

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 559**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06738401 .6**
- 96 Fecha de presentación: **15.03.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1869469**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Detectar y cuantificar rápidamente Legionella viable**

30 Prioridad:
17.03.2005 US 663071 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.04.2012

73 Titular/es:
**Phigenics, LLC
1701 Quincy Ave., Suite 32
Naperville, IL 60540, US**

72 Inventor/es:
MCCOY, William, F.

74 Agente/Representante:
Ruo, Alessandro

ES 2 378 559 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

Detectar y cuantificar rápidamente *Legionella* viable

5 Antecedentes

10 [0001] La enfermedad del legionario es un nombre común para una de las varias enfermedades causadas por la bacteria *Legionella* o de la enfermedad del legionario (LDB). La legionelosis es el estado de estar infectado por bacterias *Legionella* que puede causar neumonía grave. Con mucho, la mayoría de las legionelosis son el resultado de exposición a sistemas de agua de edificios contaminados. Cada año, cientos de miles de personas padecen estas infecciones y muchas decenas de miles mueren debido a legionelosis o sus complicaciones.

15 [0002] Se han clasificado aproximadamente cuarenta y ocho especies de *Legionella* con 70 serogrupos. *L. pneumophila* es responsable de aproximadamente el 80%-85% de las infecciones por *Legionella* y los serogrupos 1 y 6 son responsables de dos tercios de las infecciones por *Legionella*. Otros aislados y serogrupos también contribuyen a infecciones por *Legionella*. Existen 15 serogrupos de *L. pneumophila* y aproximadamente 70 serogrupos en total para *Legionella*. Algunos de los aislados y serogrupos de *Legionella* que causan infección incluyen *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* y *L. anisa*. Se han propuesto dos géneros adicionales: especies que emiten fluorescencia azul-blanca de *Fluoribacter* tales como *L. bozemanii* y *Tatlockia* para la especie *L. micdadei*.

25 [0003] La *Legionella* está ampliamente presente en niveles bajos en el entorno: en lagos, arroyos y estanques. Los calentadores de agua, sistemas de distribución de agua potable, fuentes decorativas, baños de spa, piscinas, humidificadores, torres de agua de refrigeración por evaporación y agua estancada caliente proporcionan las condiciones ideales para el desarrollo y transmisión del riesgo biológico. El agua estancada caliente proporciona las condiciones ideales para el desarrollo. A aproximadamente 30 °C-50 °C (75°-122 °F), el microorganismo se puede multiplicar de forma significativa y rápidamente dentro de su hospedador protozoario, la mayoría de las veces protozoos acuáticos que incluyen diferentes géneros de amebas. El óxido (hierro), incrustaciones y la presencia de otros microorganismos también pueden promover las condiciones que dan como resultado el rápido desarrollo de *Legionella*.

35 [0004] Las medidas preventivas incluyen el mantenimiento y la limpieza regular de sistemas de agua de edificios, tales como torres de refrigeración y condensadores por evaporación para prevenir el desarrollo de *Legionella*, que debe incluir típicamente, por ejemplo, la limpieza dos veces al año y el uso periódico de cloro u otros desinfectantes eficaces; mantener los calentadores de agua domésticos a 60 °C (140 °F); y evitar las condiciones que permiten que se estanque el agua, tales como, por ejemplo, grandes depósitos de almacenamiento de agua expuestos a calor de la luz solar que producen condiciones de calor favorables a altos niveles de *Legionella* y su hospedador protozoario.

40 [0005] De la técnica anterior se conocen varios enfoques para la detección y cuantificación de *Legionella*.

[0006] El documento DE 29 36 294 A1 describe bacterias en desarrollo sobre un dispositivo de placa de cultivo laminar que contiene medio complejo pero selectivo, que contiene inhibidores que evitan el desarrollo de bacterias contaminantes.

45 [0007] El documento WO 02/102824 A describe un procedimiento para detectar bacterias en agua potable y agua superficial, especialmente un procedimiento para la detección específica simultánea de bacterias de las especies de *Legionella* y la especie *Legionella pneumophila* mediante hibridación *in situ*.

50 [0008] Una publicación científica de Bartie C. et al ("Identification methods for *Legionella* from environmental samples", *Water Research* 37(6): 1362-1370, 2003) también trata de la detección y cuantificación de *Legionella*.

55 [0009] La detección de *Legionella* mediante el Procedimiento Convencional, tal como se requiere por muchas directrices respaldadas por el gobierno, códigos de práctica, estándares, regulaciones o leyes tales como, por ejemplo, las directrices de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA), necesita aproximadamente 10 días debido al largo tiempo de incubación requerido para que se desarrolle *Legionella* detectable. Por tanto, la confirmación definitiva de *Legionella* viable requiere aproximadamente diez días cuando se usa el Procedimiento Convencional para la detección. Durante este periodo la *Legionella* se habría multiplicado y propagado *in situ* y en muchos casos las instalaciones se tienen que clausurar, dando como resultado retrasos en la producción u ocupación limitada o evacuación y, por lo tanto, sustanciales pérdidas económicas. De acuerdo con las especificaciones de la OSHA, se puede considerar que un sitio está potencialmente contaminado de forma peligrosa con bacterias *Legionella* si están presentes al menos 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de *Legionella* en un sistema de distribución de agua potable o 100 UFC/ml en un sistema de enfriamiento de agua. En humidificadores se considera incluso 1 UFC/ml potencialmente peligrosa de acuerdo con estas directrices de la OSHA.

65

[0010] Para el Procedimiento Convencional se usa un medio de extracto de levadura y carbón tamponado (BCYE) para desarrollar y cultivar *Legionella*. Varios refinamientos y mejoras dieron como resultado el medio BCYE preferido actualmente, que está enriquecido con α -cetoglutarato (medio BCYE- α de Edelstein) con y sin agentes antimicrobianos selectivos y colorantes indicadores. Este medio puede complementarse con albúmina sérica bovina en algunos casos.

[0011] El Procedimiento Convencional, tal como se describe en la publicación de 1998 titulada "Water Quality Detection and Enumeration of Legionella", de la Organización Internacional de Normalización de Ginebra, Suiza, que se denomina de forma común la norma ISO 11731, especifica el uso del medio BCYE- α complementado con glicina sin amoníaco, vancomicina, polimixina B y cicloheximida (GVPC). Además de estos complementos, GVPC contiene pirofosfato férrico, L-cisteína, α -cetoglutarato. Este procedimiento es en general coherente con el procedimiento original desarrollado por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades y con los procedimientos convencionales usados en Australia y Singapur (AU/NZ 3896). Se usa un procedimiento que es sustancialmente similar a estos en Francia (AFNOR T90431). En este Procedimiento Convencional, al igual que con los otros, se requieren etapas de selectividad, tales como tratamiento con ácido y/o tratamiento con calor para inhibir la competencia de bacterias que crecen más rápido que pueden superar a la *Legionella* en la muestra.

[0012] El Procedimiento Convencional requiere un protocolo para obtener las muestras, enviar las mismas de vuelta a un laboratorio de análisis y utiliza un medio especializado. El procedimiento requiere extender un pequeño volumen de muestra (0,1 ml) sobre la superficie de agar de extracto de levadura y carbón tamponado complementado con factores de crecimiento y antibióticos e incubar después los medios y la muestra a una temperatura y humedad constantes durante hasta 10 días. El largo tiempo de incubación es necesario debido a que las bacterias *Legionella* se desarrollan lentamente en este medio de cultivo. El desarrollo sobre la superficie de agar tiene que ser suficiente para que un microbiólogo cuente el número de unidades formadoras de colonias (UFC) sobre la superficie del agar después de hasta diez días de incubación. El recuento de UFC se usa para determinar una concentración de células viables calculando el valor por unidad de volumen. Por ejemplo, una placa con 10 UFC de 0,1 ml de muestra no diluida indica una concentración de *Legionella* viable de 100 UFC/ml de muestra.

[0013] Sin embargo, varios factores limitan el uso del procedimiento de cultivo Convencional. En primer lugar, la experiencia de un analista con el Procedimiento Convencional está correlacionada directamente con la cuantificación de patógeno. En segundo lugar, el Procedimiento Convencional requiere diez días para obtener resultados confirmados, debido al lento desarrollo de *Legionella* sobre placas de agar y los ensayos de confirmación requeridos. En tercer lugar, la preparación del medio tiende a error y requiere un extenso control de calidad. En cuarto lugar, el patógeno es sensible a factores que son difíciles de controlar durante el tránsito de la muestra. En quinto lugar, las etapas de concentración usadas para conseguir menores límites de detección son ineficaces y no siempre fiables, por ejemplo, se recupera menos del 50% de *Legionella* viable durante el procesamiento de la concentración de muestra. En sexto lugar, el procedimiento requiere desarrollar el patógeno en un alcance que produzca muchas colonias visibles que contengan cada una millones o miles de millones de bacterias causantes de enfermedad potencialmente infectivas sobre la superficie de las placas de agar. Esta operación es peligrosa y, por lo tanto, se tiene que realizar por analistas entrenados especialmente en laboratorios equipados apropiadamente para garantizar la seguridad de los analistas y la comunidad circundante.

[0014] Otros procedimientos que se usan, además del Procedimiento Convencional que se ha descrito anteriormente, son los procedimientos moleculares. Los procedimientos moleculares son más rápidos, menos caros, menos subjetivos, más sensibles y son aptos para realizarse en el campo. Sin embargo, todos padecen dos limitaciones críticas -ninguno de los procedimientos moleculares disponibles en el mercado o de otro modo son capaces de 1) diferenciar entre células viables de *Legionella*, es decir, que puedan desarrollarse y cuantificarse en las condiciones (medio, temperatura de incubación) especificadas en el Procedimiento Convencional y el fondo de *Legionella* no viable o muerta y 2) no se puede obtener ninguna determinación cuantitativa de células de *Legionella* por unidad de volumen (tal como mililitros o litros) a partir de los datos. Por tanto, en la práctica, solamente el Procedimiento Convencional que se ha mencionado anteriormente es capaz de detectar el efecto de la desinfección de un sitio contaminado o sospechoso, debido a que es el único procedimiento que es capaz de distinguir entre bacterias *Legionella* viables y no viables y *cuantificar* el riesgo. Tal detección diferencial y cuantificable es un requisito esencial para confirmar el control del riesgo eficaz en sistemas de agua sometidos a estudio técnico. Sin embargo, la diferenciación cuantitativa de *Legionella* viable no es un requisito en la mayoría de las aplicaciones clínicas.

[0015] Los procedimientos moleculares de la detección de *Legionella* incluyen detección de ácido nucleico usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y procedimientos serológicos mediante reacciones de antígeno/anticuerpo detectadas con ensayos inmunoespecíficos ligados a enzimas (ELISA) o un recuento celular directo de anticuerpo fluorescente diferencial. Estos sistemas de detección moleculares son útiles en el laboratorio clínico para el diagnóstico y el sero-agrupamiento de *Legionella*. Sin embargo, para muestras ambientales o industriales, los procedimientos con ácido nucleico o serológicos deben usarse solamente como una exploración rápida para identificar las muestras que estén completamente libres de cualquier *Legionella* y no como una base para detectar o cuantificar *Legionella* viable y cultivable.

[0016] Algunos de los atributos distintivos del Procedimiento Convencional en comparación con todos los demás procedimientos son: 1) diferenciar *Legionella* viable de no viable; 2) medir todas las especies y serogrupos cultivables de *Legionella*; 3) proporcionar un recuento de *Legionella* viable que se pueda expresar por unidad de volumen o peso de muestra; 4) reconocimiento global de la validez.

5 **[0017]** Algunas de las graves limitaciones del Procedimiento Convencional en comparación con todos los demás procedimientos son: 1) se requiere un periodo de incubación largo de diez días antes de que se puedan contar visualmente las UFC debido a que la *Legionella* se desarrolla lentamente en medios sólidos; 2) el almacenamiento de placas de agar durante diez días durante la incubación requiere un significativo espacio de incubador y condiciones controladas de humedad; 3) los sistemas, tales como agua de enfriamiento, agua doméstica, suelos y similares de los que se han tomado las muestras cambian habitualmente de forma muy significativa durante el periodo de incubación de diez días; 4) el acto de cultivar riesgos biológicos tomados del entorno hasta colonias visibles que comprenden millones o miles de millones de bacterias viables más infectivas es peligroso y tiene que realizarse, por lo tanto, en un laboratorio con personas entrenadas y equipamiento especial; y 5) clausurar la producción en una instalación contaminada o sospechosa de estar contaminada con *Legionella*, cerrar la instalación o restringir el acceso a la misma durante 10 días mientras que se espera la confirmación de que se ha controlado el riesgo biológico da como resultado una pérdida económica significativa. Existen muchos ejemplos de pérdidas económicas altamente significativas de tales clausuras o restricciones de instalaciones.

10 **[0018]** Un sistema de detección rápido de *Legionella* que puede cuantificar *Legionella* viable en unidades de viabilidad que sean equivalentes a las usadas en el Procedimiento Convencional y también que sea apto para usarse de manera segura en un entorno de campo, por lo tanto, es deseable.

Sumario

25 **[0019]** La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

30 **[0020]** Se describen procedimientos y composiciones para detectar y cuantificar *Legionella* viable y cultivable que incluyen placas de cultivo laminar que contienen un medio absorbente para absorber una muestra de agua. Las placas de cultivo laminar y los procedimientos de cuantificación descritos en este documento permiten una estimación numérica de *Legionella* viable y cultivable en el intervalo de unas pocas horas en comparación con los 10 días requeridos por el procedimiento convencional. La detección y cuantificación basada en placa de cultivo laminar de *Legionella* (i) es un procedimiento rápido apto para realizarse en el campo; (ii) no requiere equipamiento de laboratorio sofisticado, tal como microscopios o equipamiento protector especial; (iii) es seguro y (iv) se puede realizar sin especialistas altamente entrenados, tales como microbiólogos.

40 **[0021]** Los dispositivos descritos en este documento respaldan el desarrollo y la detección de unidades formadoras de microcolonias (UFM) en el intervalo de horas, permitiendo de este modo la detección y cuantificación temprana. La detección más temprana de las microcolonias mediante los procedimientos y las composiciones descritos en este documento minimiza la contaminación con *Legionella*, reduce la pérdida económica debido a una posible clausura más prolongada de instalaciones de trabajo y permite procedimientos de descontaminación más rápidos.

45 **[0022]** En otro aspecto se describe un procedimiento de "Número Más Probable" (MPN) para determinar cuantitativamente *Legionella* viable, que es un procedimiento analítico para determinar rápidamente (en el intervalo de horas) la presencia y cantidad de bacterias *Legionella* viables.

50 **[0023]** El término "viable" como se usa en este documento significa capaz de multiplicarse y capaz de ser cultivado en las condiciones de desarrollo proporcionadas en este documento o en un medio capaz de respaldar el desarrollo de *Legionella*. Las células viables forman colonias en medio de cultivo sólido. El término "cultivable" significa que el microorganismo es capaz de desarrollarse en el medio de cultivo proporcionado en el presente documento o en un medio capaz de respaldar el desarrollo de *Legionella*.

55 **[0024]** La expresión "placa de cultivo laminar" o "paleta" o "muestreador de placa de cultivo laminar" o "muestreador de paleta" o "dispositivo de ensayo de placa de cultivo laminar" significa un dispositivo que incluye un soporte sólido, un medio absorbente y sustancias que promueven el desarrollo para microorganismos, ensamblados en una configuración de tipo placa o de tipo paleta para el manejo y el almacenamiento sencillos.

60 **[0025]** La expresión "Procedimiento Convencional" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento convencional de detección y cuantificación de *Legionella* publicado por la Organización Internacional de Normalización de Ginebra, Suiza, que se denomina de forma común la norma ISO 11731 y procedimientos sustancialmente similares, tales como el procedimiento francés AFNOR, la norma AU/NZ y el procedimiento de CDC. El Procedimiento Convencional requiere aproximadamente 10 días para la incubación y cuantificación de *Legionella*.

65 **[0026]** La expresión "medio absorbente" se refiere a cualquier sólido, semisólido, gel, polímero, matriz, capa de membrana o estructura que sea capaz de absorber o adsorber o recibir o retener una cantidad especificada de

muestra biológica.

[0027] La expresión "unidades formadoras de microcolonias" (MFU) se refiere a un pequeño agregado de células bacterianas (menos del 0,01% del número de células bacterianas en una colonia visible) que se convierte en visible después del aumento de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces. El tamaño de las microcolonias varía de unos pocos micrómetros de diámetro a aproximadamente 500 micrómetros de diámetro. Una colonia bacteriana normal puede tener de 0,5 mm a 10 mm o 15 mm de diámetro y contiene generalmente millones o miles de millones de bacterias. Una microcolonia es menor y contiene generalmente unos pocos cientos o miles de bacterias. Las microcolonias se observan directamente o con el aumento disponible generalmente con una cámara digital (2x-10x) sobre la superficie de placas de cultivo laminar después de aproximadamente 24 h a 44 h y con ayuda de agentes de detección y procedimientos de formación de imágenes descritos en el presente documento, la detección de microcolonias de *Legionella* se consigue en unas pocas horas, por ejemplo, aproximadamente 6-8 horas.

[0028] La expresión "reactivo de detección" se refiere a cualquier agente que sea capaz de identificar selectivamente *Legionella*.

[0029] Se describe un procedimiento de cuantificación rápida de bacterias *Legionella* viables en una muestra que incluye las etapas de:

- (a) proporcionar una placa de cultivo laminar que comprende un medio absorbente, en la que el medio absorbente incluye nutrientes para cultivar *Legionella* y al menos un agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella*;
- (b) poner en contacto la placa de cultivo laminar con la muestra durante un periodo de tiempo predeterminado, en el que la placa de cultivo laminar se calibra para absorber una cantidad predeterminada de la muestra;
- (c) incubar la placa de cultivo laminar a una temperatura en el intervalo de 30 °C a aproximadamente 45 °C durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 48 horas;
- (d) detectar el desarrollo de bacterias *Legionella* en la placa de cultivo laminar con un reactivo de detección, en el que el agente de detección identifica selectivamente *Legionella*; y
- (e) cuantificar la cantidad de bacterias *Legionella* viables en la muestra.

[0030] El medio absorbente comprende agarosa en un intervalo de aproximadamente el 0,5% en peso a aproximadamente el 10,0% en peso. El reactivo de detección se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo, una mezcla de anticuerpos, una sonda y combinaciones de los mismos.

[0031] El anticuerpo es específico para *Legionella* seleccionada entre un grupo que incluye los serogrupos 1-13 de *Legionella pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumofii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* y *L. anisa* y otras especies, subgrupos y serogrupos de *Legionella*.

[0032] La muestra se selecciona entre un grupo que incluye un colorante, un colorante potenciador del color, un colorante de contraste de fases, una sonda marcada, una sonda fluorescente, una sonda colorimétrica, una sonda de ácido nucleico y combinaciones de los mismos. La detección de *Legionella* es mediante una fuente de luz ultravioleta.

[0033] El medio absorbente se calibra para absorber aproximadamente 0,3 ml de la muestra en aproximadamente 60 segundos. El reactivo de detección aumenta el contraste para la formación de imágenes del desarrollo de *Legionella*. El reactivo de detección destruye la *Legionella*. El reactivo de detección incluye un compuesto antimicrobiano seleccionado entre un grupo que incluye isotiazolona, glutaraldehído, formaldehído, compuestos cuaternarios de amonio, dibromonitropropionamida, beta-bromonitroestireno, antimicrobianos de carbamato, antimicrobianos de tris-nitrometano, benzoato sódico, ácido orgánicos, etanol, isopropanol, gluconato de clorhexidina, diacetato de clorhexidina, o-fenil fenol y cualquier compuesto antimicrobiano adecuado.

[0034] Un agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella* incluye colorantes, glicina, vancomicina y polimixina (DGVP) y/o un ácido inorgánico u orgánico. Un agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella* incluye cefalotina, colistina, vancomicina y cicloheximida (CCVC).

[0035] El desarrollo de *Legionella* se detecta como una microcolonia, teniendo la microcolonia aproximadamente 10-500 micrómetros de diámetro. El desarrollo de *Legionella* se detecta como una microcolonia bajo un aumento en el orden de aproximadamente 2x a aproximadamente 10x.

[0036] Se describe un sistema de detección con placa de cultivo laminar para cuantificar rápidamente bacterias *Legionella* viables en una muestra que incluye:

- (a) una placa de cultivo laminar que incluye un medio absorbente, incluyendo el medio absorbente nutrientes para cultivar *Legionella*, al menos un agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella*, estando adaptada la placa de cultivo laminar para absorber una cantidad predeterminada de la

muestra; y

(b) un reactivo de detección para cuantificar la cantidad de bacterias *Legionella* viables en la muestra, inhibiendo el reactivo de detección el desarrollo de *Legionella*.

5 [0037] Se describe una placa de cultivo laminar para cuantificar rápidamente bacterias *Legionella* viables en una muestra, la placa incluye un medio absorbente, nutrientes para bacterias *Legionella*, al menos un agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella* y estando adaptada la placa de cultivo laminar para absorber una cantidad predeterminada de la muestra.

10 [0038] Un procedimiento de cuantificación rápida de bacterias *Legionella* viables en una muestra incluye las etapas de:

(a) proporcionar un medio de cultivo líquido para bacterias *Legionella* que contiene sustancias que previenen el desarrollo para bacterias no-*Legionella*;

15 (b) realizar diluciones en serie de la muestra, estando diseñadas las diluciones en serie para dar como resultado una dilución que no contenga ninguna bacteria *Legionella*;

(c) incubar las diluciones en serie a una temperatura en el intervalo de 30 °C a aproximadamente 45 °C durante un periodo de aproximadamente 6-8 horas a aproximadamente 44 horas;

20 (d) detectar la presencia de desarrollo de *Legionella* en las diluciones en serie con un agente de detección; y

(e) aplicar un procedimiento estadístico de número más probable (MPN) para cuantificar la cantidad de bacterias *Legionella* viables presentes en la muestra.

[0039] Existen 15 serogrupos de *L. pneumophila* y aproximadamente 70 serogrupos en total para *Legionella*. Algunos de los aislados y serogrupos de *Legionella* que causan infección incluyen *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* y *L. anisa*. Se han propuesto otros dos géneros: especies que emiten fluorescencia azul-blanca de *Fluoribacter* tales como *L. bozemanii* y *Tatlockia* para la especie *L. micdadei*. Los parientes filogenéticamente próximos de *Legionella* también se pueden detectar y cuantificar usando los procedimientos descritos en el presente documento.

30 Breve descripción de los dibujos

[0040] Los dibujos se proporcionan para ilustrar algunas de las realizaciones de la descripción. Los dibujos que no pertenecen a la invención reivindicada sirven solamente a fines ilustrativos.

35 [0041] La **Figura 1** muestra la superficie de una placa de cultivo laminar de *Legionella* usada para la determinación rápida de concentraciones de células viables en muestras de agua. Esta placa se sumergió durante 60 segundos en una suspensión de células viables de aproximadamente 1000 UFC/ml (KCI 0,1 M estéril) de *Legionella pneumophila* ATCC 33152. El aumento de peso después de 60 s de inmersión fue aproximadamente 0,3 g. Por lo tanto el volumen de muestra absorbido fue aproximadamente 0,3 ml. La placa de cultivo laminar se incubó durante

40 aproximadamente 45 horas a 35 °C. Se imprimieron fotografías digitales con una saturación de color del 0%, contraste máximo y ajustando el brillo más (B) o menos (A). Se muestra aproximadamente el tamaño real de las placas de cultivo laminar. Las unidades formadoras de microcolonias (UFM) se muestran como se indica por las flechas.

45 [0042] La **Figura 2** muestra un muestreador de paleta (B) y recipiente (A) como parte del conjunto de placa de cultivo laminar.

Descripción detallada

50 [0043] Se proporcionan un procedimiento y un sistema de campo analítico rápido que utiliza una placa de cultivo laminar rápida. El procedimiento de placa de cultivo laminar rápida para determinar cuantitativamente *Legionella* viable es un procedimiento analítico para determinar rápidamente (en el intervalo de horas) la presencia y cantidad de bacterias *Legionella* viables. La *Legionella* viable se puede enumerar el mismo día en que se toma la muestra. A diferencia del procedimiento convencional, los procedimientos y dispositivos descritos en el presente documento se

55 realizan en el campo en el lugar en el que se toma la muestra. Los resultados, que estadísticamente son equivalentes a los obtenidos con el Procedimiento Convencional, están disponibles el mismo día en que se toma la muestra en el campo sin necesidad de envío y sin necesidad de reactivos o instrumentos especiales para interpretar los resultados.

60 [0044] Se describe que una placa de cultivo laminar se prepara del siguiente modo. El medio convencional BCYE se prepara con modificaciones para hacer que sea adecuado para su uso en el formato de placa de cultivo laminar. Las modificaciones del medio están descritas en el presente documento.

65 [0045] La preparación de medio absorbente implica el uso de agarosa o cualquier medio absorbente adecuado. En comparación con el procedimiento convencional se usa aproximadamente el 0,5-10% más de agarosa para preparar el medio absorbente para placas de cultivo laminar usadas en el presente documento. Por ejemplo, se calibra

agarosa al 1,3% para absorber aproximadamente 0,3 ml o 0,3 g de la muestra en aproximadamente 60 segundos. El aumento de la concentración de agarosa da como resultado que se absorbe una menor cantidad de la muestra. Dependiendo de los requisitos se puede usar una concentración de agarosa del 0,5 a aproximadamente el 10% para calibrar el medio absorbente. Por ejemplo, ajustando la concentración de agarosa se absorben aproximadamente 0,1 ml de la muestra en el intervalo de un periodo de tiempo predeterminado, por ejemplo, 1 min. El usuario también se puede instruir para variar el tiempo de inmersión en lugar de variar la concentración de agarosa. Por ejemplo, manteniendo la concentración de agarosa constante en el 1,5%, las placas de cultivo laminar se pueden sumergir durante un periodo de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2,0 minutos dependiendo de la calidad de la muestra, recuento bacteriano y volumen de la muestra. En un experimento para cuantificar *Legionella* viable se pueden sumergir varias placas de cultivo laminar en la muestra durante un periodo de tiempo variable y compararse. En un aspecto, la concentración de agarosa puede variar de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 5,0%. La concentración de agarosa también puede variar de aproximadamente el 0,8% a aproximadamente el 1,6% y de aproximadamente el 1,0% a aproximadamente el 2,0%. La menor concentración posible de agarosa o cualquier material polimérico o de gelificación adecuado que se puede usar en una placa de cultivo laminar depende de la estabilidad del medio absorbente polimerizado resultante y su capacidad de retenerse en el conjunto de placa de cultivo laminar durante las etapas de manejo del muestreo. También se describe un medio absorbente capaz de respaldar el desarrollo bacteriano en una placa de cultivo laminar.

[0046] Durante la preparación del medio absorbente se incorporan sustancias que promueven el desarrollo. Las sustancias que promueven el desarrollo para *Legionella* incluyen los componentes del medio de extracto de levadura y carbón tamponado (BCYE). El medio BCYE está enriquecido con α -cetoglutarato (medio BCYE- α de Edelstein) y otros aminoácidos promotores del desarrollo y metabolitos se pueden incorporar para aumentar selectivamente el desarrollo de *Legionella*. Un medio de cultivo que respalda el desarrollo de *Legionella* pertenece al alcance de la presente descripción. El medio de cultivo se puede complementar con uno o más aminoácidos, micro y macronutrientes y complementos selectivos. Por ejemplo, el medio de complemento selectivo MWY de *Legionella* de Oxoid Limited (Reino Unido; código de producto SR0118) incluye por 100 ml del medio glicina 0,3 g; polimixina B 5.000 UI; anisomicina 8,0 mg; vancomicina 100 μ g; azul de bromotimol 1,0 mg; y violeta de bromocresol 1,0 mg.

[0047] Durante la preparación del medio absorbente, en un aspecto se pueden incorporar sustancias selectivas del desarrollo tales como antibióticos. Las sustancias selectivas del desarrollo, tales como compuestos liberadores de ácidos y antibióticos para prevenir el desarrollo de microorganismos no-*Legionella* se incorporan en el medio absorbente. Estos compuestos también se pueden añadir después de que se haya preparado el medio absorbente.

[0048] La incorporación de indicadores colorimétricos, tales como un sistema de antígeno de *Legionella* usado en los sistemas de anticuerpo/antígeno inmunológicos moleculares o el anticuerpo fluorescente, tal como el usado en el sistema de FISH, ayudan y aumentan la detección y cuantificación temprana de *Legionella*. Alguno de los indicadores se puede incorporar directamente en el propio medio absorbente o se pueden añadir posteriormente durante la etapa de detección como un reactivo separado. El reactivo de anticuerpo específico de *Legionella* se añade directamente a la superficie de la placa de cultivo laminar seguido de reactivos de detección marcados. Por ejemplo, se añade anticuerpo policlonal anti-*Legionella* de conejo o ratón conjugado con la enzima peroxidasa de rábano rusticano a la superficie de las placas de cultivo laminar después de que se hubiesen incubado las placas con la muestra durante aproximadamente 6-10 horas o hasta aproximadamente 40 horas. Después de que se hayan unido los anticuerpos a las proteínas específicas de *Legionella* se añade un sustrato cromógeno, tal como TMB, para detectar la unión antígeno-anticuerpo. El TMB es un cromógeno que proporciona un color azul cuando se oxida con peróxido de hidrógeno (catalizado por HRP) con absorbancias importantes a 370 nm y 652 nm (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Después, el color cambia a amarillo con la adición de ácido sulfúrico o fosfórico con absorbancia máxima a 450 nm. El análisis de la unión antígeno-anticuerpo descrito en el presente documento también se puede realizar en membranas de nylon o nitrocelulosa que contienen las colonias bacterianas. Las membranas se usan para desprender las colonias bacterianas (véase el Ejemplo 4) y los procedimientos descritos en el presente documento se pueden aplicar para detectar y cuantificar *Legionella* transferida a las membranas.

[0049] Este mismo enfoque es altamente útil cuando los anticuerpos son anticuerpos monoclonales para epítomos de cepas que se sabe que están asociadas con brotes graves de legionelosis, tales como Mab2, de los CDC.

[0050] En un aspecto se pueden usar también sondas de ADN para detectar y cuantificar *Legionella*. Por ejemplo, las sondas de ADN marcadas fluorescentemente que son específicas para o complementarias a una región única de ADN de *Legionella* son útiles para practicar la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La FISH se puede practicar directamente sobre la superficie de las placas de cultivo laminar o sobre las membranas a las que se han transferido las colonias. Se puede usar un agente de permeabilización e inmovilización celular para fijar las microcolonias bacterianas sobre la superficie de la agarosa o sobre las membranas antes de la aplicación de las sondas fluorescentes. Las sondas marcadas fluorescentemente se pueden visualizar bajo UV u otras fuentes de luz apropiadas.

[0051] En un aspecto están incluidas sustancias de inhibición del desarrollo tales como antimicrobianos, biocidas, agentes bactericidas, antibacterianos, en el reactivo de detección para detectar e inhibir simultáneamente el desarrollo adicional de *Legionella*, minimizando de este modo la contaminación. Por ejemplo, la isotiazolona

antimicrobiana (Rohm and Haas, Philadelphia, PA) es una sustancia inhibidora del desarrollo adecuada que se puede añadir durante la fase de detección o después de la fase de detección para el fin de destruir completamente las microcolonias de bacterias patógenas de modo que se pueda desechar de forma segura el dispositivo.

5 **[0052]** Las placas de cultivo laminar descritas en el presente documento se pueden usar del siguiente modo: se obtiene una muestra de agua usando una técnica aséptica. Se retira la placa de cultivo laminar de la cubierta y se sumerge en la muestra durante aproximadamente 30-60 segundos dependiendo de la placa de cultivo laminar y la muestra. La placa de cultivo laminar se pone en la cubierta y se incuba durante aproximadamente cuatro a cuarenta horas a aproximadamente 30 °C. Después de aproximadamente cuatro horas a cuarenta horas se desarrollan unos
10 pocos cientos a miles de células sobre la superficie del agar. Esta cantidad bacteriana es demasiado pequeña para verse sin ayuda de un equipamiento de aumento sofisticado a menos que se trate con los procedimientos descritos en el presente documento. Estas microcolonias, que contienen menos de aproximadamente el 0,01% del número de patógenos que se requeriría para contar las mismas en el Procedimiento Convencional, se visualizan sin un microscopio con una cámara digital y/o con ayuda de reactivo de detección o una combinación de estos
15 procedimientos como se describe en el presente documento. Las microcolonias o unidades formadoras de microcolonias (UFM) se cuentan sobre la superficie de la placa de cultivo laminar y los datos se almacenan como una imagen digital para una referencia futura.

[0053] Existen al menos cinco tipos de agentes de revelado que son adecuados para la detección y cuantificación de *Legionella* sobre placas de cultivo laminar. Una solución del anticuerpo usado para detectar antígeno Lp de *Legionella* es adecuada. Se puede usar un sistema de detección colorimétrico usado en el ensayo de antígeno de orina (Binax, Inc., Scarborough, ME). Además se usa un sistema de antígeno-anticuerpo, en el que el anticuerpo es capaz de reaccionar con varias especies y serotipos de *Legionella*. Un diodo de UV portátil o lámpara de mercurio, por ejemplo, se usa para iluminar la superficie de la placa de cultivo laminar para visualizar las microcolonias de *Legionella*. El sistema de reactivo usado en el sistema de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) es adecuado para
20 detectar *Legionella* en la placa de cultivo laminar descrita en el presente documento (Vermicon AG, Munich, Alemania). También es adecuado un sistema colorimétrico de biomasa simple para visualizar la presencia de microcolonias sobre la superficie de la placa de cultivo laminar, tal como pulverizar la superficie con ninhidrina para que reaccione con proteínas o un colorante vital como azul de metileno para que reaccione con la biomasa.
25

[0054] Como se describe en el presente documento, el procedimiento de placa de cultivo laminar también puede usar una "transferencia de réplica", colocando suavemente un trozo estéril de papel de filtro o membrana sobre la superficie de la placa de cultivo laminar y desprendiendo después cuidadosamente el mismo y llevando consigo las células que se han multiplicado hasta microcolonias sobre la superficie de la placa de cultivo laminar. La réplica de papel de filtro o membrana se revela con los reactivos descritos en el presente documento. La transferencia de réplica puede eliminar la interferencia del fondo de los contenidos de los medios, tales como los que pueden existir en el agar BCYE. En otro aspecto, este procedimiento puede requerir una "placa de réplica", colocando suavemente un trozo estéril de vidrio con dimensiones de área superficial iguales al área superficial de la placa de cultivo laminar sobre la placa de cultivo laminar durante un periodo de aproximadamente un segundo y después retirando la placa. La biomasa de las microcolonias sobre la placa de cultivo laminar se adherirá a la superficie del vidrio. Después se "fija mediante calor" la biomasa manteniendo una llama abierta debajo del vidrio durante aproximadamente 1 s. Las proteínas, hidratos de carbono y lípidos fijados con calor adheridos a la placa se pueden detectar ahora con los sistemas de detección descritos en el presente documento.
30
35
40

[0055] No se necesita ninguna réplica de membrana cuando la detección y cuantificación se realizan sobre la superficie de la placa de cultivo laminar directamente. Por ejemplo, un usuario en el campo, después de un periodo de incubación de 6-8 horas, sumerge la placa en una solución de reactivo que puede tener un agente de detección adecuado tal como un anticuerpo específico de *Legionella* o una sonda de ácido nucleico o un agente potenciador del color. La placa de cultivo laminar se expone al reactivo durante unos pocos minutos hasta unas pocas horas. El reactivo también puede tener un agente bactericida que destruya o inhiba el desarrollo de *Legionella*. Después se visualiza la placa de cultivo laminar con ayuda de un equipamiento de aumento, tal como el zoom digital u óptico de una cámara digital. Se captura una imagen digital a un aumento 2x-10x y se cuantifica contando las unidades formadoras de microcolonias.
45
50

[0056] El número de microcolonias detectadas sobre la superficie de la placa de cultivo laminar de *Legionella* se usa para estimar el número de células viables por ml de muestra dependiendo de cómo se calibre el agar para absorber una cantidad predeterminada de muestra. Por ejemplo, si aparecen 100 unidades formadoras de microcolonias (UFM) después de 10 horas de incubación sobre la superficie de una placa de cultivo laminar que tenía una concentración de agar del 1,3% en peso y se sumergió durante 60 segundos, entonces se habrían absorbido aproximadamente 0,3 ml de la muestra y, por lo tanto, el recuento de colonias por ml es aproximadamente 333.
55
60

[0057] La *Legionella* se desarrolla directamente sobre la parte superior de una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa), en la que la tira de membrana se pone sobre la parte superior de una capa de agar para la absorción de nutrientes. La tira de membrana se usa directamente para la detección posterior, tal como se describe en el presente documento. Algunos de los reactivos de detección (por ejemplo, TMB) se incorporan en la propia agarosa
65

para la detección posterior.

[0058] El sistema de detección de *Legionella* analítico rápido para el uso de campo puede utilizar también un procedimiento de "número más probable" (MPN) para determinar cuantitativamente la *Legionella* viable. Este procedimiento es un procedimiento analítico para determinar rápidamente (en el intervalo de horas) la presencia y cantidad de bacterias *Legionella* viables. La *Legionella* viable se puede enumerar el mismo día en el que se toma la muestra. La técnica de MPN es un procedimiento estadístico y se ha usado para enumerar bacterias viables (procariotas) en muestras de agua, aire, alimentos y otras sustancias. En resumen, el procedimiento de MPN implica el uso de diluciones en serie realizadas por réplicas de 3 o 5 o 7. Los tubos se llenan con 9 ml de medio estéril y se inoculan con pasta de sedimento o directamente con sedimento usando una jeringa de 5 ml. Las diluciones de factor diez se realizan a lo largo de tres a seis etapas, suficiente para que las últimas diluciones probablemente no contengan procariotas en desarrollo. Los tubos que muestran un desarrollo positivo enturbiándose después de una incubación se registran y usan para calcular el número más probable de células viables en la muestra original de acuerdo con una tabla estadística convencional basada en la función de probabilidad.

[0059] No se ha concebido ningún procedimiento de MPN en campo para la cuantificación de *Legionella*. Los procedimientos de Número Más Probable (MPN) se usan en microbiología alimentaria y aplicaciones de higiene. La detección convencional de *Legionella* mediante procedimientos convencionales de MPN puede llevar varios días debido al lento desarrollo de *Legionella*. Los procedimientos descritos en el presente documento aumentan la velocidad con la que el MPN es útil para enumerar el recuento bacteriano en el intervalo de unas pocas horas a aproximadamente 2 días.

[0060] Un ejemplo del procedimiento de detección basado en MPN es el siguiente. Se prepara medio líquido convencional para *Legionella* del siguiente modo -5 g de albúmina sérica bovina, fracción V; 10 g de ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico (ACES); 10 g de extracto de levadura; 0,4 g de HCl de L-cisteína; 0,25 g de pirofosfato férrico soluble se disolvieron en 800 ml de destilado y el pH se ajustó a pH 6,9 con hidróxido de potasio 1 N. La solución se esterilizó mediante filtración y se almacenó a 4 °C durante hasta seis meses, protegida contra exposición a luz. Se puede preparar una solución madre que tiene una fuerza de hasta 3X y diluirse como se necesite posteriormente. Las modificaciones de los medios convencionales descritos en el presente documento incluyen incorporación de sustancias aceleradoras del desarrollo, tales como más nutrientes; incorporación de indicadores colorimétricos, tales como el sistema de antígeno de *Legionella* o los indicadores de anticuerpos fluorescentes; y el uso de un sistema de detección tal como un reactivo de revelado para el antígeno o un iluminador de diodo de UV portátil para indicar la presencia de colonias microscópicas.

[0061] Un ejemplo del procedimiento de MPN incluye las siguientes etapas -se obtiene una muestra de agua; la muestra se inocula por triplicado; las muestras se diluyen en serie por triplicado. Se realizan cuatro diluciones más por triplicado. Después de aproximadamente 4-8 horas probablemente se han desarrollado unos pocos cientos a miles de células en los tubos positivos. Generalmente, este número es demasiado bajo para dar como resultado una turbidez visible a simple vista. Sin embargo, usando agentes de detección y visualización descritos en el presente documento se visualizan los pocos cientos a miles de células en los tubos positivos. Como se describe en el presente documento existen varios tipos de agentes de detección que son adecuados para visualizar *Legionella*. Estos incluyen reactivos de anticuerpo, sistema de detección colorimétrico, una lámpara de diodo de UV portátil, sistema FISH (hibridación in situ fluorescente) y un sistema de detección de proteína tal como ninhidrina o un colorante vital tal como azul de metileno para reaccionar con la biomasa.

[0062] Este procedimiento puede requerir la filtración con jeringa. Un cc de la muestra de cada tubo se filtra a través del filtro de la punta de la jeringa. El papel de filtro se revela ahora con los reactivos descritos en el presente documento. La etapa de filtración puede eliminar la interferencia de fondo de los contenidos de los medios.

[0063] Los datos se interpretan del siguiente modo -el patrón de tubos positivos en la serie se usa para calcular el "número más probable" (MPN) de células viables en la muestra. El cálculo se basa en la función de probabilidad. Están disponibles calculadoras de MPN y se conocen por los expertos habituales en la materia. El valor de MPN es sustancialmente equivalente a la información proporcionada por el Procedimiento Convencional como UFC de *Legionella* spp/ml.

[0064] El procedimiento y las composiciones descritos en el presente documento detectan varios serogrupos y aislados de *Legionella* que incluyen *Legionella adelaidensis*, *Legionella anisa*, *Legionella beliardensis*, *Legionella birminghamensis*, *Legionella bozemaniae*, *Legionella bozemanii*, *Legionella brunensis*, *Legionella busanensis*, *Legionella cherrii*, *Legionella pneumophila*, *Legionella pneumophila subsp. fraseri*, *Legionella pneumophila subsp. pascullei*, *Legionella pneumophila subsp. pneumophila*, *Legionella rowbothamii*, *Legionella taurinensis*, *Legionella worsleiensis* y *Legionella nautarum*.

Ejemplos

[0065] Los ejemplos que no pertenecen a la invención reivindicada sirven solamente a fines ilustrativos.

Ejemplo 1

[0066] Este ejemplo demostró que los procedimientos y las composiciones descritos en el presente documento para detectar *Legionella* viable y cultivable mejora en al menos el 80% el tiempo requerido para determinar cuantitativamente *Legionella* viable en muestras de agua mediante el procedimiento convencional.

[0067] Se muestreó agua del Río DuPage en Naperville, IL. A la muestra de agua de río se añadió asépticamente una cantidad de *Legionella pneumophila* (ATCC 33152). Después se mezcló el agua de río inoculada y se dejó equilibrar. Se pusieron alícuotas de la muestra sobre el medio de cultivo con diluciones finales de 1:10, 1:100 y 1:1000 en solución salina tamponada con fosfato estéril. El experimento se repitió dos veces. Se determinaron las células viables recontando las "Unidades Formadoras de Microcolonias" (UFM) y Unidades Formadoras de Colonias (el Procedimiento Convencional). Las UFM también se pueden contar a simple vista a partir de imágenes aumentadas digitalmente (zoom 10x). Se enumeraron las microcolonias de *Legionella pneumophila* después de 42 h, 65 h y 93 h de incubación a 35 °C. Las colonias de *Legionella pneumophila* se enumeraron mediante el Procedimiento Convencional después de 10 días de incubación a 35 °C. La Tabla 1 muestra los datos y los resultados de análisis estadísticos. El número de Unidades Formadoras de Microcolonias por mililitro de agua muestreada (UFM/ml) no fue estadísticamente diferente del número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de agua muestreada (UFC/ml) después de 10 días, como se requería por el Procedimiento Convencional. Por lo tanto, la detección de UFM mediante el procedimiento rápido descrito en el presente documento es un procedimiento analítico equivalente al Procedimiento Convencional largo y laborioso.

[0068] La Tabla 1 muestra el número de *Legionella pneumophila* viable en agua de río determinado mediante el procedimiento rápido descrito en el presente documento en comparación con el recuento de 10 días con el Procedimiento Convencional. No había ninguna diferencia estadísticamente significativa en los números bacterianos el día 10 y los números de los análisis realizados en momentos anteriores. Estos datos muestran que los datos obtenidos a las 42 horas eran equivalentes a los datos obtenidos después de 10 días. Esto representa una mejora del 83% en el tiempo requerido para obtener la concentración de células viables de *Legionella* en agua de río.

Tabla 1. Comparación de detección de *Legionella* mediante un procedimiento rápido en comparación con los resultados del Procedimiento Convencional a los 10 días de incubación.

Experimento 1									
Tiempo	UFM o Contadas	UFC	UFM o Contadas	UFC	Prom.	DT	UFM/ml promedio	UFC/ml	DT/ml
42 h	60 (UFM)		23 (UFM)		41,5 (UFM)	26,2	6,9 E+05		4,4 E+05
65,5 h	70 (UFM)		40 (UFM)		55 (UFM)	21,2	9,2 E+05		3,5 E+05
93 h	66 (UFM)		52 (UFM)		59 (UFM)	9,9	9,8 E+05		1,6 E+05
10 días	67 (UFC)		50 (UFC)		58,5 (UFC)	12,0	9,8 E+05		2,0 E+05
Experimento 2									
Tiempo	UFM o Contadas	UFC	UFM o Contadas	UFC	Prom.	DT	UFM/ml promedio	UFC/ml	DT/ml
42 h	100 (UFM)		72 (UFM)		86 (UFM)	19,8	1,4 E+06		3,3 E+05
65,5 h	105 (UFM)		83 (UFM)		94 (UFM)	15,6	1,6 E+06		2,6 E+05
93 h	108 (UFM)		78 (UFM)		93 (UFM)	21,2	1,6 E+06		3,5 E+05
10 días	105 (UFC)		74 (UFC)		89,5 (UFC)	21,9	1,5 E+06		3,7 E+05
UFM-unidades formadoras de microcolonias; UFC-unidades formadoras de colonias observadas en el Procedimiento Convencional el Día 10 DT-Desviación típica									

[0069] Las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento permiten la detección de *Legionella* cultivable viable que es comparable al Procedimiento Convencional. A diferencia del Procedimiento Convencional, el procedimiento rápido descrito en el presente documento permite la detección en el intervalo de unas pocas horas.

Ejemplo 2

[0070] Este ejemplo demuestra que las placas de cultivo laminar y los procedimientos descritos en el presente

documento son útiles para cuantificar bacterias *Legionella* después de un procedimiento de desinfección. En un aspecto se usaron placas de cultivo laminar para *Legionella pneumophila* para medir el efecto de la desinfección con cloro (Tabla 2, Figuras 1A, B y 2). Se pesó una placa de cultivo laminar de BCYE/BCYE + DGVP antes de la introducción de la muestra. La placa de cultivo laminar se sumergió en la muestra durante aproximadamente 60 segundos y se volvió a pesar la placa de cultivo laminar para garantizar que se hubieran adsorbido 0,3 g de la muestra en la placa de cultivo laminar. La placa de cultivo laminar cargada con muestra se incubó a 35 °C durante aproximadamente 45 horas. Las placas de cultivo laminar se extrajeron del incubador y se fotografiaron digitalmente.

[0071] Si un sistema de agua, tal como un sistema de distribución de agua potable o sistema de utilidad de agua de refrigeración se contamina con el riesgo de *Legionella*, entonces ese sistema se debe desinfectar inmediatamente. Por ejemplo, la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) ha publicado una guía de procedimiento a seguir en respuesta a los resultados de análisis cuantitativo obtenidos del Procedimiento Convencional para concentraciones de *Legionella* viable (medidas como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro, UFC/ml) en muestras de agua. Estas directrices indican, por ejemplo, que si la concentración de *Legionella* viable en agua potable es mayor de 10 UFC/ml, entonces se deben seguir los procedimientos para desinfectar el agua. Para determinar el alcance y la eficacia de la detección, la muestra de agua desinfectada se tiene que analizar para cualquier bacteria *Legionella* restante.

[0072] Sin embargo, para determinar el alcance de la desinfección se requieren 10 días en el Procedimiento Convencional para obtener resultados cuantitativos. En muchos casos se tiene que evacuar y cerrar una instalación hasta que estén disponibles los resultados del Procedimiento Convencional para garantizar que la desinfección ha sido adecuada y que el edificio es seguro para los ocupantes y usuarios. En algunos países, tales como en Francia, es un requisito legal que el sistema de agua debe permanecer inutilizado y la instalación evacuada hasta que exista una prueba cuantitativa de que la desinfección ha sido eficaz.

[0073] Con el procedimiento de placa de cultivo laminar rápido descrito en el presente documento se pueden obtener datos estadísticamente equivalentes al Procedimiento Convencional mucho más rápidamente (véase el Ejemplo 1, Tabla 1). Los datos en la Tabla 2, Figuras 1-2 muestran que se observó la desinfección eficaz de forma exitosa, se cuantificó y documentó usando las nuevas placas de cultivo laminar de *Legionella*. Estos resultados proporcionan una garantía cuantitativa de que se ha controlado el riesgo (bacteria *Legionella*).

[0074] Una muestra de cien mililitros (ml) de agua que contiene aproximadamente 8-25 células de *Legionella* viable por ml se trató con un oxidante residual libre 0,17 mg/l medido como Cl₂ con un ensayo colorimétrico usando un colorímetro portátil HACH DR-890. Se usaron placas de cultivo laminar para medir la concentración de *Legionella* viable después de 1,5 y 10 min de contacto con el desinfectante de cloro y se compararon con los resultados de placa de cultivo laminar obtenidos de controles no tratados preparados idénticamente (a excepción de sin cloro).

La Tabla 2 demuestra que se observó la desinfección eficaz con las nuevas placas de cultivo laminar de *Legionella*.

Tiempo de Contacto (min)	Sin Cloro (Control)		Cloro* (Tratamiento)		**% Desinfectados
	<i>Legionella pneumophila</i> (UFM prom/placa de cultivo laminar)	<i>Legionella pneumophila</i> (UFM prom/ml)	<i>Legionella pneumophila</i> (UFM prom/placa de cultivo laminar)	<i>Legionella pneumophila</i> (UFM prom/ml)	
1	4	12	3	8	33
5	8	25	0	0	100
10	3	8	0	0	100

UFM=unidad formadora de microcolonia; se calibraron las placas de cultivo laminar para absorber 0,3 ml de muestra en una "inmersión" de 30 s a temperatura ambiente
 *Concentración de oxidante residual libre = 0,17 mg/l (ppm) como Cl₂; Concentración de oxidante residual total = 0,25 mg/l (ppm) como Cl₂
 ***% Desinfectados" se calculó a partir de mediciones de UFM/ml [(control - tratamiento/control] X 100

[0075] Las placas de cultivo laminar y los procedimientos descritos en el presente documento se usan para detectar y cuantificar *Legionella* de muestras después de un procedimiento de desinfección para determinar la eficacia de la desinfección. El desarrollo de *Legionella* puede verse influido por la naturaleza del procedimiento de desinfección.

Ejemplo 3

[0076] Este ejemplo proporciona una ilustración de una placa de cultivo laminar y una cámara de placa de cultivo laminar en un conjunto de placa de cultivo laminar para la detección y cuantificación de *Legionella*.

[0077] Las placas de cultivo laminar ilustradas en este ejemplo también se denominan "muestreadores de placa de cultivo laminar de paleta". Estas placas de cultivo laminar de paleta y cámaras se fabricaron en las dimensiones siguientes. Las paletas de plástico tenían 6 cm de longitud, 2,75 cm de anchura y 0,5 cm de profundidad (Figura 2B).

A ambos lados del muestreador de paletas se preparó un depósito rectangular de 4,75 cm x 2,25 cm de 1 mm de profundidad para retener el medio de cultivo y el material absorbente. La paleta se encajó en un tapón a rosca roscado de 4 cm de diámetro que se encajó sobre un tubo de plástico transparente roscado de 7,5 cm de longitud (Figura 2A). La paleta (placa de cultivo laminar) y el depósito constituyen un conjunto de placa de cultivo laminar. Todo el conjunto se esterilizó mediante autoclave. En un lado de la paleta se vertió asépticamente medio convencional estéril de agar de Extracto de Levadura y Carbón Tamponado (BCYE) en el depósito. En el otro lado se vertió asépticamente BCYE estéril más antibióticos (tal como se especifica en el Procedimiento Convencional) en el depósito y se identificó el lado con los antibióticos con una marca visual distintiva. La Figura 2 muestra una ilustración del muestreador de placa de cultivo laminar de *Legionella* del procedimiento rápido.

[0078] Los dispositivos de ensayo de paleta o muestreadores de placa de cultivo laminar con medio agar para bacterias diferentes de la *Legionella* están disponibles en una diversidad de proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, en Biosan Laboratories, Inc. (Warren, MI). Basándose en la guía y las especificaciones del medio de cultivo, el medio absorbente y los reactivos descritos en el presente documento se pueden construir placas de cultivo laminar o dispositivos de ensayo de paleta para *Legionella*.

[0079] Otras dimensiones adecuadas para placas de cultivo laminar incluyen, por ejemplo, en un aspecto, aproximadamente 2-10 cm de longitud, 1,0-4,0 cm de anchura y 0,1-1,0 cm de profundidad y aproximadamente 5-15 cm de longitud, 2-10 cm de anchura y 1,0-2,0 cm de profundidad. Por consiguiente, los depósitos adecuados para las placas de cultivo laminar descritos en el presente documento pueden tener dimensiones variables. Por ejemplo, en un aspecto, los depósitos están dimensionados para ser un depósito rectangular de aproximadamente 2,0-10,0 cm x 1,0-4,0 cm de 1-5 mm de profundidad preparado para retener el medio de cultivo y el material absorbente. Los recipientes o tubos para encajar la placa de cultivo laminar junto con los depósitos también pueden tener dimensiones variables. Por ejemplo, en un aspecto, los recipientes pueden ser un cilindro de aproximadamente 5-12 cm de longitud y un diámetro apropiado.

[0080] Las placas de cultivo laminar, los depósitos y los recipientes se pueden preparar a partir de cualquier material adecuado, incluyendo, pero sin limitación, plástico, polímero, acrílico y neopreno. Las paletas o las placas de cultivo laminar también pueden tener cualquier forma adecuada, por ejemplo, rectangular, oval, circular y cuadrada.

Ejemplo 4

[0081] Este ejemplo ilustra las etapas para identificar selectivamente microcolonias de *Legionella* en el Muestreador de Placa de cultivo laminar usando un anticuerpo anti-*Legionella* marcado.

[0082] Se transfirieron microcolonias bacterianas (menos de 2 días de cultivo) sobre la superficie del muestreador de placa de cultivo laminar de *Legionella* del procedimiento rápido como se describe en el presente documento a una membrana de nitrocelulosa (0,22 micrómetros de tamaño de poro para transferencia de Western, BioRad) colocando la membrana sobre la placa de cultivo laminar durante 1 minuto. Una sustancial cantidad de las microcolonias se desprendieron y transfirieron a la membrana. La membrana se secó al aire durante 20 minutos para fijar las proteínas bacterianas a la membrana. Después, la membrana se sumergió en leche desnatada al 1% (Difco), Tween 20 al 0,1% (Sigma) para bloquear los sitios de unión a proteína restantes. Después se cortó en dos la membrana, de tal manera que una mitad (Membrana "A") representó la parte superior de la placa de cultivo laminar usada para la detección específica. La otra mitad (Membrana "B") se usó para el control. La distribución de las microcolonias (20 más o menos) era bastante uniforme a lo largo de la placa de cultivo laminar.

[0083] La membrana A se transfirió a una placa de petri que contenía 3 ml de una dilución 1/500 de anti-*Legionella* de conejo marcado con peroxidasa de rábano rusticano (Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY) en leche desnatada al 1%, Tween al 0,1%, en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La membrana B (el control) se transfirió a una placa similar que contenía IgG anti-ratón de conejo como un control. Las membranas se agitaron cuidadosamente durante 3 minutos, después se enjuagaron 5 veces con PBS con Tween al 0,1%. Cinco ml de cromógeno de sustrato TMB para la transferencia se pusieron en una placa limpia y las membranas se agitaron cuidadosamente durante 5 minutos para el desarrollo del color. El desarrollo se detuvo mediante un breve enjuague con agua. Los puntos sobre la membrana en los que las colonias se habían puesto en contacto con la membrana aparecieron como puntos azul morado distintivos sobre la membrana A (el tratamiento anti-*Legionella*). No se observaron puntos en la membrana B de control que se había incubado con un anticuerpo de conejo de control. Se registraron los puntos usando una cámara digital y se recontaron para el análisis posterior.

[0084] Se pueden identificar diversos serogrupos de *Legionella* seleccionando un anticuerpo específico de serogrupo apropiado. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal anti-serogrupo 1 de *Legionella pneumophila* de ratón (conjugado o no conjugado) en BIODESIGN International (Saco, Maine). Se pueden obtener anticuerpos personalizados en una diversidad de fabricantes, que incluyen Strategic Diagnostics Inc., (Newark, Delaware). Se pueden usar anticuerpos específicos de serogrupo o específicos de aislado o una mezcla de anticuerpos para detectar una muestra de la que se sospecha la contaminación con *Legionella*. Los anticuerpos policlonales o monoclonales, individualmente o en una mezcla, son capaces de detectar diversos serogrupos y aislados de

Legionella que incluyen los serogrupos 1-13 de *L. pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleyi*, *L. wadsworthii*, y *L. anisa*.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un procedimiento de cuantificación rápida de bacterias *Legionella* viables en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 10 a. proporcionar una placa de cultivo laminar que comprende un medio absorbente, en la que el medio absorbente comprende nutrientes para cultivar *Legionella* y al menos un agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella*;
- 15 b. poner en contacto la placa de cultivo laminar con la muestra durante un periodo de tiempo predeterminado, en el que la placa de cultivo laminar se calibra para absorber una cantidad predeterminada de la muestra;
- c. incubar la placa de cultivo laminar a una temperatura en el intervalo de 30 °C a 45 °C durante un periodo de 6 horas a 48 horas;
- d. detectar microcolonias de bacterias *Legionella* en la placa de cultivo laminar con un reactivo de detección, en el que el agente de detección identifica selectivamente *Legionella*;
- e. formar imágenes de las colonias detectadas con una cámara digital, detectándose las microcolonias bajo un aumento en el orden de 2X a 10X; y
- f. cuantificar la cantidad de bacterias *Legionella* viables en la muestra.
- 20 **2.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio absorbente comprende agarosa en un intervalo del 0,5% en peso al 10,0% en peso.
- 3.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de detección se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo, una mezcla de anticuerpos, una sonda y combinaciones de los mismos.
- 25 **4.** El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es específico para *Legionella* seleccionada entre el grupo que consiste en los serogrupos 1-15 de *Legionella pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* y *L. anisa*.
- 30 **5.** El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la sonda se selecciona entre el grupo que consiste en un colorante, un colorante potenciador del color, un colorante de contraste de fases, una sonda marcada, una sonda fluorescente, una sonda colorimétrica, una sonda de ácido nucleico y combinaciones de los mismos.
- 6.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección de *Legionella* es mediante una fuente de luz ultravioleta.
- 35 **7.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio absorbente se calibra para absorber aproximadamente 0,3 ml de la muestra en aproximadamente 60 segundos.
- 8.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de detección aumenta el contraste para la formación de imágenes del desarrollo de *Legionella*.
- 40 **9.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de detección destruye la *Legionella*.
- 10.** El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el reactivo de detección comprende un compuesto antimicrobiano.
- 45 **11.** El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el compuesto antimicrobiano se selecciona entre el grupo que consiste en isotiazolona, glutaraldehído, formaldehído, compuestos cuaternarios de amonio, dibromonitropropionamida, β -bromonitroestireno, antimicrobianos de carbamato, antimicrobianos de tris-nitrometano, benzoato sódico, ácidos orgánicos, etanol, isopropanol, gluconato de clorhexidina, diacetato de clorhexidina y *o*-fenil fenol.
- 50 **12.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella* comprende colorantes, glicina, vancomicina y polimixina (DGVP) y/o un ácido inorgánico o uno orgánico.
- 55 **13.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente para inhibir selectivamente el desarrollo de microorganismos no-*Legionella* comprende cefalotina, colistina, vancomicina y cicloheximida (CCVC).
- 60 **14.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la microcolonia tiene 10-500 micrómetros de diámetro.

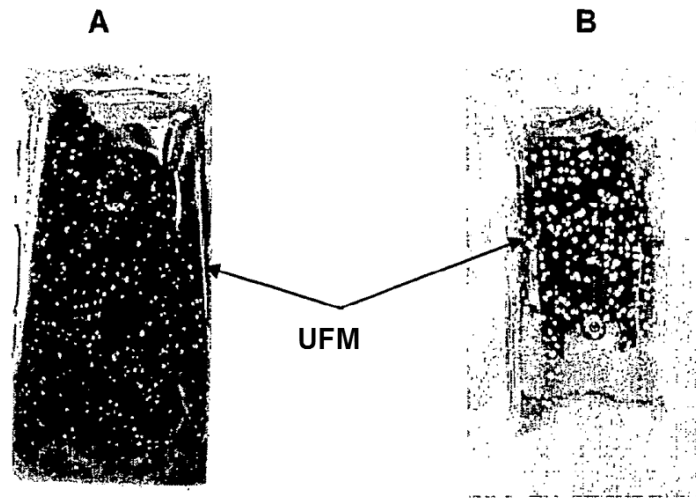


FIG. 1

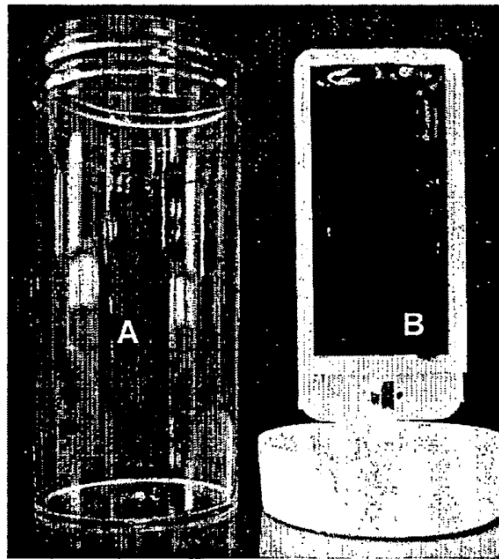


FIG. 2