos de  $10^5$  bacterias. Además de la rápida operabilidad del procedimiento, éste también es muy barato y permite una sencilla manipulación, no siendo necesario ningún equipo de laboratorio especial. Por tanto, el procedimiento según la invención también puede realizarse en una consulta del dentista y comunicarse inmediatamente el resultado al probando incluso en la misma cita. La detección del analito es posible mediante valoración visual.

Como soporte puede usarse un sistema capilar como tiras reactivas o dispositivo microfluidico, por lo que puede usarse un sencillo dispositivo para la detección de gérmenes asociados a periodontitis debido a que para el transporte de la muestra no se necesita ningún coadyuvante adicional como, por ejemplo, un aparato alimentado por red para el ajuste y/o la regulación de la corriente y/o tensión o similares.

Como sonda puede usarse un oligonucleótido o molécula de ácido nucleico que es una molécula de ADN, ARN, PNA, LNA o una forma mixta debido a que los oligonucleótidos de LNA, así como las moléculas de PNA, se corresponden con el modelo de Watson-Crick y se hibridan con oligonucleótidos complementarios. Las moléculas dobles de LNA/ADN o LNA/ARN muestran elevada estabilidad térmica en comparación con moléculas dobles similares que están formadas exclusivamente por ADN o ARN.

Resulta ventajoso que la muestra biológica representa una muestra de placa subgingival, especialmente del periodoncio, debido a que, por tanto, ésta puede obtenerse mediante procedimientos no invasivos y, por tanto, cualquier persona puede obtenerla en cualquier momento.

Además, resulta ventajoso que la superficie orientada a la muestra biológica del dispositivo microfluidico está hidrofílica al menos por zonas, especialmente está modificada con polimerización con plasma, por lo que se hace posible un transporte de líquido capilar de la muestra biológica a un dispositivo microfluidico, o al menos se facilita mucho. A este respecto resulta de forma especialmente ventajosa que el transporte de líquido capilar transcurre continuamente y no produce ninguna rotura de la corriente de líquido en el canal del dispositivo microfluidico.

Al menos un elemento de extracción de muestra estéril, preferiblemente una punta de papel, raspador, espátula o

similares, se inserta en un fondo de la bolsa y dado el caso puede permanecer allí, por lo que mediante un objeto sencillo pero que no sea afilado ni cortante, puede obtenerse una muestra biológica que no provoca ninguna herida ni lesiona adicionalmente el tejido posiblemente fuertemente afectado o atacado.

5 En la solución universal está contenido preferiblemente un reactivo caotrópico como sales de guanidinio como isotiocianato de guanidinio, formamida, urea, perclorato, tiocianato, tricloroacetato, nitrato, yoduro, etc. en una concentración de 0,1 M a 10 M, por lo que se consiguen condiciones restrictivas para una hibridación a temperatura ambiente y, por otra parte, puede realizarse la lisis celular. La aplicación de sustancias teratogénicas está obsoleta debido al uso de tiocianato de guanidinio o urea y, por tanto, se evitan las lesiones en las personas que manipulan la solución.

10 Además, resulta ventajoso que en la solución universal está contenida una marca, especialmente mediante el oligonucleótido marcado de SEQ ID N° 6 para la muestra biológica, por lo que ya en una etapa de trabajo puede realizarse tanto la lisis de la muestra biológica como también el marcado del ácido nucleico.

15 Muchas de las etapas, especialmente la hibridación, pueden realizarse a temperatura ambiente, por lo que se confirma la posibilidad como prueba de Side-Chair y sólo es necesaria una fuente de calentamiento para la realización de una etapa de trabajo (lisis).

Se prevé calentar los recipientes a una temperatura de al menos 50 °C por lo que, por una parte, se favorece la disgregación celular de la muestra biológica y, por otra parte, se desnaturalizan las moléculas de ácido nucleico.

20 La transferencia de la muestra biológica todavía calentada se realiza preferiblemente sobre el soporte, preferiblemente el dispositivo microfluídico, mediante una pipeta o capilar, por lo que se garantiza que la muestra biológica todavía esté presente en estado desnaturalizado.

Puede realizarse una incubación durante una duración de 1 min a 10 min, por lo que está a disposición un periodo de tiempo suficientemente largo para encontrar moléculas de ácido nucleico complementarias entre sí.

25 Además, se prevé que la solución enzimática, de lavado y de reacción colorimétrica se aplique respectivamente con una botella cuentagotas y el dispositivo microfluídico se incuba con la solución respectiva preferiblemente durante una duración de 5 s a 10 min, por lo que pueden transcurrir las reacciones necesarias para la detección visual del analito.

30 En una forma de realización preferida, la detección se realiza colorimétricamente, añadiéndose a la reacción colorimétrica mezclas de reacción de tetrametilbencidina habituales en el comercio de tetrametilbencidina, preferiblemente disuelta en polivinilpirrolidona, por lo que la señal visual se amplifica mediante la formación de colores complementarios.

Además, se prevé que el procedimiento se utilice para el diagnóstico y/o el reconocimiento temprano de enfermedades, precursores de enfermedad, riesgos de enfermedad y/o modificaciones patológicas que se basan en bacterias causantes de periodontitis, por lo que ya prematuramente puede apreciarse el riesgo de una enfermedad de periodontitis.

35 Mediante la selección de secuencias específicas para las cepas de bacterias *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* y *Haemophilus actinomycetemcomitans* se garantiza que esas bacterias que realmente se asocian a periodontitis se detecten en la cavidad bucal o en la bolsa dental.

40 Mediante el uso de la sonda universal de SEQ ID N° 8 se detectan en la medida de lo posible todas las bacterias existentes en la cavidad bucal. Así se garantiza que puedan detectarse todas las bacterias que se encuentran en la bolsa dental aunque no presenten ninguna secuencia complementaria a los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 7.

45 Además, se prevé que en la superficie del soporte del dispositivo microfluídico esté dispuesto un control como control positivo, negativo, de orientación, de hibridación y/o de reacción colorimétrica o similares mediante el cual pueda detectarse que la prueba funcionó en sí, pero que, por ejemplo, no tuvo lugar la unión en las sondas específicas de bacterias, en la muestra biológica no existen bacterias asociadas a periodontitis.

50 Además, resulta ventajoso que en el kit está contenida al menos otra solución de reacción como solución de lavado, enzimática, de reacción colorimétrica y/o similar, por lo que ya todos los reactivos que son necesarios para la realización del análisis o para la determinación y para la detección de las bacterias asociadas a periodontitis están contenidos en el kit y no deben comprarse por separado reactivos adicionales.

Sólo es necesario que el usuario ponga a disposición una fuente de calentamiento para la muestra biológica para conseguir una temperatura de al menos 50 °C para la disgregación celular o para la desnaturalización del ácido nucleico. El procedimiento según la invención hace posible una detección de bacterias asociadas a periodontitis sin tener que realizar previamente una amplificación como se sabe por el estado de la técnica.

5 Es de observar introductoramente que en las distintas formas de realización descritas partes iguales se proveen de nombres iguales, pudiendo transferirse las revelaciones contenidas en toda la descripción conforme al sentido a partes iguales con los mismos nombres. Los datos de posición elegidos en la descripción como, por ejemplo, arriba, abajo, lateralmente, etc., también se refieren a la figura inmediatamente descrita, así como representada, y éstos deben transferirse a la nueva posición en un cambio de posición conforme al sentido. Además, también pueden  
10 representarse características individuales o combinaciones de características de los diferentes ejemplos de realización mostrados y descritos de soluciones independientes, inventivas o según la invención.

Todos los datos sobre los intervalos de valores en la descripción figurativa deben entenderse de forma que éstos comprendan intervalos discretos y todos los intervalos parciales de los mismos, por ejemplo, el dato 1 a 10 debe entenderse de forma que estén comprendidos todos los intervalos parciales, a partir del límite inferior 1 y del  
15 límite superior 10, es decir, todos los intervalos parciales empiezan con un límite inferior de 1 o superior y terminan en un límite superior de 10 o inferior, por ejemplo, 2 a 9 ó 4 a 7 ó 5 a 6.

Se extrae una muestra de placa subgingival del sitio respectivamente más profundo de la bolsa periodontal, dado el caso con sangrado en el sondaje y/o supuración, preferiblemente en cada cuadrante. Se evitan sitios que sangran  
20 agudamente y/o que supuran fuertemente. La muestra biológica preferiblemente la obtiene el dentista o su ayudante del fondo de la bolsa con una punta de papel. También pueden usarse otros agentes para la extracción de muestras como un bastoncillo de algodón, torunda, raspador, etc.

También pueden obtenerse varias muestras biológicas e introducirse conjuntamente al procedimiento según la invención. Sin embargo, resulta ser ventajoso usar como máximo 2 puntas de papel por pasada de prueba, por lo que como máximo se reúnen 2 sitios de extracción distintos dando una muestra mixta y se aplican sobre el soporte.  
25 Si tienen que probarse más sitios, entonces las otras puntas de papel se introducen preferiblemente en otros tubos de ensayo y se usa un nuevo soporte. Si el procedimiento según la invención debe usarse para fines de cribado, la extracción de muestras se realiza preferiblemente con un raspador.

Después de la desecación y la extracción de la placa supragingival, el sitio de extracción se aísla con rollitos de algodón para extraer placas subgingivales. Después, las puntas de papel estériles se desplazan con unas pinzas hasta el fondo de la bolsa y allí se dejan durante aproximadamente 15 segundos (s). Las puntas de papel se extraen  
30 de nuevo con las pinzas y se introducen al tubo de ensayo. En el tubo de ensayo se encuentra la solución universal o se dispone o ésta se añade. La punta de papel puesta en contacto con la muestra biológica debe sumergirse en la solución en el tubo de ensayo. Se usa preferiblemente un tubo de ensayo de 500 µl en el que está dispuesta una alícuota de la solución universal, preferiblemente entre 10 µl y 300 µl. El tubo de ensayo se cierra y se mezcla, por ejemplo, se sacude vigorosamente y/o se remueve con vórtex, se agita, se resuspende, etc. Finalmente se reúne el líquido en el fondo del tubo de ensayo y el líquido junto con la muestra biológica se calienta en el tubo de ensayo. El tubo de ensayo se calienta preferiblemente a una temperatura seleccionada de un intervalo con un límite inferior de 72 °C y un límite superior de 100 °C, preferiblemente 90 °C, especialmente 95 °C. Para conseguir una lisis y desnaturalización completa de la muestra biológica se calienta preferiblemente durante un periodo de tiempo de al  
40 menos 10 s a como máximo 5 min.

Después del calentamiento, el líquido todavía caliente se extrae y se aplica sobre el soporte, preferiblemente el orificio de entrada de muestras del dispositivo microfluídico.

El dispositivo microfluídico comprende al menos una parte de fondo y/o una parte de tapa. Sobre o en la parte de fondo y/o la parte de tapa está dispuesto un canal. El canal conecta el orificio de entrada de muestras con una  
45 ampliación dispuesta en el extremo opuesto al orificio de entrada de muestras.

La extracción de la muestra se realiza preferiblemente mediante una pipeta o capilar. A la muestra biológica o al líquido se le da la posibilidad de ser aspirado por fuerza capilar en el canal del dispositivo microfluídico. Para esto se realiza una incubación de al menos 10 s, preferiblemente de al menos 1 min.

Después de este tiempo de incubación, en el orificio de entrada de muestras del dispositivo microfluídico se aplica una solución enzimática. De nuevo, después de una incubación de al menos 10 s, aspirándose en ese momento la solución enzimática también en el canal, en el orificio de entrada de muestras del dispositivo microfluídico se aplica, por ejemplo, una solución de lavado y de nuevo se incuban para hacer posible una aspiración del líquido en el canal.

Finalmente, la solución de reacción colorimétrica se aplica sobre el orificio de entrada de muestras del dispositivo

microfluídico y puede esperarse la reacción colorimétrica hasta la visibilidad óptima de la señal.

5 La aplicación de la solución enzimática, de la solución de lavado y de la solución de reacción colorimétrica puede realizarse mediante una pipeta o una botella cuentagotas. Dependiendo de la duración de las etapas de incubación individuales, el procedimiento según la invención ya termina después de 1 min a 2 min. No obstante, los tiempos de incubación también pueden prolongarse de forma que el resultado del análisis se presente sólo después de 10 o más minutos. El resultado del análisis puede leerse visualmente o escanearse o valorarse en un escáner de mesa.

La solución universal comprende al menos un reactivo caotrópico, así como al menos un oligonucleótido. La solución universal puede contener, por ejemplo, tiocianato de guanidinio, Tris-HCl, ADN y un oligonucleótido marcado. Soluciones similares se conocen, por ejemplo, por el documento US 5.334.501.

10 La solución enzimática comprende un estabilizador de conjugado de peroxidasa y estreptavidina-peroxidasa.

Para preparar la solución de lavado se pesan cloruro sódico, citrato de sodio y Proclin 200 y se proveen de agua.

Para la preparación de la solución de reacción colorimétrica se mezclan TMB y solución de TMB/PVP y Proclin 200 o también puede usarse una solución de TMB que forma precipitado que puede obtenerse comercialmente.

15 Como secuencias de oligonucleótidos se usan preferiblemente las secuencias mencionadas a continuación, usándose al menos 15 de los nucleótidos sucesivos especificados del oligonucleótido respectivo, sus secuencias complementarias y/o mutadas o similares.

20 La sonda de tipo sándwich sirve para marcar el ARNr 16S de la muestra biológica. Está marcado con biotina en el extremo 5'. La sonda de tipo sándwich presenta la secuencia 5'-CATCG AATTA AACCA CATGY TCCWC CGCTT GT-3' (SEQ ID N° 6). La sonda de tipo sándwich se une a la muestra biológica y, debido a que la propia sonda de tipo sándwich está marcada, también se marca la muestra biológica. La muestra biológica se marca preferiblemente mediante el oligonucleótido de SEQ ID N° 6 en la solución universal. El propio oligonucleótido de SEQ ID N° 6 lleva el marcado/marca. Este marcado puede o bien detectarse por sí mismo (directamente) o bien detectarse mediante otras etapas de unión (indirectamente).

25 Como secuencia de la sonda de control para el control de la hibridación se usa un oligonucleótido con la secuencia 5'-ACAAG CGGWG GARCA TGTGG TTTAA TCGA TG-3' (SEQ ID N° 7). La SEQ ID N° 7 es parcialmente complementaria a SEQ ID N° 6 y, por tanto, sirve de control y está preferiblemente inmovilizada sobre el soporte.

Como control para el conjugado enzimático se usa un oligonucleótido biotinilado con secuencia discrecional o un derivado de biotina que reacciona con la superficie.

30 Los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1 a 5 son sondas específicas de bacterias. Para la detección de la cepa de bacterias *Tannerella forsythensis* se usa un oligonucleótido con la secuencia 5'-AAGAA AGCTC TCACT CTCCG TCGTC TA-3' (SEQ ID N° 1).

Como sonda específica para *Porphyromona gingivalis* se usa un oligonucleótido con la secuencia 5'-CGCTG TGGAA GCTTG ACGGT ATATC GCAAA CTC-3' (SEQ ID N° 2).

35 Para la detección de la cepa de bacterias *Prevotella intermedia* se usa un oligonucleótido con la secuencia 5'-AGTCA ACATC TCTGT ATCCT GCGTC TGCA-3' (SEQ ID N° 3).

Como oligonucleótido específico para la cepa de bacterias *Treponema denticola* se usa un oligonucleótido con la secuencia 5'-AAGA GCCGT ATTGC TACGC TGCCA TATCT CTA-3' (SEQ ID N° 4).

Como sonda específica de la cepa de bacterias para la detección de *Haemophilus actinomycetemcomitans* se usa el oligonucleótido con la secuencia 5'-GTCTC AAGC TCCCT AAGGC TCAAA CCCAT C-3' (SEQ ID N° 5).

40 La sonda universal que detectará en la medida de lo posible todas las cepas de bacterias existentes en la cavidad bucal y que también sirve de sonda de control, presenta la secuencia 5'-CCCGT CAATT CMTT GAGTT TYAMC STTGC-3' (SEQ ID N° 8). La sonda universal también está preferiblemente inmovilizada sobre el soporte.

45 Para el marcado de la muestra biológica se usa un reactivo de marca que está constituido preferiblemente por una marca, un grupo reactivo y por un ligador entre los dos grupos. Los grupos reactivos son psoralenos, arilazidas, grupos reactivos de los compuestos de las mostazas (Label-IT), complejos de cis-platino (Universal Label System), etc., o, por ejemplo, se usa un oligonucleótido de tipo sándwich que se hibrida con una posición de la sonda distinta de la específica sobre la diana.

Además de los procedimientos de detección visuales, especialmente colorimétricos, anteriormente descritos con

5 tetrametilbencidina (TMB), todavía pueden usarse otros reactivos como diaminobencidina (DAB), diaminobencidina con posterior reacción del espejo de plata, potenciamiento con plata (amplificación) sobre nanopartículas de oro, sustratos habituales para peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina, etc. Un procedimiento de detección basado en luminiscencia se consigue, por ejemplo, en la generación de luz mediante la degradación de luminol mediante peroxidasa de rábano picante. La detección de esta luz se realiza mediante papel fotográfico o fotodiodos.

10 Para mejorar el procedimiento de detección colorimétrico, especialmente el procedimiento de tetrametilbencidina, se propone lo siguiente: la oxidación de TMB por HRP y peróxido de hidrógeno transcurre durante dos etapas. Primero se forma un complejo a partir de una molécula de TMB oxidada y una sin oxidar que está intensamente teñida de azul. En la siguiente reacción, la TMB se oxida dando un producto amarillo. En mezclas de reacción de TMB que pueden obtenerse comercialmente, el peróxido de hidrógeno está presente en un exceso molar. Por tanto, la reacción transcurre empezando en un producto intermedio azul hasta el producto final amarillo. Por tanto, el color cambia de azul a amarillo pasando por verde. Mediante la introducción de TMB a esta mezcla de reacción, la reacción puede detenerse en el producto intermedio azul. Para esto se añade TMB disuelto en el 1 % de polivinilpirrolidona. La reacción se detiene ahora en el producto intermedio azul mejor visible para el ojo.

15 Como se ha mencionado, la superficie del soporte debe ser hidrófila para poder aspirar el líquido en el canal y al mismo tiempo se mejora la unión de ácido nucleico. También resulta ser ventajoso que pueda usarse el procedimiento de hidrofiliación usado para la modificación de superficies de plástico. Esta hidrofiliación necesaria se consigue tanto por la polimerización por plasma como también, por ejemplo, mediante modificaciones superficiales conocidas por el estado de la técnica como, por ejemplo, de la empresa PolyAn. En el caso de una superficie sin funcionalizar, el líquido queda en el orificio de entrada de muestras y no se lleva a cabo ningún transporte de líquido capilar.

20 Además, mediante la hidrofiliación de la superficie del soporte del dispositivo microfluídico, especialmente la polimerización por plasma, resulta una coloración amarilla de la superficie de lo contrario blanca del soporte del dispositivo microfluídico. Esta coloración amarilla amplifica la señal, ya que el color del precipitado, como ya se ha mencionado previamente, es azul. Así, con el color complementario amarillo resulta, dado el caso, una coloración más oscura del precipitado.

25 En experimentos comparativos entre la polimerización por plasma y el tratamiento de la superficie del soporte con PolyAn para la hidrofiliación pudo constatarse que con la polimerización por plasma pudieron conseguirse propiedades de inmovilización al menos exactamente tan buenas como las propiedades de hibridación de las sondas de ADN inmovilizadas. Además, pudo constatarse que mediante la polimerización por plasma se realiza una adsorción no específica más baja de ácidos nucleicos como también de proteínas sobre la superficie del dispositivo microfluídico. La realización de una modificación superficial mediante polimerización por plasma se describe en la solicitud de patente austriaca A0 1619/2007 de la solicitante y, por tanto, su contenido figura entre el alcance de esta solicitud.

35 Ejemplo de aplicación:

40 La muestra extraída por el dentista con una punta de papel se pone en un tubo de ensayo de 500  $\mu$ l y se mezcla con 60  $\mu$ l de solución universal. El tubo de ensayo se cierra y se sacude vigorosamente durante 20 s. Debido al movimiento de sacudida, el líquido se reúne en la punta del tubo de ensayo y se calienta durante 1 min en un bloque de calentamiento a 95 °C. El líquido caliente a 95 °C se extrae inmediatamente con una pipeta Pasteur y 1 gota se añade sobre el dispositivo microfluídico. Después de un tiempo de incubación de 1 min se añaden gota a gota en el orificio de entrada de la plataforma 20  $\mu$ l de solución enzimática. Después de aspirarse ésta (aproximadamente 30 s), se añaden 20  $\mu$ l de solución de lavado y se espera de nuevo hasta la aspiración completa del líquido. Finalmente se añade la solución de reacción colorimétrica y se espera la reacción colorimétrica hasta la visibilidad óptima de las bandas. La reacción termina después de aproximadamente 2 min y el resultado del análisis se lee visualmente, así como se escanea con un escáner de mesa.

45 El ejemplo de realización muestra una posible variante de realización del procedimiento según la invención, siendo en este punto de mencionar que la invención no está limitada a la variante de realización especialmente citada de la misma, sino que más bien se define por las reivindicaciones.



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Greiner Bio - One GmbH

Maybachstrasse 2

D 72636 Frickenhausen

5 ALEMANIA

<120> Detección de gérmenes asociados a periodontitis

<160> 8

<210> 1

<211> 27

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 1

15 aagaaagctc tcactctccg tcgtcta 27

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 2

cgctgtggaa gcttgacggt atatcgaaa ctc 33

<210> 3

25 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

30 <400> 3

agtcaacatc tctgtatcct gcgtctgca 29

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
<400> 4  
aagagccgta tgctacgct gccatatctc ta 32

5 <210> 5  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
<400> 5  
gtctcaaagc tccctaaggc tcaaaccat c 31  
<210> 6  
<211> 32

15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
<400> 6

20 catcgaatta aaccacatgy tccwccgctt gt 32  
<210> 7  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido  
<400> 7  
acaagcggwg garcatgtgg ttaattcga tg 37  
<210> 8

30 <211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

35 <400> 8

cccgtaatt cmttgagtt tyamcsttgc 30

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la detección y/o para la determinación de bacterias asociadas a periodontitis de una muestra biológica, que comprende las etapas i) obtención de la muestra biológica, ii) desnaturalización de la muestra biológica, especialmente células, iii) hibridación de la muestra lisada con al menos uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5 sobre un soporte y iv) detección del resultado.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la detección y/o la determinación comprende las etapas de a) transferencia de la muestra biológica a una solución universal que contiene reactivos caotrópicos y al menos el oligonucleótido de SEQ ID N° 6 en un recipiente, b) desnaturalización de la muestra, especialmente mediante calentamiento del recipiente, c) transferencia de al menos una parte de la solución a o sobre un soporte con al menos un oligonucleótido inmovilizado de SEQ ID N° 5 y dado el caso adicionalmente de SEQ ID N° 7, 1 a 3 y/u 8, d) hibridación y dado el caso incubación y e) detección.
- 15 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la hibridación se realiza adicionalmente con al menos una sonda, seleccionándose la sonda del grupo que contiene: i) oligonucleótido de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, ii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos mutada en comparación con uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, especialmente una adición o delección de 1 a 10 nucleótidos o una sustitución de 1 a 3 nucleótidos en una de las secuencias de nucleótidos, iii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es complementaria al menos por zonas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8.
- 20 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque como soporte se usa un sistema capilar, preferiblemente una tira reactiva o un dispositivo microfluídico.
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 4, caracterizado porque el oligonucleótido usado como sonda es una molécula de ADN, ARN, PNA, LNA o una forma mixta de las mismas.
- 25 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en la solución universal están contenidas como reactivo caotrópico sales de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, formamida, urea, perclorato, tiocianato, tricloroacetato, nitrato o yoduro, preferiblemente en una concentración de 0,1 M a 10 M.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en la solución universal se realiza el marcado de la muestra biológica, especialmente mediante el oligonucleótido marcado de SEQ ID N° 6.
- 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la hibridación se realiza a temperatura ambiente.
- 30 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la desnaturalización de la muestra se realiza a una temperatura seleccionada de un intervalo con un límite inferior de 50 °C y un límite superior de 100 °C.
- 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la transferencia de la muestra biológica preferiblemente todavía calentada sobre el dispositivo microfluídico se realiza mediante una pipeta o capilar.
- 35 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la muestra biológica se aplica sobre el dispositivo microfluídico sin amplificación previamente realizada.
- 40 12.- Dispositivo microfluídico para la detección y/o para la determinación de al menos un germen asociado a periodontitis de una muestra biológica que comprende un soporte de al menos una parte de fondo con una superficie y al menos un oligonucleótido o molécula de ácido nucleico unido a la superficie del soporte, caracterizado porque está unido al menos uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5, así como opcionalmente al menos otro oligonucleótido que se selecciona del grupo que contiene: i) oligonucleótido de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, ii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos mutada en comparación con uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, especialmente una adición o delección de 1 a 10 nucleótidos o una sustitución de 1 a 3 nucleótidos en una de las secuencias de nucleótidos, iii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es complementaria al menos por zonas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8.
- 45 13.- Dispositivo microfluídico según la reivindicación 12, caracterizado porque al menos un oligonucleótido de control, preferiblemente un oligonucleótido de control positivo, negativo, de orientación, de hibridación, de reacción colorimétrica, está dispuesto sobre la superficie del soporte.
- 50 14.- Kit para la detección y/o para la determinación de al menos un germen asociado a periodontitis de una muestra biológica que comprende a) al menos un soporte, preferiblemente un dispositivo microfluídico, con al menos un

5 oligonucleótido inmovilizado o una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5, así como opcionalmente al menos otro oligonucleótido que se selecciona del grupo que contiene: i) oligonucleótido de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, ii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos mutada en comparación con uno de los oligonucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8, especialmente una adición o delección de 1 a 10 nucleótidos o una sustitución de 1 a 3 nucleótidos en una de las secuencias de nucleótidos, iii) oligonucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es complementaria al menos por zonas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 1, 2, 3, 6, 7 u 8; y b) al menos un recipiente con una solución universal que comprende al menos un reactivo caotrópico, así como al menos un oligonucleótido.