

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/064824 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01439
- (22) Internationales Anmeldedatum:
12. Februar 2002 (12.02.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 06 370.9 12. Februar 2001 (12.02.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): VERMICON AG [DE/DE]; Emmy-Noether-Strasse
2, 80992 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TREBESIOUS,
Karlheinz [DE/DE]; Emmy-Noether-Strasse 2,
80992 München (DE). SNAIDR, Jiri [DE/DE];
Emmy-Noether-Strasse 2, 80992 München (DE).
- (74) Anwalt: NEUEFEIND, Regina; Maiwald Patentanwalts
GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE PROBES USED TO DETECT PARODONTOPATHOGENIC BACTERIA BY <I>IN SITU</I>
HYBRIDIZATION

(54) Bezeichnung: OLIGONUKLEOTIDSONDEN ZUR DETEKTION VON PARODONTOPATHOGENEN BAKTERIEN MIT-
TELS IN SITU-HYBRIDISIERUNG

(57) Abstract: The invention relates to oligonucleotide probes used for the species-specific identification of parodontopathogenic bacteria by *in situ* hybridization. The invention further relates to oligonucleotide probe compositions used to identify said parodontopathogenic bacteria, to a method for reliably identifying parodontopathogenic bacteria in human samples from the oral region and to kits for carrying out said methods.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mittels in situ-Hybridisierung, Oligonukleotidsonden-Zusammensetzungen zum Nachweis derartiger parodontopathogener Bakterien, Verfahren zum sicheren Nachweis von parodontopathogenen Bakterien in humanen Proben aus dem Mundbereich sowie Kits zur Durchführung derartiger Verfahren.



WO 02/064824 A2

Oligonukleotidsonden zur Detektion von parodontopathogenen Bakterien mittels in situ-Hybridisierung

- 5 Die Erfindung betrifft Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mittels in situ-Hybridisierung, Oligonukleotidsonden-Zusammensetzungen zum Nachweis derartiger parodontopathogener Bakterien, Verfahren zum sicheren Nachweis von parodontopathogenen Bakterien in humanen Proben aus dem Mundbereich sowie Kits zur Durchführung derartiger
- 10 Verfahren.

Trotz Verbesserungen bei der Mundhygiene und neuer therapeutischer Verfahren ist die Parodontitis, auch Parodontose genannt, nach wie vor eine weitverbreitete Krankheit. Nach der Deutschen Mundgesundheitsstudie 1999 lassen sich bei 14,1 %

15 der Altersgruppe 35 - 44 Jahre schwere Parodontopathien nachweisen. Unter den 65 - 74-jährigen weist sogar jeder 4. eine schwere Parodontitis auf.

Ursache für den fortschreitenden Abbau des Zahnhalteapparates, der bei Nichtbehandlung unweigerlich mit dem Verlust der befallenen Zähne endet, sind

20 bakterielle Beläge, sog. Plaque, im Zahn und Wurzelbereich. Während früher davon ausgegangen wurde, daß die Zunahme an bakterieller Plaque allgemein für die Entstehung der Parodontitis verantwortlich ist (unspezifische Plaque-Hypothese), ist mittlerweile aus einer Reihe von fundierten Untersuchungen bekannt, daß nur wenige

25 der weit über 500 bakteriellen Spezies im Mundraum mit der Entstehung von Parodontitis assoziiert sind. Besonders stark in die Entstehung dieser Krankheit involviert sind *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Bacteroides forsythus* (Slots, J., M. Ting, Periodontol. 2000, 20: 82-121; Socransky, S. S., A. D. Haffajee, L. A. Ximenez-Fyvie, M. Feres, D. Mager, Periodontol. 2000, 20: 341-62; Carlos, J. P., M. D. Wolfe, J. J. Zambon, A. Kingman, J. Dent. Res. 1988, 67: 1510-

30 4; Lai, C. H., M. A. Listgarten, M. Shirakawa, J. Slots, Oral Microbiol. Immunol. 1987, 2: 152-7; Gmur, R., J. R. Strub, B. Guggenheim, J. Periodontal. Res. 1989, 24:

113-20). Ein wesentlicher parodontopathogener Keim ist ferner *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, der vor allem bei aggressiven Verlaufsformen der Parodontitis zu finden ist (Slots, J., M. Ting, Periodontol. 2000, 20: 82-121).

- 5 Während diese Bakterien auch bei Gesunden in geringen Zahlen vorkommen, kommt es beim Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zur Auslösung des Krankheitsgeschehens. D.h. erst wenn der Anteil parodontopathogener Bakterien einen definierten Anteil an der Gesamtflorea ausmacht, kommt es bei entsprechender Prädisposition des Wirtes zu einer Parodontitis.

10

- Zum Nachweis relevanter Mikroorganismen stehen mittlerweile eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung. Als Standardmethode gilt der kulturelle Nachweis dieser Bakterien mittels künstlicher Nährmedien. Diese Methode erlaubt sowohl die Quantifizierung als auch eine Bestimmung des Anteils der relevanten Bakterien an
- 15 der kultivierbaren Mikroflora der parodontalen Probe. Da es sich allerdings bei den parodontopathogenen Bakterien um anaerobe und mikroaerophile Organismen handelt, die hinsichtlich ihrer Anzuchtbedingungen sehr spezielle Ansprüche stellen, müssen für die Probenahme, die Verarbeitung des Materials und die Anzucht dieser Organismen spezielle Verfahren und Geräte, insbesondere die Anaerobier-
- 20 technik verwendet werden. Ein derartiger Nachweis dieser parodontalen Leitkeime durch Kultivierung ist nicht nur personal- und arbeitsintensiv, sondern dauert mit durchschnittlich 10 bis 14 Tage auch vergleichsweise lange.

- Die Verwendung von immunologischen Methoden ist für die Detektion von
- 25 parodontopathogenen Bakterien ebenfalls prinzipiell geeignet (Bonta, Y., J. J. Zambon, R. J. Genco, M. E. Neiders, J Dent Res. 1985, 64: 793-8). Das Auftreten von Kreuzreaktivitäten führt bei dieser Methode allerdings häufig zu falsch positiven Ergebnissen.

- Bei der Verwendung von molekularbiologischen Methoden gibt es prinzipiell zwei verschiedene Möglichkeiten, nämlich zum einen Hybridisierungstechniken, die direkt die Nukleinsäure von parodontopathogenen Bakterien detektieren und zum
- 5 anderen Amplifikationstechniken (z.B. Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Transcription-Mediated-Amplification-Techniken (TMA)), die bestimmte Erbsubstanzabschnitte von parodontalen Leitkeimen spezifisch vervielfältigen (Chen, C., J. Slots, Periodontol. 2000, 20: 53-64).
- 10 Mit Amplifikationstechniken lassen sich hochsensitiv und spezifisch Bakterien nachweisen. Allerdings sind diese Methoden, die alle auf einer enzymabhängigen Vervielfältigung beruhen, mit einer Reihe von Nachteilen behaftet, die ihre Umsetzung in der Routine behindern:
- a) In der Probe vorhandene Inhibitorsubstanzen wie z.B. die Häm-Gruppe des
- 15 Hämoglobins können eine Amplifikation be- oder sogar verhindern.
- b) Aufgrund der millionenfachen Vervielfältigung von Erbsubstanz ist die Gefahr von Kreuzkontaminationen hoch. Um dies zu vermeiden, sind aufwendige Schutzmaßnahmen erforderlich.
- c) Der personelle und apparative Aufwand ist beträchtlich.
- 20 d) In der Regel sind mit Amplifikationstechniken nur qualitative und keine quantitativen Aussagen möglich.
- e) Freie, nicht zellassoziierte DNA wird ebenfalls nachgewiesen, d.h. es erfolgt auch dann ein positiver Nachweis, wenn die nachzuweisenden Organismen tot sind.
- 25 Routinefähiger scheinen hier direkte Hybridisierungstechniken zu sein, da sie eine robuste und einfache Anwendung mit spezifischer und sensitiver Detektion verbinden. Das große Problem der Hybridisierungstechniken im Zusammenhang mit

parodontopathogenen Bakterien ist allerdings, daß eine verlässliche Quantifizierung der Bakterien nur schwer möglich ist.

Eine Ausnahme stellt diesbezüglich die rRNA-gerichtete in situ-Hybridisierung dar.

5 Mit dieser Technik lassen sich durch den gezielten Einsatz von verschiedenen Sonden nicht nur die Anzahl spezieller Mikroorganismen bestimmen, sondern auch kulturunabhängig deren Anteil an der Gesamtflora. Dies ist aufgrund des erforderlichen Schwellenwertes zur Auslösung von Parodontitis essentiell für eine aussagekräftige mikrobielle Diagnostik.

10

Zudem erlaubt beispielsweise die Detektion der in situ-Hybridisierung durch Fluoreszenz über die Helligkeit des Signals eine Aussage über die physiologische Aktivität der Bakterien und dient so zur Unterscheidung der inaktiven Bakterien, wie beispielsweise potentiellen Kontaminanten von anderen Mundbereichen, von der
15 physiologisch aktiven Subgingivalflora.

20

Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, daß die Bakterien in situ nachgewiesen werden können. So werden über die räumliche Assoziation der Bakterien miteinander oder durch Co-Lokalisation mit Immunzellen wichtige Erkenntnisse
über die Pathogenese der Parodontitis gewonnen.

25

Die einfache und schnelle Durchführbarkeit prädestiniert diese Methode für einen Routineeinsatz in einem Diagnostiklabor oder in der Zahnarztpraxis selbst. Erste Erfahrungen mit dem Verfahren der in situ-Hybridisierung zur Diagnostik von
parodontopathogenen Mikroorganismen sind bekannt. So konnten Gersdorf et al. (FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1993, 6: 109-14) bereits *P. gingivalis* und *B. forsythus* mit fluoreszenzmarkierten Sonden nachweisen. Durch Moter et al. (J. Clin. Microbiol. 1998, 36: 1399-403) wurden schwer und nicht kultivierbare Spirochäten

- 5 -

mit dieser Technik nachgewiesen. Die bekannten Sonden zum spezifischen Nachweis von *P. gingivalis* und *B. forsythus* mittels in situ-Hybridisierung weisen allerdings eine relativ geringe Sensitivität auf.

- 5 Ferner sind die im Stand der Technik offenbarten Sondensysteme für die in situ-Hybridisierung unvollständig. So werden die wichtigen parodontopathogenen Mikroorganismen *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia* nicht spezifisch erfaßt. Bereits bekannte spezifische Sonden für *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia*, die aufgrund ihrer Primärstruktur verwendet werden könnten, sind z.T.
- 10 für das Verfahren der in situ-Hybridisierung nicht geeignet, da ein Binden der Sonden an die native, ribosomale RNA durch ribosomale Proteine, die Bindungsstellen blockieren, oder blockierende Sekundärstrukturen in der rRNA verhindert wird.
- 15 Ferner weisen die bekannten, auf nur einer Hybridisierungssonde beruhenden Systeme eine relativ geringe Sensitivität auf. Parodontopathogene Leitkeime mit geringen Ribosomenzahlen lassen sich deshalb mit den im Stand der Technik beschriebenen Oligonukleotidsonden nicht oder nur schwer detektieren. Zudem kann das Vorliegen von Stamm-Stamm-Sequenz-Variabilität bei Verwendung von
- 20 Systemen, die lediglich auf einer Hybridisierungssonde beruhen, dazu führen, daß es in den hoch variablen Sondenzielregionen zu Fehlpaarungen kommt. Dadurch entstehen falsch negative Ergebnisse.

Ein weiterer Nachteil der in situ-Hybridisierung zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien gemäß dem Stand der Technik ist, daß die Auswertung

25 aufgrund der geringen Sensitivität nur mit einem teuren Fluoreszenzmikroskop erfolgen kann.

- 6 -

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit, unter Überwindung der Nachteile des Standes der Technik Oligonukleotidsonden bereitzustellen, die zum in situ-Nachweis von für die Entstehung von Parodontitis relevanten Bakterien mit sowohl hoher Spezifität als auch hoher Sensitivität geeignet sind. Ferner ist es eine Aufgabe
5 der vorliegenden Erfindung, ein schnelles und kostengünstiges Verfahren bereitzustellen, mit dem parodontale Leitkeime in humanen Proben aus dem Mundbereich sicher nachgewiesen werden können.

Weitere Aufgaben ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung der Erfindung.
10

Die oben genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst. Weitere Ausführungsformen ergeben sich aus den Merkmalen der Unteransprüche.

15 Erfindungsgemäß werden Oligonukleotidsonden bereitgestellt, die zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Arten *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* und *Prevotella intermedia* geeignet sind. Die Sequenzen der erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind in dem beigefügten Sequenzprotokoll mit
20 den Sequenzen SEQ ID No. 1-17 zusammengestellt. Darin entspricht

SEQ ID No. 1, 2 = AACT1, AACT2
SEQ ID No. 3-SEQ ID No. 5 = PGIN1-PGIN3
SEQ ID No. 6-SEQ ID No. 11 = BFOR1-BFOR6
25 SEQ ID No. 12-SEQ ID No. 17 = PINT1-PINT6.

Insbesondere werden erfindungsgemäß Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Actinobacillus*

- 7 -

actinomycetemcomitans durch in situ-Hybridisierung bereitgestellt, wobei die Oligonukleotidsonden komplementär zur rRNA von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sind und ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus:

a) DNA-Sequenz, umfassend

5 5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'

5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'

oder Teile davon;

b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser

10 Nukleinsäuresequenz umfaßt;

c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt.

Ferner werden erfindungsgemäß Oligonukleotidsonden zum artspezifischen

15 Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Porphyromonas gingivalis* durch in situ-Hybridisierung bereitgestellt, wobei die Oligonukleotidsonden komplementär zur rRNA von *Porphyromonas gingivalis* sind und ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus:

a) DNA-Sequenz, umfassend

20 5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'

5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'

5'-CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'

oder Teile davon;

b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser

25 Nukleinsäuresequenz umfaßt;

c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt.

Des weiteren werden erfindungsgemäß Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Bacteroides forsythus* durch in situ-Hybridisierung bereitgestellt, wobei die Oligonukleotidsonden komplementär

5 zur rRNA von *Bacteroides forsythus* sind und ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus:

a) DNA-Sequenz, umfassend

5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'

5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'

10 5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'

5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'

5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'

5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'

oder Teile davon;

15 b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;

c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt.

20

Schließlich werden erfindungsgemäß Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Prevotella intermedia* durch in situ-Hybridisierung bereitgestellt, wobei die Oligonukleotidsonden komplementär zur rRNA von *Prevotella intermedia* sind und ausgewählt sind aus der Gruppe,

25 bestehend aus:

a) DNA-Sequenz, umfassend

5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'

5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'

- 9 -

5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'

5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'

5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'

5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'

5 oder Teile davon;

b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;

c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt.

15 Einen einzigartigen Ansatz, die Spezifität der molekularbiologischen Methoden wie der PCR mit der Möglichkeit der Bakterienvisualisierung, wie sie die Antikörper-Methoden ermöglichen, zu verbinden, bietet die Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH; Amann, R. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial. Rev.* 59, S. 143-169). Hierbei können Bakterienarten, -gattungen oder -gruppen hochspezifisch identifiziert und visualisiert werden.

20 Die FISH-Technik basiert auf der Tatsache, dass es in Bakterienzellen bestimmte Moleküle gibt, die aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion im Laufe der Evolution nur wenig mutiert wurden: Die 16S und die 23S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNS). Beide sind Bestandteile der Ribosomen, den Orten der Proteinbiosynthese, und können aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer Größe, und ihrer
25 strukturellen und funktionellen Konstanz als spezifische Marker dienen (Woese, C. R., 1987. *Bacterial evolution. Microbiol. Rev.* 51, S. 221-271). Ausgehend von einer vergleichenden Sequenzanalyse können phylogenetische Beziehungen allein aufgrund dieser Daten aufgestellt werden. Dazu müssen diese Sequenzdaten in ein

Alignment gebracht werden. Im Alignment, welches sich auf Kenntnisse über die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur dieser Makromoleküle stützt, werden die homologen Positionen der ribosomalen Nukleinsäuren in Einklang miteinander gebracht.

5

Ausgehend von diesen Daten können phylogenetische Berechnungen durchgeführt werden. Der Einsatz modernster Computertechnologie macht es möglich, auch großangelegte Berechnungen schnell und effektiv auszuführen, sowie große Datenbanken, welche die Alignment-Sequenzen der 16S-rRNA und 23S-rRNA
10 beinhalten, anzulegen. Durch den schnellen Zugriff auf dieses Datenmaterial können neu erhaltene Sequenzen in kurzer Zeit phylogenetisch analysiert werden. Diese rRNA Datenbanken können dazu verwendet werden, art- und gattungsspezifische Gensonden zu konstruieren. Hierbei werden alle verfügbaren rRNA Sequenzen miteinander verglichen und für bestimmte Sequenzstellen Sonden entworfen, die
15 spezifisch eine Bakterienart, -gattung oder -gruppe erfassen.

Bei der FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung)-Technik werden diese Gensonden, die zu einer bestimmten Region auf der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Gensonden sind i.d.R. kleine, 16-28
20 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und richten sich gegen eine Zielregion, welche typisch für eine Bakterienart oder eine Bakteriengruppe ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Gensonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so bindet sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

25

Die FISH-Analyse wird grundsätzlich auf einem Objektträger durchgeführt, da bei der Auswertung die Bakterien durch Bestrahlung mit einem hochenergetischen Licht

visualisiert, also sichtbar gemacht werden. Die Analyse kann alternativ auch auf einer Mikrotiterplatte erfolgen.

Die Durchführung der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Verfahren zum
5 spezifischen Nachweis von parontopathogenen Bakterien umfasst allgemein die folgenden Schritte:

- Fixierung der in der Probe enthaltenen Bakterien
- Inkubation der fixierten Bakterien mit erfindungsgemäßen Nukleinsäuresondenmolekülen, um eine Hybridisierung herbeizuführen,
- 10 - Entfernen bzw. Abwaschen der nicht hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle und
- Detektieren der mit den Nukleinsäuresondenmolekülen hybridisierten Bakterien.

Die Nukleinsäuresonde kann dabei komplementär zu einer chromosomalen oder
15 episomalen DNA sein, aber auch zu einer mRNA oder rRNA des nachzuweisenden Mikroorganismus. Von Vorteil ist es, eine Nukleinsäuresonde zu wählen, die zu einem Bereich komplementär ist, der in einer Kopiezahl von mehr als 1 im nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Die nachzuweisende Sequenz liegt bevorzugt 500 – 100.000 mal pro Zelle vor, besonders bevorzugt 1.000 – 50.000 mal.

20 Aus diesem Grunde wird bevorzugt die rRNA als Zielstelle verwendet, da die Ribosomen in der Zelle als Orte der Proteinbiosynthese vieltausendfach in jeder aktiven Zelle vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind die erfindungsgemäßen Oligonukleotidsonden besonders bevorzugt gegen die 16S rRNA der nachzuweisenden parontopathogenen Bakterien gerichtet.

25 Bei der Nukleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide umfassen wird, bevorzugt zwischen 12 und 500, bevorzugter zwischen 12 und 200 und

zwischen 12 und 100, besonders bevorzugt zwischen 12 und 50 und zwischen 14 und 40 und zwischen 15 und 30, und am meisten bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide. Die Auswahl der Nukleinsäuresonden geschieht nach den Gesichtspunkten, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Als Zielregion für komplementäre Nukleinsäuresonden werden solche Bereiche ausgewählt, die zwar bei der Zielgruppe, beispielsweise bei allen Stämmen einer Spezies, vorkommen, nicht aber bei anderen Mikroorganismen. Komplementarität sollte bei einer Sonde von 15 Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein. Bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere Fehlpaarungsstellen erlaubt.

Gegenstand der Erfindung sind auch Abwandlungen der obigen Oligonukleotidsequenzen, die trotz der Abweichungen in der Sequenz und/oder Länge eine spezifische Hybridisierung mit Ziel-Nukleinsäuresequenzen des jeweiligen Bakteriums zeigen und somit für den Einsatz in einem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind. Hierunter fallen insbesondere

- a) Nukleinsäuremoleküle, die (i) mit einer der obigen Oligonukleotidsequenzen (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 17) in mindestens 60%, 65%, bevorzugt in mindestens 70%, 75%, bevorzugter in mindestens 80 %, 84%, 87% und besonders bevorzugt in mindestens 90 %, 94%, 96%, der Basen übereinstimmen (wobei der Sequenzbereich des Nukleinsäuremoleküls zu betrachten ist, der dem Sequenzbereich eines der oben angegebenen Oligonukleotide (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 17) entspricht, und nicht etwa die gesamte Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls, das u.U. im Vergleich zu den oben angegebenen Oligonukleotiden (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 17) um eine bis zahlreiche Basen verlängert ist) oder (ii) sich von obigen Oligonukleotidsequenzen (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 17) durch eine oder mehrere Deletionen und/oder Additionen unterscheiden und

- die eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Bakterien der Arten *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* und *Prevotella intermedia* ermöglichen. Dabei bedeutet „spezifische Hybridisierung“, dass unter den hier
- 5 beschriebenen oder den dem Durchschnittsfachmann im Zusammenhang mit in situ-Hybridisierungstechniken bekannten Hybridisierungsbedingungen nur die ribosomale RNA der Ziel-Organismen, nicht aber die rRNA von Nicht-Ziel-Organismen an das Oligonukleotid bindet.
- b) Nukleinsäuremoleküle, die mit einer Sequenz, die zu einem der unter a)
- 10 genannten Nukleinsäuremoleküle oder zu einer der Sonden SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 17 komplementär ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
- c) Nukleinsäuremoleküle, die eine Oligonukleotidsequenz von SEQ ID No. 1
- 15 bis SEQ ID No. 17 oder die Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls nach a) oder b) umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen, und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Ziel-Organismen ermöglichen.
- 20 Der Grad der Sequenzidentität eines Nukleinsäuremoleküls mit den Sonden SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 17 kann mit üblichen Algorithmen bestimmt werden. Geeignet ist hier beispielsweise das Programm zur Bestimmung der Sequenzidentität, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (auf dieser Seite z.B. der Link „Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.
- 25 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresondenmoleküle können im Rahmen des Nachweisverfahrens mit verschiedenen Hybridisierungslösungen eingesetzt werden. Je nachdem ob stringente oder moderate Hybridisierungsbedingungen gewählt werden,

- 14 -

erfolgt die Bindung der Nukleinsäuresonde an eine 100 % komplementäre Zielstelle oder an eine Zielstelle mit einer oder mehreren Fehlpaarungen.

Verschiedene organische Lösungsmittel können hierbei in Konzentrationen von 0 -
5 80% eingesetzt werden. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z.B. 0% Formamid in einem wie in Beispiel 1 beschriebenen Hybridisierungspuffer. Stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20-80% Formamid im Hybridisierungspuffer.

10 Unter Teilen oder Derivaten der Nukleinsäuresequenz werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Oligonukleotidsonden verstanden, die sich von den vorstehend genannten erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen durch Deletion und/oder Addition und/oder Mutation unterscheiden können oder die nur Teilbereiche dieser DNA-Sequenzen aufweisen, wobei die Fähigkeit dieser Sonden, mit für die
15 vorstehend genannten Bakterien spezifischer rRNA zu hybridisieren, erhalten bleibt.

Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien bereitgestellt, umfassend:

20 i) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) DNA-Sequenz, umfassend

5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'

25 5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'

oder Teile davon;

- 15 -

- b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
- c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz
- 5 von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt, und/oder
- ii) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Porphyromonas gingivalis*, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
- 10 a) DNA-Sequenz, umfassend
- 5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'
- 5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'
- 5'-CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'
- oder Teile davon;
- 15 b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
- c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz
- 20 von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt, und/oder
- iii) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Bacteroides forsythus*, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
- a) DNA-Sequenz, umfassend
- 25 5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'
- 5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'
- 5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'
- 5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'

- 16 -

5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'

5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'

oder Teile davon;

- b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
- 5 c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfasst, und/oder
- 10 iv) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Prevotella intermedia*, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) DNA-Sequenz, umfassend
- 5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'
- 15 5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'
- 5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'
- 5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'
- 5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'
- 5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'
- 20 oder Teile davon;
- b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
- c) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz
- 25 von b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien

- i) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans* aus der Gruppe bestehend aus
- a) DNA-Sequenz, umfassend
- 5 5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'
5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'
und/oder
- ii) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Porphyromonas gingivalis* aus der Gruppe
- 10 bestehend aus
- 5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'
5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'
5'-CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'
und/oder
- 15 iii) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Bacteroides forsythus* aus der Gruppe, bestehend aus
- 5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'
5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'
- 20 5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'
5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'
5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'
5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'
und/oder
- 25 iv) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Prevotella intermedia* aus der Gruppe bestehend aus
- 5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'

- 18 -

- 5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'
5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'
5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'
5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'
5 5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'.

Bei einer alternativen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die erfindungsgemäße Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung zum spezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien sämtliche vorstehend
10 genannten erfindungsgemäßen Oligonukleotidsonden SEQ ID No. 1-17.

Durch Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonukleotidsonden-Zusammensetzungen lassen sich parodontale Leitkeime mit hoher Sensitivität nachweisen, selbst wenn diese nur wenige Ribosomen beherbergen. Somit ist
15 gewährleistet, daß die entsprechenden Pathogene in parodontalen Proben auch dann detektiert werden können, wenn sie in niedrig aktivem Zustand vorliegen. Damit lassen sich mit den erfindungsgemäßen Sonden-Zusammensetzungen erstmals parodontopathogene Bakterien quantitativ in einer subgingivalen Probe nachweisen, selbst wenn die Ribosomenzahl der Bakterien unterhalb der mit einer einfach
20 fluoreszenzmarkierten Sonde nachweisbaren Zahl befindlichen Schwelle liegt.

Zudem läßt sich anders als bei allen aus dem Stand der Technik bekannten Sonden durch den Einsatz der vorstehend beschriebenen Sonden beispielsweise in Kombination mit einem bakterienfärbenden Farbstoff schnell der Anteil eines
25 bestimmten krankheitsrelevanten Bakteriums an der mikrobiellen Gesamtflora bestimmen. Dies ist von großer diagnostischer Bedeutung, da das Überschreiten eines kritischen Wertes zur Auslösung der Krankheit führt. Anders als bei Kulturtechniken werden nicht nur kultivierbare Bakterien detektiert, sondern alle in

einer Probe vorhandenen Bakterien. Die Detektion mit der erfindungsgemäßen Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung gelingt ferner auch dann, wenn Stammvarietäten vorliegen, die sich in einzelnen hochvariablen rRNA-Abschnitten von den Typstämmen unterscheiden. Der Nachweis mit den erfindungsgemäßen Sonden gelingt nicht nur schnell, sondern ist auch robust und hochspezifisch.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien durch in situ-Hybridisierung, umfassend die folgenden Schritte:

- 10 a) Fixieren der in der Probe enthaltenen Bakterien;
- b) Inkubieren der fixierten Bakterien mit mindestens einer vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Oligonukleotidsonde, vorzugsweise mit einer vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung;
- c) Detektieren und ggf. Quantifizieren der hybridisierten bakteriellen Zellen.

15

Vorzugsweise werden die Bakterien nach dem Fixieren auf einem Objektträger immobilisiert, besonders bevorzugt durch Trocknung oder durch Filtration.

Die Fixierung erfolgt vorzugsweise durch denaturierende Reagenzien, beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Ethanol, Aceton und Ethanol-Essigsäuremischungen, und/oder durch quervernetzende Reagenzien, beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Formaldehyd, Paraformaldehyd und Glutaraldehyd. Alternativ erfolgt die Fixierung durch Hitze.

25 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter „Fixieren“ der Bakterien allgemein eine Behandlung verstanden, mit der die Bakterienhülle für Nukleinsäuresonden durchlässig gemacht wird. Zur Fixierung wird üblicherweise Ethanol verwendet. Kann die Zellwand mit diesen Maßnahmen nicht von den Nukleinsäure-

sonden penetriert werden, so sind dem Fachmann ausreichend weitere Maßnahmen bekannt, die zu demselben Ergebnis führen. Dazu zählen beispielsweise Methanol, Mischungen von Alkoholen, eine niederprozentige Paraformaldehydlösung oder eine verdünnte Formaldehydlösung, enzymatische Behandlungen oder ähnliches.

5

Ferner ist es bevorzugt, wenn die Oligonukleotidsonden kovalent mit einem detektierbaren Marker verbunden sind. Der detektierbare Marker wird vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

- a) Fluoreszenzmarker;
- 10 b) Chemolumineszenzmarker;
- c) radioaktiver Marker;
- d) enzymatisch aktive Gruppe;
- e) Hapten;
- f) durch Hybridisierung nachweisbare Nukleinsäure.

15

Der enzymatische Marker wird insbesondere aus der Gruppe, bestehend aus Peroxidase, vorzugsweise Meerrettich-Peroxidase, und Phosphatase, vorzugsweise alkalischer Phosphatase, ausgewählt. Somit kann die Detektion und Quantifizierung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in dieser speziellen Ausführungsform auch
20 mittels eines einfachen Lichtmikroskopes erfolgen. Dazu werden erstmals Peroxidase-markierte Oligonukleotidsonden zum in situ-Nachweis von parodontopathogenen Bakterien eingesetzt.

Diese Ausführungsform bietet gegenüber den herkömmlicherweise verwendeten
25 Techniken eine Reihe von Vorteilen. Zum einen ist mit einem Nachweissystem, das auf einer Enzymreaktion beruht, eine lichtmikroskopische Detektion von Bakterien möglich, was die Anschaffungskosten für ein Analysegerät erheblich reduziert. Zudem lässt sich die Aussagekraft dieses Nachweissystems durch den Einsatz

geeigneter Gegenfärbemittel noch deutlich steigern. Die Durchführung einer gewöhnlichen Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Anschluß an eine in situ-Hybridisierung mit Peroxidase-markierten Oligonukleotiden erlaubt die Bestimmung von Anzahl und Anteil spezieller Bakterien, aber auch die Bestimmung der Anzahl von relevanten Immunzellen und eventuelle räumliche Assoziationen mit bestimmten bakteriellen Gruppen. Weiterhin ergeben sich bezüglich des Nachweissystems deutlich verbesserte Automatisierungsmöglichkeiten, so daß eine Mikroskop-unabhängige Detektion möglich ist. Eine solches Nachweissystem könnte beispielsweise in Mikrotiterplatten mit einem handelsüblichen chromogenen Peroxidasesubstrat durchgeführt werden.

Die beschriebene Technik wird nicht nur zu einer deutlichen Erleichterung der mikrobiellen Diagnostik in speziellen Untersuchungslaboratorien und bei den niedergelassenen Zahnärzten führen, sondern auch für neue Erkenntnisse bei der Erforschung dieser Infektionskrankheit sorgen.

Ferner kann es vorteilhaft sein, daß die fixierten Zellen vor der Inkubation permeabilisiert werden. Bei einer Permeabilisierung im Sinne der vorliegenden Erfindung wird die Zellhülle durchlöchert, aber im Unterschied zur Lyse nicht zerstört. Die morphologische Integrität der Zelle bleibt erhalten. Makromoleküle wie DNA, RNA und Ribosomen verbleiben in der Zelle. Die Permeabilisierung kann notwendig sein, um z.B. ein effektives Eindringen von Sonden, die mit im Vergleich zu Fluoreszenzfarbstoffen großen Enzymmoleküle markiert sind, in die Zelle und damit das anschließende Binden an Ribosomen zu gewährleisten. Die Permeabilisierung kann vorzugsweise durch partiellen Abbau mittels zellwandlytischer Enzyme, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Proteinase K, Pronase, Lysozym und Mutanolysin, erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Durchführung des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend mindestens einen Hybridisierungspuffer sowie mindestens eine erfindungsgemäße Oligonukleotidsonde, vorzugsweise eine erfindungsgemäße Oligonukleotidsonden-

5 Zusammensetzung.

Bei dem vorstehend beschriebene erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um ein in situ-Hybridisierungsverfahren, das auf dem Nachweis von ribosomaler RNA beruht. Bei einer im folgenden ausführlich dargestellten speziellen Ausführungsform

10 der vorliegenden Erfindung werden folgende Schritte durchgeführt:

- 1) Probenahme;
- 2) Fixierung der Probe;
- 3) ggf. Transport;

15

- 4) ggf. Konzentrierung;
- 5) Immobilisierung der Probe auf einem Träger;
- 6) Permeabilisierung der in der Probe enthaltenen bakteriellen Zellen;
- 7) Hybridisierung der Probe;
- 8) Waschen der Probe;

20

- 9) Detektion der hybridisierten Sonden.

Bei der Auswahl der Patienten bzw. betroffenen Stellen im Gebiß ist die klinische Erfahrung des behandelnden Arztes ausschlaggebend. Als Orientierungshilfe kann hier die Stellungnahme der Gesellschaft für Parodontologie und der Deutschen

25 Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde zur mikrobiologischen Diagnostik bei marginalen Parodontitiden von 1998 dienen. Es können entweder einzelne parodontale Taschen oder aber auch "Pool-Proben" von mehreren subgingivalen Stellen beprobt werden. Alternativ können mit der dargestellten

Technik aber auch supragingivale Stellen oder andere Proben aus dem Mund-Rachenraum untersucht werden (z.B. Speichelproben). Zur Beprobung von subgingivalen Stellen werden entweder speziell dafür vorgesehene zahnärztliche Instrumente (z.B. Kürretten, Scaler u.ä.) oder spezielle Papierspitzen, vorzugsweise ISO45 der Firma Alfred Becht (Offenburg; Deutschland) oder anderer Hersteller verwendet.

Die mit den verschiedenen Verfahren entnommenen Bakterien werden anschließend in ein geeignetes Fixierungsmedium eingebracht, um die Bakterien abzutöten und einen Abbau ribosomaler RNA zu verhindern. Dazu können prinzipiell entweder denaturierende Reagenzien, wie Ethanol, Aceton oder Ethanol-Essigsäuremischungen, oder quervernetzende Reagenzien, wie Formaldehyd, Paraformaldehyd oder Glutaraldehyd, verwendet werden. Auch Mischungen aus den beiden Fixierungsmittelgruppen (z.B. Ethanol zusammen mit Formaldehyd) sind einsetzbar.

Die entnommenen Bakterien können auch direkt in einen Wassertropfen eluiert werden, der sich auf einem Objektträger befindet. Die Bakterien werden dann mittels Hitze-fixierung über einer offenen Flamme, z.B. einem Bunsenbrenner, oder in einem temperierbaren Inkubationsschrank, z.B. bei 80°C, fixiert und gleichzeitig auf einem Objektträger immobilisiert. Fixierte Proben lassen sich ohne weitere Spezialvorrichtungen bis zur Untersuchung lagern und eventuell transportieren.

Die fixierten Proben werden anschließend, sofern keine Hitze-fixierung durchgeführt wurde, durch Trocknung auf einem Objektträger immobilisiert. Alternativ können zur Immobilisierung auch Filtrationsverfahren verwendet werden. Mit Hilfe eines Membranfilters werden dabei auch größere Mengen Probenvolumen auf einen Filter aufgebracht. Vorzugsweise werden dazu Polycarbonatmembranen verwendet, die

- 24 -

anschließend analog zu den auf Objektträgern immobilisierten Proben hybridisiert werden.

Optional schließt sich an die Immobilisierung eine aufsteigende EtOH-Reihe an (z.B. 5 50%, 80% und 96% Ethanol für je 3 Minuten).

Bei der Verwendung von großen Markierungsmolekülen (z.B. Meerrettich-
peroxidase, alkalische Phosphatase, u.a.) kann eine weitere Permeabilisierung der
Bakterienzellwände vorteilhaft sein, um eine effektive Diffusion der markierten
10 Sondenmoleküle in die bakterielle Zelle zu gewährleisten. Dazu können
verschiedenen zellwandlytische Enzyme verwendet werden, z.B. ProteinaseK,
Pronase, Lysozym, Mutanolysin und dergleichen. Bei dem erfindungsgemäßen
Verfahren zum Nachweis der parodontopathogenen Bakterien *A.*
actinomycetemcomitan, *P. gingivalis*, *B. forsythus* und *P. intermedia* sind vor allem
15 die Enzyme ProteinaseK und Lysozym in der in Beispiel 3 gezeigten Form zur
Permeabilisierung der Zellwände geeignet. Aber auch der Einsatz verschiedener
chemischer Reagenzien (z.B. 1 N HCl oder Detergenzien) können zu einer
Permeabilisierung von einzelnen bakteriellen Zellen verwendet werden. Zum
Abstoppen der Enzymreaktion wird eine weitere aufsteigende Ethanolreihe
20 durchgeführt.

Erfindungsgemäß wird die Nukleinsäuresonde mit dem im obengenannten Sinne
fixierten Mikroorganismus inkubiert, um so ein Eindringen der Nukleinsäuresonden-
moleküle in den Mikroorganismus und die Hybridisierung von Nukleinsäuresonden-
25 molekülen mit den Nukleinsäuren des Mikroorganismus zu ermöglichen.
Anschließend werden die nicht-hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle durch
übliche Waschschriffe entfernt.

- 25 -

Die spezifisch hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle können anschließend in den jeweiligen Zellen detektiert werden. Voraussetzung hierfür ist, dass das Nukleinsäuresondenmolekül nachweisbar ist, z.B. dadurch dass das Nukleinsäuresondenmolekül durch kovalente Bindung mit einem Marker verknüpft ist. Als detektierbare Marker werden z.B. fluoreszierende Gruppen wie z.B. CY2 (erhältlich von Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA), CY3 (ebenfalls erhältlich von Amersham Life Sciences), CY5 (ebenfalls zu beziehen von Amersham Life Sciences), FITC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA), FLUOS (erhältlich von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), TRITC (erhältlich von Molecular Probes Inc. Eugene, USA), 6-FAM oder FLUOS-PRIME verwendet, die dem Fachmann alle wohlbekannt sind. Auch chemische Marker, radioaktive Marker oder enzymatische Marker wie Meerrettich-Peroxidase, saure Phosphatase, alkalische Phosphatase, Peroxidase, können verwendet werden. Für jedes dieser Enzyme ist eine Reihe von Chromogenen bekannt, die anstelle des natürlichen Substrates umgesetzt werden können, und entweder zu farbigen oder zu fluoreszierenden Produkten umgesetzt werden können. Beispiele für solche Chromogene sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

20

25

- 26 -

Tabelle 1

Enzyme	Chromogen
5 1. Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase	4-Methylumbelliferylphosphat (*), Bis(4-Methylumbelliferylphosphat), (*) 3-O-Methylfluoreszein, Flavon-3-Diphosphatdiammoniumsalz (*), p-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz
10 2. Peroxidase	Tyraminhydrochlorid (*), 3-(p-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (*), p-Hydroxyphenethylalkohol(*), 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (ABTS), ortho-Phenylendiamidhydrochlorid,
15 3. Meerrettichperoxidase	o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, p-Ucresol (*), 3,3'-dimethyloxybenzidin, 3-Methyl-2-benzothiazolinhydraxon, Tetramethylbenzidin H ₂ O ₂ + Diammoniumbenzidin H ₂ O ₂ + Tetramethylbenzidin
20 4. β-D-Galaktosidase	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid, 4-Methylumbelliferyl-β-D-galaktosid
5. Glukoseoxidase	ABTS, Glukose und Thiazolylblau

* Fluoreszenz

25

Schließlich ist es möglich, die Nukleinsäuresondenmoleküle so zu gestalten, daß an ihrem 5'- oder 3'-Ende eine weitere zur Hybridisierung geeignete Nukleinsäure-

sequenz vorhanden ist. Diese Nukleinsäuresequenz umfaßt wiederum ca. 15 bis 1000, bevorzugt 15 – 50 Nukleotide. Dieser zweite Nukleinsäurebereich kann wiederum von einer Oligonukleotidsonde erkannt werden, die durch eines der oben erwähnten Mittel nachweisbar ist.

5

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der nachweisbaren Nukleinsäuresondenmoleküle mit einem Hapten. Nach Ablösung der Nukleinsäuresondenmoleküle von der Zielnukleinsäure können die nunmehr isoliert vorliegenden Nukleinsäuresondenmoleküle mit Antikörpern, die das Hapten erkennen, in Kontakt gebracht werden. Als Beispiel für solch ein Hapten kann Digoxigenin oder dessen Derivate angeführt werden. Dem Fachmann sind neben den angegebenen Beispielen auch noch weitere wohlbekannt.

10

Die Durchführung der Hybridisierung geschieht standardmäßig auf Objektträgern, auf Filtern, auf einer Mikrotiterplatte oder in einem Reaktionsgefäß. Die Auswertung ist abhängig von der Art der Markierung der verwendeten Sonde und kann mit einem Lichtmikroskop, Epifluoreszenzmikroskop, Chemoluminometer, Fluorometer, Durchflußzytometer und dergleichen erfolgen.

15

Der erfindungsgemäße Kit enthält besonders bevorzugt folgende spezifische Sonden zum Nachweis von Parodontopathogenen:

20

Sonden, die Stämme der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans* erfassen:

25

AACT1: 5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'

AACT2: 5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'

- 28 -

Sonden, die Stämme der Art *Porphyromonas gingivalis* nachweisen

PGIN1: 5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'

PGIN2: 5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'

5 PGIN3: 5'- CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'

Sonden, die Stämme der Art *Bacteroides forsythus* erfassen

BFOR1: 5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'

10 BFOR2: 5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'

BFOR3: 5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'

BFOR4: 5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'

BFOR5: 5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'

BFOR6: 5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'

15

Sonden, die Stämme der Art *Prevotella intermedia* erfassen

PINT1: 5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'

PINT2: 5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'

20 PINT3: 5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'

PINT4: 5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'

PINT5: 5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'

PINT6: 5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'

25 Die erfindungsgemäßen Sondenmoleküle können im Rahmen des Nachweisverfahrens mit verschiedenen Hybridisierungslösungen eingesetzt werden. Verschiedene organische Lösungsmittel können in Konzentrationen von 0% bis 80% eingesetzt werden. Formamid wird beispielsweise vorzugsweise in einer

Konzentration von 20 % bis 60 %, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 20 % im Hybridisierungspuffer eingesetzt. Zudem ist ein Salz, vorzugsweise Natriumchlorid, in einer Konzentration von 0,1 mol/l bis 1,5 mol/l, bevorzugt von 0,5 mol/l bis 1,0 mol/l und bevorzugter von 0,7 mol/l bis 0,9 mol/l und am meisten
5 bevorzugt von 0,9 mol/l im Hybridisierungspuffer enthalten. Zum Abpuffern des Hybridisierungspuffers können verschiedene Verbindungen wie Tris/HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES-Puffer verwendet werden, die im Bereich von 0,01 mol/l bis 0,1 mol/l, bevorzugt von 0,01 mol/l bis 0,08 mol/l und besonders bevorzugt von 0,02 mol/l eingesetzt werden. Der pH-Wert liegt in der Regel im Bereich von 6,0 bis
10 9,0, bevorzugt von 7,0 bis 8,0. Bevorzugt weist der Hybridisierungspuffer 0,02 mol/l Tris/HCl, pH 8,0 auf.

Zudem sind meist Detergenzien, wie Triton X oder Natrium-Dodecylsulphat (SDS) in einer Konzentration von 0,001 % bis 0,2 %, bevorzugt von 0,005 % bis 0,1 %
15 enthalten. Hier enthält ein besonders bevorzugter Hybridisierungspuffer 0,01 % SDS.

Weitere Zusatzstoffe können bei verschiedenen Problemstellungen zum Einsatz kommen, wie unmarkierte Nukleinsäurefragmente (z.B. fragmentierte Lachsspermien-DNA, unmarkierte Oligonukleotide u.ä.) oder Moleküle, die
20 aufgrund einer Reaktionsraumverengung zu einer Beschleunigung der Hybridisierungsreaktion führen können (Polyethylenglycol, Polyvinylpyrrolidon, Dextransulfat u.ä.). Solche Zusätze werden vom Fachmann in den bekannten und üblichen Konzentrationen dem Hybridisierungspuffer zuzugeben.

25 Es versteht sich, dass der Fachmann die angegebenen Konzentrationen der Bestandteile des Hybridisierungspuffer derart auswählen kann, dass die gewünschte Stringenz der Hybridisierungsreaktion erzielt wird. Besonders bevorzugte Ausführungsformen geben stringente bis besonders stringente Hybridisierungs-

bedingungen wieder. Unter Einsatz dieser stringenten Bedingungen kann der Fachmann feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremolekül einen artspezifischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen von parontopathogenen Bakterien ermöglicht und somit im Rahmen der Erfindung zuverlässig eingesetzt werden kann.

5

Es versteht sich, dass der Fachmann die angegebenen Konzentrationen der Bestandteile des Hybridisierungspuffers derart auswählen kann, dass die gewünschte Stringenz der Hybridisierungsreaktion erzielt wird. Besonders bevorzugte Ausführungsformen geben stringente bis besonders stringente Hybridisierungsbedingungen wieder. Unter Einsatz dieser stringenten Bedingungen kann der Fachmann feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremolekül einen spezifischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen von Ziel-Organismen ermöglicht und somit im Rahmen der Erfindung zuverlässig eingesetzt werden kann. Der Fachmann ist in der Lage durch Veränderung der Parameter des Hybridisierungspuffers die Stringenz im Bedarfsfall bzw. je nach Sonde oder Zielorganismus zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Die Konzentration der Nukleinsäuresonde im Hybridisierungspuffer ist abhängig von der Art ihrer Markierung und der Anzahl der Zielstrukturen. Um eine schnelle und effiziente Hybridisierung zu ermöglichen, sollte die Anzahl der Nukleinsäuresondenmoleküle die Anzahl der Zielstrukturen um mehrere Größenordnungen überschreiten. Allerdings ist bei der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) darauf zu achten, dass eine zu hohe Menge an fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresondenmolekülen zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führt. Die Konzentration der Nukleinsäuresondenmoleküle sollte deshalb in einem Bereich zwischen 0,5 - 500 ng/μl, bevorzugt zwischen 1,0 – 100 ng/μl und besonders bevorzugt zwischen 1,0 – 50 ng/μl liegen.

Die im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugte Konzentration beträgt 1 – 10 ng jedes verwendeten Nukleinsäuresondenmoleküls pro μl Hybridisierungslösung. Das verwendete Volumen der Hybridisierungslösung sollte zwischen 8 μl und 100 μl liegen, bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren beträgt es 30 μl .

Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 1,5 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44 °C und 48 °C, besonders bevorzugt 46 °C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergenzien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von den Nukleinsäuresonden, insbesondere deren Längen und dem Grad der Komplementarität zur Zielsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Der Fachmann ist mit hier einschlägigen Berechnungen vertraut.

15

Nach erfolgter Hybridisierung sollten die nicht hybridisierten und überschüssigen Nukleinsäuresondenmoleküle entfernt bzw. abgewaschen werden, was üblicherweise mittels einer herkömmlichen Waschlösung erfolgt. Diese Waschlösung kann, falls gewünscht, 0,001-0,1 % eines Detergens wie SDS, bevorzugt 0,005 – 0,05 %, besonders bevorzugt 0,01 %, sowie Tris/HCl in einer Konzentration von 0,001-0,1 mol/l, bevorzugt 0,01 – 0,05 mol/l, besonders bevorzugt 0,02 mol/l enthalten, wobei der pH-Wert von Tris/HCl im Bereich von 6,0 bis 9,0, vorzugsweise bei 7,0 - 8,0, besonders bevorzugt bei 8,0 liegt. Ein Detergens kann enthalten sein, ist aber nicht zwingend erforderlich. Weiter enthält die Waschlösung üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz von 0,003 mol/l bis 0,9 mol/l, bevorzugt von 0,01 mol/l bis 0,9 mol/l, beträgt. Besonders bevorzugt ist eine NaCl-Konzentration von etwa 0,215 mol/l.

25

Des Weiteren kann die Waschlösung EDTA enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0 - 0,005 mol/l beträgt. Ferner kann die Waschlösung auch dem Fachmann geläufige Konservierungsmittel in geeigneten Mengen enthalten.

- 5 Allgemein kommen bei dem Waschschrift Pufferlösungen zum Einsatz, die prinzipiell sehr ähnlich aussehen können, wie Hybridisierungspuffer (gepufferte Natriumchloridlösung), nur dass der Waschschrift in der Regel in einem Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration, bzw. bei höherer Temperatur durchgeführt wird. Zur theoretischen Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen kann folgende Formel
10 verwendet werden:

$$T_d = 81,5 + 16,6 \lg[\text{Na}^+] + 0,4 \times (\% \text{ GC}) - 820/n - 0,5 \times (\% \text{ FA})$$

15

T_d = Dissoziationstemperatur in °C

$[\text{Na}^+]$ = Molarität der Natriumionen

% GC = Anteil der Guanin- und Cytosinnukleotide an der Anzahl der Basen

n = Länge des Hybrids

20 % FA= Formamidgehalt

Mit Hilfe dieser Formel kann z.B. der Formamidanteil (der wegen der Toxizität des Formamids möglichst gering sein sollte) des Waschpuffers ersetzt werden durch einen entsprechend niedrigeren Natriumchloridgehalt. Allerdings ist dem Fachmann
25 aus der umfangreichen Literatur zu in situ-Hybridisierungsmethoden bekannt, dass und auf welche Weise die genannten Bestandteile variiert werden können. Bezüglich der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen gilt das oben im Zusammenhang mit dem Hybridisierungspuffer Gesagte.

Das „Abwaschen“ der nicht gebundenen Nukleinsäuresondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 44 °C bis 52 °C, bevorzugt von 44 °C bis 50 °C und besonders bevorzugt bei 46 °C für eine Dauer von 10 - 40

5 Minuten, vorzugsweise für 15 Minuten.

In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle im sog. Fast-FISH-Verfahren zum spezifischen Nachweis der angegebenen Ziel-Organismen eingesetzt. Das Fast-FISH-Verfahren ist dem Fachmann bekannt und z.B. in den Patentanmeldungen DE 10 199 36 875 und WO 99/18234 beschrieben. Auf diese Dokumente wird hinsichtlich deren Offenbarung zur Durchführung der dort beschriebenen Nachweisverfahren hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

15 Erfindungsgemäß werden weiterhin Kits zur Durchführung der entsprechenden Verfahren zur Verfügung gestellt. Die in diesen Kits enthaltene Hybridisierungsanordnung ist z.B. in der deutschen Patentanmeldung 100 61 655.0 beschrieben. Auf die in diesem Dokument enthaltene Offenbarung bezüglich der in situ-Hybridisierungsanordnung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

20

Außer der beschriebenen Hybridisierungsanordnung (als VIT-Reaktor bezeichnet) umfassen die Kits als wichtigsten Bestandteil die jeweilige Hybridisierungslösung mit den weiter oben beschriebenen für die nachzuweisenden Mikroorganismen spezifischen Nukleinsäuresondenmolekülen (sog. VIT-Lösung). Weiterhin ist jeweils 25 enthalten der entsprechende Hybridisierungspuffer (der der Hybridisierungslösung ohne Sondenmoleküle entspricht) und ein Konzentrat der entsprechenden Waschlösung. Weiterhin sind enthalten gegebenenfalls Fixierungslösungen (50% Ethanol, Ethanol absolut) sowie gegebenenfalls eine Einbettlösung (Finisher).

Finisher sind im Handel erhältlich, sie verhindern u.a. das rasche Ausbleichen fluoreszierender Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop. Gegebenenfalls sind Lösungen zur parallelen Durchführung einer Positivkontrolle (Positive Control) sowie einer Negativkontrolle (Negative Control) enthalten.

5

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie in irgendeiner Weise einzuschränken:

Beispiel 1: Spezifischer Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* und *P. intermedia*

10

Um die Spezifität der erfindungsgemäßen Sonden zu belegen, wurden eine Reihe von Referenzorganismen aus öffentlich zugänglichen Bakterienstammsammlungen bestellt und auf den von den Stammsammlungen empfohlenen Medien kultiviert.

15

Sobald sichtbare Kolonien auf den Nährmedien zu sehen waren, wurde mit einer Impföse eine Kolonie von der Platte entfernt und in einer Fixierlösung (4 % Formaldehyd in 1 x PBS) suspendiert. Optimalerweise beträgt die optische Dichte der Bakteriensuspension 0,2, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Bakterien wurden 1 bis 24 h in der Fixierlösung belassen und dann für 5 min bei

20

8.000 U/min (Rotina 35, Rotortyp 1714, Hettich, Tuttlingen) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in dem 1 x PBS gewaschen (Ausgangsvolumen). Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (Bedingungen wie oben) wurden die Zellen in einer 1:1-Mischung aus EtOH/PBS aufgenommen und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

25

Aus dieser Suspension wurden 5 µl entnommen und auf den Aussparungen eines teflonbeschichteten Objektträgers aufgebracht, luftgetrocknet und einer aufsteigenden Ethanolreihe unterzogen (50 %, 80 % und 100 % je 3 Minuten).

- 35 -

Anschließend wurden die immobilisierten Proben luftgetrocknet, und 10 µl des Hybridisierungspuffers (0,9 mol/l NaCl, 0,02 mol/l Tris/HCl pH 8,0, 0,01 % SDS, 20 % Formamid, je 5 ng Hybridisierungssonde AACT1 und AACT2, PGIN1-3, BFOR1-6, PINT1-6) wurden zugegeben. Um zu überprüfen, ob die entsprechenden Referenzzellen genügend rRNA enthalten, um mit dieser Methode nachgewiesen zu werden, wurde neben einer Cy3-markierten spezifischen Sonde noch eine FLUOS-markierte universelle Sonde in der Hybridisierung mitgeführt.

Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer, die mit Hybridisierungspuffer äquilibriert war. Die Hybridisierungszeit betrug mindestens 90 Minuten. Anschließend wurde zur Entfernung der ungebundenen Sonde der hybridisierte Objektträger in einem 50 ml Röhrchen mit Waschpuffer (0,215 mol/l NaCl, 0,02 mol/l Tris/HCl pH 8,0, 0,01 % SDS) plaziert und 15 Minuten bei 48 °C inkubiert.

Die fertig hybridisierten Objektträger wurden mit einem geeigneten Einbettmedium überschichtet und anschließend Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert.

Tabelle 2 zeigt die verwendeten Referenzstämme und die mit den erfindungsgemäßen Sonden erzielten Ergebnisse.

20

Tabelle 2

a) Spezifität der AACT-Sonden:

Organismus	Stamm	AACT1	AACT2	Eub 338-FLU
<i>Haemophilus actinomycetemcomitans</i>	DSM 11123	+	+	+

<i>Haemophilus actinomycetemcomitans T</i>	DSM 8324	+	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM 4690	-	-	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	DSM 8978	-	-	+
<i>Haemophilus ducreyi</i>	DSM 8925	-	-	+
<i>Haemophilus parasuis</i>	ATCC 19417	-	-	+
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	ATCC 33389	-	-	+
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	ATCC 29241	-	-	+
<i>Pasteurella avium</i>	ATCC 29546	-	-	+
<i>Mannheimia haemolytica</i>	DSM 10531	-	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis T</i>	ATCC 33277	-	-	+
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	DSM 20707	-	-	+
<i>Prevotella melaninogenica</i>		-	-	+
<i>Prevotella intermedia</i>	DSM 20706	-	-	+
<i>Prevotella bivia</i>	GH 1029	-	-	+
<i>Bacteroides uniformis</i>	GH 1077	-	-	+
<i>Bacteroides vulgatus</i>	DSM 1447	-	-	+
<i>Bacteroides ureolyticus</i>		-	-	+
<i>Veilonella parvula</i>		-	-	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	DSM 1896	-	-	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25295	-	-	+

b) Spezifität der PGIN-Sonden:

Organismus		PGIN1	PGIN2	PGIN3	EUB338
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	DSM 20709	+	+	+	+

- 37 -

<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	+	+	+	+
<i>Porphyromonas assaccharolyticus</i>	DSM 20707	-	-	-	+
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	ATCC 35406	-	-	-	+
<i>Porphyromonas catoniae</i>	ATCC 51270	-	-	-	+
<i>Bacteroides forsythus</i>	ATCC 43037	-	-	-	+
<i>Prevotella bivia</i>	GH 1029	-	-	-	+
<i>Prevotella intermedia</i>	DSM 20704	-	-	-	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25295	-	-	-	+
<i>Bacteroides uniformis</i>		-	-	-	+
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 29327	-	-	-	+
<i>Haemophilus actinomycetemcomitans</i>	DSM 11123	-	-	-	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM 4690	-	-	-	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	DSM 8978	-	-	-	+
<i>Clostridium paraputrefaciens</i>	GH 2151	-	-	-	+
<i>Clostridium cadaveris</i>	GH 2141	-	-	-	+
<i>Mannheimia haemolytica</i>	DSM 10531	-	-	-	+

c) Spezifität der BFOR-Sonden:

Organismus	Stamm	BFOR1, 2, 3, 4, 5 und 6	EUB338
<i>Bacteroides forsythus</i>	ATCC 43037	+	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	-	+
<i>Porphyromonas assaccharolyticus</i>	DSM 20707	-	+
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	ATCC 35406	-	+
<i>Porphyromonas catoniae</i>	ATCC 51270	-	+

<i>Capnocytophaga ochraceae</i>	21334	-	+
<i>Prevotella intermedia</i>	DSM 20706	-	+
<i>Prevotella loeschei</i>	GH 1068	-	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	GH1061	-	
<i>Prevotella bivia</i>	GH 1029	-	
<i>Prevotella ruminicola ssp. ruminicola</i>	GH 914	-	+
<i>Prevotella ruminicola ssp. brevis</i>	GH1024	-	+
<i>Prevotella corporis</i>	GH 830	-	+
<i>Prevotella disiens</i>	GH 1015	-	+
<i>Prevotella heparinolytica</i>	GH 918	-	+
<i>Bacteroides distasonis</i>	GH 872	-	+
<i>Bacteroides uniformis</i>	GH 1077	-	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	GH 1048	-	+
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 29327	-	+
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	DSM 11123	-	+

d) Spezifität der PINT-Sonden

Organismus	Stamm	PINT1, 2, 3, 4, 5 und 6	EUB338
<i>Prevotella intermedia</i>	DSM 20707	+	+
<i>Prevotella intermedia</i>	GH 1084	+	+
<i>Prevotella intermedia</i>	GH 1030	+	+
<i>Prevotella intermedia</i>	GH 1032	+	+
<i>Prevotella intermedia</i>	GH 1052	+	+
<i>Prevotella bivia</i>	GH 1029	-	+
<i>Prevotella loeschei</i>	GH 1068	-	+
<i>Prevotella melaninogenica</i>	GH1061	-	+
<i>Prevotella ruminicola ssp. ruminicola</i>	GH 914	-	+
<i>Prevotella ruminicola ssp. brevis</i>	GH 1024	-	+

- 39 -

<i>Prevotella corporis</i>	GH 830	-	+
<i>Prevotella disiens</i>	GH 1015	-	+
<i>Prevotella dentalis</i>	DSM 3688	-	+
<i>Prevotella bryantii</i>	DSM 11371	-	+
<i>Prevotella nigrescens</i>	DSM 13386	-	+
<i>Prevotella buccae</i>	DSM 20615	-	+
<i>Prevotella heparinolytica</i>	GH 918	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	-	+
<i>Porphyromonas assaccharolyticus</i>	DSM 20707	-	+
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	CCUG 29541	-	+
<i>Porphyromonas catoniae</i>	CCUG 41358	-	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	GH 1048	-	+
<i>Bacteroides forsythus</i>	CCUG 33226	-	+
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 29327	-	+
<i>Bacteroides uniformis</i>	GH 1077	-	+
<i>Bacteroides distasonis</i>	B98- 026006/3 (GH 872)	-	+
<i>Bacteroides fragilis</i> *	ATCC 25295	-	+
<i>Haemophilus actinomycescomitans</i>	DSM 11123	-	+

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

ATCC: American Type Culture Collection

CCUG: Culture Collection, Universität Göteborg

GF: Max von Pettenkofer-Institut, Stammsammlung Zweigstelle Großhadern

Beispiel 2: Detektion von parodontopathogenen Bakterien in Proben von Patienten mit Parodontitis

- 5 Die Entnahme der parodontalen Proben erfolgte entweder mit einem Scaler oder mit einer dafür vorgesehenen sterilen Papierspitze. Im Falle der Verwendung eines Scalers wurde der Scaler nach der Entfernung bakterieller Plaque aus der Zahnfleischtasche solange in der Fixierungslösung (4 % Formaldehydlösung in 1 x PBS) gerührt, bis die daran haftenden bakteriellen Beläge vollständig in 200 µl
- 10 Fixierungslösung suspendiert waren. Erfolgte die Probenahme mit sterilen Papierspitzen, so waren diese aseptisch aus der Verpackung zu entnehmen und nach entsprechender Vorbereitung des Patienten (Trocknung der entsprechenden Stelle, Entfernung supragingivaler Plaque) in die zu beprobenden parodontale Tasche einzuführen. Dort verblieb die Papierspitze für 10 - 20 Sekunden, wurde dann
- 15 entnommen und in ein Reagenzgefäß mit 200 µl Fixierlösung übergeführt. In diesem Zustand wurde die Papierspitze in das Untersuchungslaboratorium geschickt. Dort wurde die Fixierlösung mit 1/10-tel Volumen einer 1 %-igen TritonX-100-Lösung versetzt und 2 x 30 Sekunden gut geschüttelt, um die Bakterien von der Papierspitze zu eluieren.
- 20
- Anschließend wurde bei 8.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet wie bei Beispiel 1 ausgeführt gewaschen und die Bakterien schließlich in 60 µl einer 1:1-Mischung von Ethanol und PBS übergeführt. In dieser Lösung sind die Bakterien in der Probe bei - 20°C mindestens 3 Monate lagerbar.
- 25
- 5 µl dieser Suspension wurden auf einen Objektträger aufgebracht und wie in Beispiel 1 ausgeführt mit den erfindungsgemäßen Sonden hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Proben mit dem unspezifisch an DNA bindenden

- 41 -

Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid; Sigma; Deisenhofen; Deutschland) gefärbt. Dazu wurden die Proben mit einer PBS-Lösung überschichtet, die 1 µg/ml DAPI enthielt, und 5 - 15 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschr

5 in einem geeigneten Einbettmedium (Citifluor AF1, Citifluor Ltd., London, UK; Vectashild, Vector laboratories, Burlingame, U.S.A) mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes untersucht werden.

Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zähllokulars nach Angaben des

10 Mikroskopherstellers (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die quantitative Auswertung von drei verschiedenen Patientenproben ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3

15

Lfd.-Nr.	Taschen tiefe	Aac		Pgi		Bfo		Pint	
		Anteil	Zahl	Anteil	Zahl	Anteil	Zahl	Anteil	Zahl
1	10 mm		n.d.	49,7 %	$2,7 \times 10^7$		n.d.		n.d.
2	8 mm		n.d.	21,7 %	$1,75 \times 10^6$	19,7 %	$1,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	4,8 %
3	8 mm		10^2-10^3	6,2 %	$1,1 \times 10^6$	8,8 %	$1,5 \times 10^6$	2×10^5	

n.d.: nicht detektiert

Beispiel 3: Detektion von parodontopathogenen Bakterien mit

20 Oligonukleotidsonden, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind

Die parodontalen Proben wurden entnommen, fixiert und auf den Objektträgern immobilisiert, wie in Beispiel 2 beschrieben. Anschließend wurden die in der Probe vorhandenen Zellen mittels einer 15-minütigen Inkubation in einer 10 µg/ml

25 ProteinaseK-Lösung oder in einer 250 µg/ml Lysozym-Lösung permeabilisiert. Das

Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 80 %, 100 %, je 3 min).

Die Hybridisierung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben, allerdings in einem
5 Puffer, der 40 % Formamid anstelle von 20 % Formamid enthält. Zudem wurde die
Hybridisierung bei 35°C durchgeführt. Nach 90 Minuten wurde der Objektträger aus
der feuchten Kammer entnommen und in einem Waschpuffer-POD (0,056 mol/l
NaCl; 0,05 mol/l EDTA, 0,02 mol/l Tris/HCl pH 8,0; 0,01 % SDS) für 15 Minuten
bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die hybridisierte Probe für 10 Minuten mit
10 einer Diaminobenzidin-haltigen Substratlösung überschichtet. Zur Herstellung dieser
Lösung wurde eine Diaminobenzidin-haltige Tablette und eine H₂O₂ enthaltende
Tablette aus dem SIGMA FAST DAB Tablet Sets (D4168) in 1 ml Substratpuffer
gelöst (0,15 mol/l NaCl; 0,1 mol/l Tris/HCl pH 8,0). Nachdem die Tabletten
vollständig in dem Substratpuffer gelöst waren, wurden 10 µl dieser fertigen
15 Substratlösung auf die hybridisierten Proben gegeben und 10 Minuten bei RT
inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 1 x PBS gespült und entweder sofort
oder nach einer geeigneten Gegenfärbung mikroskopiert.

Eine geeignete Gegenfärbung war eine HE-Färbung, die auf folgende Weise erstellt
20 wurde. Die feuchten, hybridisierten Objektträger wurden in eine Glasküvette
getaucht, die mit Hämalaun (Merk, Deutschland, Art.-Nr. 1.09249.0500) gefüllt ist.
Nach 3 - 5 Minuten wurden die Objektträger kurz in destilliertem Wasser gespült und
dann 10 Minuten zum Bläuen fließendem kalten Leitungswasser ausgesetzt. Dann
wurde der Objektträger für 3 - 5 Minuten in eine Küvette mit Eosin getaucht.
25 Anschließend wurden die Objektträger kurz in 90 %-igem und dann in absolutem
Ethanol gespült. Abschließend wurde der Objektträger in drei verschiedene Xylol-
Bäder getaucht, bis die Xylol-Lösung klar blieb.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien durch in situ-Hybridisierung, ausgewählt aus der
- 5 Gruppe bestehend aus:
- i)
- 5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'
- 5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'
- 5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'
- 10 5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'
- 5'-CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'
- 5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'
- 5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'
- 5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'
- 15 5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'
- 5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'
- 5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'
- 5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'
- 5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'
- 20 5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'
- 5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'
- 5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'
- 5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3',
- ii) Oligonukleotiden, die mit einem der Oligonukleotide unter i) in mindestens 80 %
- 25 und besonders bevorzugt mindestens 90 %, 92%, 94%, 96% der Basen übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von parodontopathogenen Bakterien der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans*,

Porphyromonas gingivalis, *Bacteroides forsythus* und/oder *Prevotella intermedia* ermöglichen,

- iii) Oligonukleotiden, die sich von einem der Oligonukleotide unter i) und ii) dadurch unterscheiden, dass sie um mindestens ein Nukleotid verlängert sind,
- 5 iv) Oligonukleotiden, die mit einer Sequenz, die zu einem Oligonukleotid unter i), ii) und iii) komplementär ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

2. Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien durch in situ-Hybridisierung, umfassend:

- 10 i) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) DNA-Sequenz, umfassend
- 15 5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'
- 5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'
- oder Teile davon;
- b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
- 20 und/oder
- ii) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Porphyromonas gingivalis*, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
 - a) DNA-Sequenz, umfassend
- 25 5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'
- 5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'
- 5'- CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'
- oder Teile davon;

- b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
und/oder
- 5 iii) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Bacteroides forsythus*, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
- a) DNA-Sequenz, umfassend
- 5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'
- 10 5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'
- 5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'
- 5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'
- 5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'
- 5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'
- 15 oder Teile davon;
- b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfaßt;
 und/oder
- 20 iv) mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Prevotella intermedia*, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) DNA-Sequenz, umfassend
- 5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'
- 25 5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'
- 5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'
- 5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'
- 5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'

- 46 -

5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'

oder Teile davon;

b) DNA-Sequenz, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) hybridisiert, oder Teile dieser

5 Nukleinsäuresequenz umfasst.

3. Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung nach Anspruch 2, umfassend

i) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans* aus

10 der Gruppe bestehend aus

a) DNA-Sequenz, umfassend

5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'

5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'

und/oder

15 ii) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von

parodontopathogenen Bakterien der Art *Porphyromonas gingivalis* aus der Gruppe bestehend aus

5'-CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'

5'-GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'

20 5'-CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'

und/oder

iii) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von

parodontopathogenen Bakterien der Art *Bacteroides forsythus* aus der Gruppe, bestehend aus

25 5'-GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'

5'-CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'

5'-CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'

5'-CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'

- 47 -

5'-TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'

5'-TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'

und/oder

iv) sämtliche Oligonukleotidsonden zum artspezifischen Nachweis von

5 parodontopathogenen Bakterien der Art *Prevotella intermedia* aus der Gruppe bestehend aus

5'-TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'

5'-TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'

5'-TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'

10 5'-CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'

5'-CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'

5'-TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'.

4. Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung nach Anspruch 2 oder 3
15 umfassend sämtliche Oligonukleotidsonden SEQ ID No. 1-17.

5. Verfahren zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien in einer Probe durch in situ-Hybridisierung, umfassend die folgenden Schritte:

a) Fixieren der in der Probe enthaltenen parodontopathogenen Bakterien;

20 b) Inkubieren der fixierten Bakterien mit mindestens einer Oligonukleotidsonde nach Anspruch 1, vorzugsweise mit einer Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2-4, um eine Hybridisierung herbeizuführen;
c) Detektieren und ggf. Quantifizieren der parodontopathogenen Bakterienzellen mit den hybridisierten Oligonukleotidsonden.

25

6. Verfahren nach Anspruch 5,
wobei die Bakterien nach dem Fixieren auf einem Träger immobilisiert werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
wobei die Immobilisierung durch Trocknung oder Filtration erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
5 wobei die Fixierung durch denaturierende Reagenzien, vorzugsweise ausgewählt aus
der Gruppe, bestehend aus Ethanol, Aceton und Ethanol-Essigsäuremischungen,
erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
10 wobei die Fixierung durch quervernetzende Reagenzien, vorzugsweise ausgewählt
aus der Gruppe, bestehend aus Formaldehyd, Paraformaldehyd und Glutaraldehyd,
erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
15 wobei die Fixierung durch Hitzefixierung erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 10,
wobei die Oligonukleotidsonden kovalent mit einem detektierbaren Marker
verbunden sind.

20

12. Verfahren nach Anspruch 11,
wobei der detektierbare Marker ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:
a) Fluoreszenzmarker;
b) Chemolumineszenzmarker;
25 c) radioaktiver Marker;
d) enzymatisch aktive Gruppe;
e) Hapten;
f) durch Hybridisierung nachweisbare Nukleinsäure.

- 49 -

13. Verfahren nach Anspruch 12,
wobei der enzymatische Marker aus der Gruppe, bestehend aus, Peroxidase,
vorzugsweise Meerrettich-Peroxidase, und Phosphatase, vorzugsweise alkalischer
5 Phosphatase, ausgewählt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 13,
wobei die fixierten Zellen vor der Inkubation permeabilisiert werden.

10 15. Verfahren nach Anspruch 14,
wobei die Permeabilisierung durch partiellen Abbau mittels zellwandlytischer
Enzyme erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
15 wobei die zellwandlytischen Enzyme ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend
aus Proteinase K, Pronase, Lysozym und Mutanolysin.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 16, wobei es sich bei den
parodontopathogenen Bakterien um Bakterien der Art *Actinobacillus*
20 *actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* und/oder
Prevotella intermedia handelt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 17 zum artspezifischen
Nachweis von Bakterien der Art *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, wobei das
25 Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
5'-CAT-CAG-CGT-CAG-TAC-ATC-C-3'
5'-AGT-ACT-CCA-GAC-CCC-CAG-3'.

- 50 -

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 17 zum artspezifischen Nachweis von Bakterien der Art *Porphyromonas gingivalis*, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- 5' - CCT-CTG-TAA-GGC-AAG-TTG-C-3'
- 5 5' - GCG-CTC-AGG-TTT-CAC-CGC-3'
- 5' - CGG-TTA-CGC-CCT-TCA-GGT-3'.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 17 zum artspezifischen Nachweis von Bakterien der Art *Bacteroides forsythus*, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- 10 5' - GCT-ACC-ATC-GCT-GCC-CCT-3'
- 5' - CCA-TGC-GGA-ACC-CCT-GTT-3'
- 5' - CCG-CGG-ACT-TAA-CAG-CCC-ACC-T-3'
- 5' - CGA-CAA-ACT-TTC-ACC-GCG-G-3'
- 15 5' - TGA-CAG-TCA-GGG-TTG-CGC-3'
- 5' - TCA-CAG-CTT-ACG-CCG-GC-3'.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 17 zum artspezifischen Nachweis von Bakterien der Art *Prevotella intermedia*, wobei das Oligonukleotid

- 20 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
- 5' - TTG-GTC-CAC-GTC-AGA-TGC-3'
- 5' - TGC-GTG-CAC-TCA-AGT-CCG-3'
- 5' - TGT-ATC-CTG-CGT-CTG-CAA-TT-3'
- 5' - CCC-GCT-TTA-CTC-CCC-AAC-3'
- 25 5' - CAT-CCC-CAT-CCT-CCA-CCG-3'
- 5' - TCC-CCA-TCC-TCC-ACC-GAT-GA-3'.

- 51 -

22. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 5 bis 21, enthaltend mindestens eine Oligonukleotidsonde nach Anspruch 1, vorzugsweise eine Oligonukleotidsonden-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 4.

- 5 23. Kit nach Anspruch 22, weiter enthaltend mindestens eine Hybridisierungslösung, wobei die Oligonukleotidsonden in der Hybridisierungslösung enthalten sein können.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Vermicon AG

<120> Oligonukleotidsonden zur Detektion von
paradontopathogenen Bakterien mittels in
situ-Hybridisierung

<130> V 7296

<140> DE 101 06 370

<141> 2001-02-12

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 1

catcagcgtc agtacatcc

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 2

agtactccag acccccag

18

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 3

cctctgtaag gcaagttgc

19

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotidsonde

• <400> 4
gcgctcaggt ttcaccgc 18

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 5
cggttacgcc cttcaggt 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 6
gctaccatcg ctgcccct 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 7
ccatgcgga cccctggt 18

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 8
ccgcggtt aacagcccac ct 22

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 9

cgacaaaactt tcaccgcg

19

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 10

tgacagtcag ggttgcg

18

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 11

tcacagctta cgccggc

17

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 12

ttggtccacg tcagatgc

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 13

tgcgtgcact caagtccg

18

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 14

tgtatcctgc gtctgcaatt

20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 15

cccgctttac tccccaac

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 16

catccccatc ctccaccg

18

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotidsonde

<400> 17

tccccatcct ccaccgatga

20