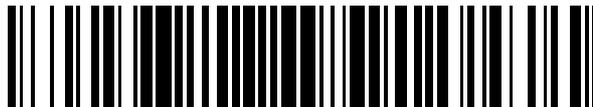


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 861**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09727970 .7**
96 Fecha de presentación: **20.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2262910**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2010**

54 Título: **Detección y recuento de microorganismos**

30 Prioridad:
04.04.2008 GB 0806136
20.01.2009 GB 0900848

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

73 Titular/es:
BASF SE (50.0%)
67056 Ludwigshafen, DE y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)

72 Inventor/es:
FOVET, YANNICK;
DUKAN, SAM y
DUCRET, ADRIEN

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 389 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección y recuento de microorganismos

Descripción

5 La presente invención se refiere a un método para detectar y contar microorganismos viables de la especie *Legionella pneumophila* en una muestra. La invención también incluye un kit adecuado para su uso en un método de este tipo. Este método y kit permiten cuantificar más rápidamente los microorganismos viables.

Las bacterias *Legionella* están omnipresentes en entornos mojados o húmedos tales como hábitats acuáticos no marinos y suelo. También pueden encontrarse en instalaciones de agua fría y caliente, torres de refrigeración de sistemas de aire acondicionado y humidificadores de agua.

10 *Legionella*, especialmente *Legionella pneumophila*, son patógenos que pueden provocar una neumonía bacteriana aguda, generalmente conocida como “enfermedad del legionario”, que a menudo es mortal para los individuos infectados.

15 Tradicionalmente, la detección y recuento de *Legionella pneumophila* se logra mediante cultivo celular. Este método puede lograrse midiendo bacterias cultivables usando recuento en placa o midiendo microcolonias empleando un método de membrana filtrante. Estas técnicas evalúan bacterias viables por su capacidad para formar una colonia o microcolonia. Desafortunadamente, tales métodos requieren habitualmente entre 3 y 10 días con el fin de permitir que se formen las colonias o microcolonias. Cuando las instalaciones de agua están todavía en funcionamiento, existe un riesgo inaceptable de infección humana durante este tiempo.

20 Otros métodos para detectar los microorganismos de *Legionella* totales incluyen técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La PCR emplea ADN polimerasa para amplificar un fragmento de ADN mediante replicación enzimática *in vitro*. Durante la progresión de la técnica, el ADN generado se usa como molde para la replicación que provoca una reacción en cadena en la que el molde de ADN se amplifica exponencialmente. La PCR permite que una única o unas pocas copias de un fragmento de ADN se amplifiquen generando millones o más copias del fragmento de ADN. Normalmente, se describe un método de este tipo por Diederer *et al.*, J Med Microbiol. Enero de 2007; 56 (Pt 1):94-101.

25 Sin embargo, un inconveniente de la PCR es que las muestras tienden a contener inhibidores de la reacción de polimerización y por tanto no proporcionan de manera sistemática resultados cuantitativos. Además, la técnica se basa en una etapa de purificación de ADN previa que puede dar como resultado pérdida de ADN con la consiguiente subestimación de la *Legionella* presente. Hasta cierto punto, estas desventajas se superan mediante la PCR en tiempo real, que es cuantitativa. Sin embargo, la técnica no puede distinguir entre células viables y células no viables.

30 Otra técnica es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en la que una sonda oligonucleotídica marcada mediante una sustancia fluorescente penetra en las células bacterianas. Cuando los ácidos nucleicos ribosómicos (ARNr) tienen la secuencia correcta para la sonda conocida como diana, la sonda se unirá por sí misma a su diana y no se eliminará mediante ninguna etapa de lavado posterior. Las bacterias en las que se fija la sonda emitirán entonces una señal fluorescente. Esta señal fluorescente puede cuantificarse entonces mediante técnicas tales como citometría de flujo, citometría de fase sólida o microscopía de epifluorescencia. Se describe una técnica de FISH típica por Dutil S *et al.* J Appl Microbiol. Mayo de 2006; 100(5):955-63. Sin embargo, usando la técnica FISH sola, podría detectarse el número total de *Legionella pneumophila* viables, pero desafortunadamente el método no podría identificar exclusivamente sólo las bacterias *Legionella pneumophila* que pueden dividirse y como consecuencia formar una colonia.

35 Un método adicional para contar *Legionella pneumophila* viables implica ChemChrome V6 y se describe por Delgado-Viscogliosi *et al.* Appl Environ Microbiol. Julio de 2005; 71(7):4086-96. Este método permite la cuantificación de *Legionella pneumophila* así como la discriminación entre bacterias viables y no viables. Combina la detección específica de células de *Legionella* usando anticuerpos y un marcador de viabilidad bacteriana (ChemChrome V6) y empleando microscopía de epifluorescencia para el recuento. Sin embargo, aunque esta técnica distingue entre células viables y no viables, no puede identificar por separado las bacterias formadoras de colonias.

40 Hasta la fecha, los únicos métodos que permiten la detección de bacterias *Legionella pneumophila* que pueden dividirse se han basado en el método de microcolonias (Scan-VIT). Sin embargo, este método requiere alrededor de 72 horas.

Arana *et al.* “Detection and enumeration of viable but non-culturable transconjugants of *Escherichia coli* during the

survival of recipient cells in river water" págs. 340-346, J. App. Microbiol. Vol. 83, 1997 describen el uso de recuento de viabilidad directa (DVC) usando marcadores específicos.

5 Piqueres *et al.* "A combination of direct viable count and fluorescent *in situ* hybridisation for estimating *Helicobacter pylori* cell viability" págs. 345-349 Res. Microbiol. Vol. 157, 2006 Jjemba *et al.* "In situ enumeration and probing of pyrene degrading soil bacteria" págs. 287-298 FEMS Microbiol. Ecol. Vol. 55, 2006 se refieren ambos a DVC-FISH pero para microorganismos no relacionados con *Legionella pneumophila*.

10 El documento EP-A-1852512 describe un método para la identificación y el conteo de varios microorganismos patógenos incluyendo *Legionella pneumophila*. El método incorpora el recuento de viabilidad directa (DVC) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) pero también emplea una sonda auxiliar con el fin de amplificar la señal. Las sondas auxiliares son oligonucleótidos no marcados que se unen a regiones adyacentes a la seleccionada como diana por la sonda marcada específica. Esto potencia la accesibilidad *in situ* y por tanto la señal conferida por la sonda.

15 Se dice que el método descrito en el documento EP-A-1852512 emplea un inhibidor de la ADN girasa tal como ácido nalidíxico, que detiene la división celular, aumenta el contenido en ARNr intracelular y la longitud celular de células sensibles. Sin embargo, en la práctica, el ácido nalidíxico no es un inhibidor de la ADN girasa eficaz de manera fiable para *Legionella pneumophila*. Además, este documento no menciona los problemas de recuento impreciso que pueden producirse debido a la presencia de microorganismos fluorescentes de manera natural.

20 Sería deseable proporcionar un método para cuantificar de manera fiable *Legionella pneumophila* viables que pueden formar colonias en una muestra más rápidamente que las técnicas conocidas. Además, sería preferible lograr esto de manera más precisa.

Según la presente invención, se proporciona un método para detectar y contar microorganismos viables en una muestra de la que se sospecha que contiene dichos microorganismos que comprende:

25 (1) poner en contacto dicha muestra con un recurso nutritivo celular y un inhibidor de la proliferación celular, en el que el recurso nutritivo celular contiene un complemento de crecimiento que comprende un antioxidante, preferiblemente ácido pirúvico (o sal del mismo),

30 (2) poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda oligonucleotídica marcada por fluorescencia que puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos, en el que dicha muestra se pone en contacto con al menos una primera sonda y una segunda sonda en el que la primera sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos y la segunda sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte diferente de los ácidos nucleicos ribosómicos de los microorganismos,

(3) detectar y cuantificar la señal fluorescente,

en el que los microorganismos son de la especie *Legionella pneumophila* y en el que el inhibidor de la proliferación celular se selecciona del grupo que consiste en ciprofloxacino y cefalexina.

35 Generalmente, cada una de las etapas se lleva a cabo secuencialmente, realizándose la etapa (2) en la muestra así tratada en la etapa (1) y luego se lleva a cabo la etapa (3) tras la etapa (2).

40 La etapa 1 del método de la invención se conoce como recuento viable directo (DVC) que se basa en incubar bacterias en presencia de un antibiótico o inhibidor de la ADN girasa que bloquea la división celular sin deteriorar el metabolismo celular. Por tanto, las bacterias vivas tenderán a alargarse pero no a dividirse y de ese modo pueden distinguirse de las bacterias muertas que no cambian de tamaño. Por tanto, es posible identificar bacterias vivas mediante microscopía. Antes de llevar a cabo la etapa de DVC, puede ser deseable concentrar la muestra y pretratarla, por ejemplo mediante tratamiento con ácido y/o con calor según el método convencional T 90-431 (ISSN 0335-3931), editado y distribuido por la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) 11, Avenue Francis de Pressensé-93571 St Denis La Plaine Cedex, Francia.

45 Se ha encontrado inesperadamente que el ciprofloxacino y la cefalexina son inhibidores de la ADN girasa muy eficaces. Tanto el ciprofloxacino como la cefalexina permiten a las células de *Legionella pneumophila* alargarse en la preparación para la división celular pero en realidad bloquean la división de estas células alargadas. Por el contrario, el ácido nalidíxico no proporciona un alargamiento suficiente de las células de *Legionella pneumophila* como para que sea eficaz para el presente método. Ventajosamente, se encuentra que el método de la presente invención
50 permite identificar y cuantificar *Legionella pneumophila* de manera fiable y dentro de una escala temporal normalmente inferior a 24 horas. Esto proporciona mejoras significativas en el control sanitario del agua.

- El ciprofloxacino o la cefalexina pueden usarse en cualquier cantidad eficaz. Normalmente, esto sería en concentraciones de hasta 20 mg/l o superiores dentro del medio contenido en el recurso nutritivo celular. Preferiblemente, las concentraciones son de entre 1 y 10 mg/l. Preferiblemente, el inhibidor de la proliferación celular es ciprofloxacino. Se ha encontrado que puede lograrse el mayor alargamiento celular cuando la concentración de ciprofloxacino es de entre 2 y 6 mg/l tras una duración de 12 horas, especialmente entre 3 y 5 mg/l.
- El recurso nutritivo celular debe contener cualquier composición de medio de crecimiento adecuada aplicable al método de DVC y adecuada para *Legionella pneumophila*. Una composición de medio adecuada puede comprender un medio, un complemento selectivo, un inhibidor de la proliferación celular (ciprofloxacino o cefalexina) y un complemento de crecimiento.
- El medio proporciona la nutrición mínima requerida para permitir el crecimiento de *Legionella pneumophila*. Puede ser cualquier medio adecuado descrito en la bibliografía, por ejemplo según la prescripción del método convencional T 90-431 (tal como se proporcionó anteriormente) sin agar ni carbón.
- El complemento selectivo se requiere a menudo con el fin de limitar el desarrollo de microorganismos interferentes. La elección del antibiótico puede ser cualquier complemento conocido adecuado para el método de DVC, por ejemplo se ha descrito en el método convencional T 90-431 (tal como se proporcionó anteriormente). No obstante, la concentración de cada antibiótico en general debe adaptarse para el medio líquido particular. Sin embargo, no sería necesariamente perjudicial en casos en los que estos otros microorganismos no se eliminan completamente puesto que la etapa 2 habitualmente será suficientemente específica como para superar el efecto de bacterias interferentes.
- Aunque el complemento de crecimiento no es esencial para permitir el crecimiento de las bacterias de *Legionella pneumophila*, puede optimizar su crecimiento. *Legionella pneumophila* se caracteriza por duplicarse en 120 min. (en condiciones óptimas). Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos las bacterias de *Legionella pneumophila* viables que pueden formar colonias adecuadas incluyen catalasa, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, dimetilsulfóxido, TDPA (ácido 3,3'-tiodipropiónico) y piruvato, etc. Preferiblemente, el reactivo antioxidante es piruvato. Las dosis preferidas de reactivo antioxidante, especialmente para piruvato, son de entre 0,5 y 1,5 g/l, especialmente de aproximadamente 1 g/l.
- En la presente invención, la fase de latencia para *Legionella pneumophila* puede reducirse incluyendo como complemento de crecimiento un reactivo antioxidante dentro del recurso nutritivo celular. El reactivo antioxidante puede actuar directamente sobre especies reactivas de oxígeno (ROS) o mediante otros medios tales como provocar un efecto sobre el metabolismo del microorganismo, directa o indirectamente, lo que provoca una reducción en ROS. Los reactivos antioxidantes adecuados incluyen catalasa, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, dimetilsulfóxido, TDPA (ácido 3,3'-tiodipropiónico) y piruvato, etc. Preferiblemente, el reactivo antioxidante es piruvato. Las dosis preferidas de reactivo antioxidante, especialmente para piruvato, son de entre 0,5 y 1,5 g/l, especialmente de aproximadamente 1 g/l.
- El recurso nutritivo celular puede incluir al menos un compuesto que inhibe indirectamente la formación de y/o degrada las especies reactivas de oxígeno (ROS), dicho compuesto puede provocar niveles reducidos de ROS interfiriendo con el metabolismo del microorganismo. Normalmente, tales compuestos incluirán aminoácidos o sus sales. Un compuesto particularmente preferido es ácido glutámico o sal de glutamato.
- Todavía en una forma preferida adicional de la invención, el recurso nutritivo celular incluiría ácido glutámico o sal de glutamato, especialmente la sal de sodio. En general, la cantidad de ácido glutámico o glutamato será de entre el 0,01 y el 5% en peso calculado como la sal de sodio.
- Se prefiere particularmente que el recurso nutritivo celular incluya tanto ácido pirúvico como piruvato (especialmente la sal de sodio) junto con ácido glutámico o glutamato (especialmente como la sal de sodio). Esta combinación de ácido pirúvico o piruvato con ácido glutámico o glutamato parece inducir un efecto sinérgico ya que permite una estimación superior (y por tanto una estimación más precisa) de *Legionella* cultivable que cualquiera de los compuestos usados solos respectivamente. Además, se ha encontrado que esta combinación provoca una reducción adicional de la fase de latencia durante el desarrollo de la *Legionella pneumophila*, en particular en un medio líquido. Una reducción de este tipo de la fase de latencia en medio líquido da como resultado una reducción del tiempo requerido para obtener una colonia visible sobre una placa de agar.
- De manera deseable, la cantidad de piruvato y glutamato será tal como se estableció anteriormente. Se prefiere particularmente que la razón de glutamato con respecto a piruvato esté en el intervalo entre 1:1 y 50:1, especialmente entre 5:1 y 20:1 y más especialmente entre 7:1 y 15:1.
- No se sabe que el glutamato sea un antioxidante. Sin embargo, parece que el glutamato podría reducir indirectamente la producción endógena de las ROS formadas de manera natural durante el crecimiento o sus consecuencias sobre las macromoléculas (oxidación).

Sin querer restringirse a la teoría, se piensa que el ácido glutámico cambia el metabolismo de *Legionella* aumentando el efecto del piruvato y que esta interferencia con el metabolismo de *Legionella* inhibe indirectamente la formación de y/o degrada ROS intracelulares.

5 El método de la presente invención puede permitir que se emplee un periodo de incubación más corto, de manera deseable de no más de aproximadamente 24 horas. Preferiblemente, esto puede reducirse hasta 12 horas, especialmente cuando hay una baja aparición de interferencia bacteriana y/o alta aparición de bacterias de *Legionella pneumophila*.

10 La muestra puede recogerse de cualquier ubicación adecuada. Esta puede ser por ejemplo una muestra de agua del agua de recirculación en un sistema de refrigeración. Sin embargo, de manera deseable la muestra puede obtenerse de agua en forma de un aerosol. Normalmente, el aerosol puede ubicarse en una torre de refrigeración o acondicionador de aire. De manera deseable, el agua se condensa del aerosol antes de someterse a prueba según el método de la presente invención.

15 El modo de incubación puede ser tal como se define en la bibliografía que describe el procedimiento de DVC. Un método de este tipo puede incluir filtración de la muestra y luego incubación del filtro sobre almohadillas empapadas con el medio. Preferiblemente según la presente invención, la muestra, o muestra concentrada, se incuba directamente con el medio y luego se filtra. De este modo, puede reducirse el riesgo de perder bacterias durante el proceso de incubación y proporcionar mejores condiciones durante la incubación, por ejemplo transferencia de oxígeno o agitación de la muestra.

La etapa 2 del método de la invención puede emplear un protocolo de FISH convencional.

20 En la primera parte del procedimiento de FISH, las células pueden fijarse tratando la envuelta o membrana externa de la célula para hacerla permeable a las sondas oligonucleotídicas. Generalmente, esto se logrará usando disoluciones fijadoras que son disoluciones acuosas de alcoholes o aldehídos que son miscibles con el agua a 25°C. Los alcoholes o aldehídos adecuados incluyen formaldehído, paraformaldehído, etanol y/o metanol. Normalmente, las disoluciones de formaldehído o paraformaldehído pueden ser de hasta el 10% en peso y preferiblemente de entre el 1 y el 5%. Habitualmente, los alcoholes serán de al menos el 50% en peso y generalmente de entre el 60 y el 90% en peso. Preferiblemente, este tratamiento puede lograrse mediante tratamiento secuencial con una o más de estas disoluciones. Preferiblemente, el tratamiento puede comprender una disolución de entre el 1 y el 5% de formaldehído o paraformaldehído seguido por dos o tres disoluciones de etanol o metanol de concentración creciente de entre el 50% y el 90%.

30 El procedimiento de FISH emplea entonces un procedimiento de hibridación empleando un tampón de hibridación que contiene al menos una sonda oligonucleotídica marcada por fluorescencia que comprende un oligonucleótido con un marcador fluorescente unido en el que el oligonucleótido puede seleccionar como diana una secuencia específica dentro de la célula. Las sondas oligonucleotídicas penetran en la membrana externa de las células y se unen a la secuencia diana que corresponde al oligonucleótido. Se entenderá que unión significa la formación de enlaces de hidrógeno entre fragmentos de ácido nucleico complementarios. En la técnica de FISH, las sondas oligonucleotídicas son complementarias y pueden unirse a una determinada región de la secuencia diana ribosómica dentro del microorganismo. Normalmente, las sondas comprenden entre 15 y 30 bases de longitud como fragmentos de ácido desoxirribonucleico monocatenario y están dirigidas a una región diana específica que es específica para el microorganismo.

40 La sonda oligonucleotídica debe ser de manera deseable una sonda de ARN ribosómico 16S específica de *Legionella pneumophila*. Puede emplearse cualquier sonda oligonucleotídica que seleccione como diana específicamente microorganismos de la especie *Legionella pneumophila*. Preferiblemente, la sonda se seleccionará del grupo que consiste en la sonda PNE 1 descrita por Grimm *et al.* 1998 con una secuencia de bases de 5' a 3' de ATC TGA CCG TCC CAG GTT, la sonda LEGPNE 1 (SEQ ID nº 22) descrita por Grimm *et al.* 1998 y Declerck *et al.* 45 2003 que tiene una secuencia de bases de 5' a 3' de ATCTG ACCGT CCCAG GTT y la sonda LP2 (SEQ ID nº 23) descrita por Yamamoto *et al.* 1993 que tiene una secuencia de bases de 5' a 3' de AGCTT TCATC CAAAG ATA.

También puede ser deseable emplear alternativamente sondas con secuencias que tienen al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80% y más preferiblemente al menos el 90% de identidad con cualquiera de las tres sondas, sonda PNE 1, sonda LEGPNE 1 o sonda LP2.

50 Con el fin de superar el riesgo de microorganismos mal identificados que son fluorescentes de manera natural, la invención emplea dos sondas nucleotídicas. Una sonda selecciona como diana todos los microorganismos del género *Legionella* y la segunda sonda está diseñada para hibridarse específicamente con microorganismos de la especie *Legionella pneumophila*. Cada sonda está marcada con colorantes fluorescentes diferentes. Los microorganismos que son fluorescentes de manera natural serán fluorescentes sólo en una longitud de onda específica o banda estrecha de longitudes de onda y en consecuencia el uso de las dos sondas con colorantes 55

diferentes que fluorescen a longitudes de onda diferentes permite eliminar microorganismos fluorescentes de manera natural que no son específicamente *Legionella pneumophila*.

En la invención, la primera sonda se hibridará con microorganismos que pertenecen al género *Legionella*, que incluye pero no se limita a *Legionella longbeachae*, *Legionella jordanis*, *Legionella anisa*, *Legionella pneumophila*. Esta primera sonda puede comprender un nucleótido que puede unirse con una secuencia ribosómica diana de cualquiera de las bacterias dentro del género *Legionella*. Normalmente, la primera sonda puede ser cualquiera de las sondas seleccionadas del grupo que consiste en la sonda LEG705 (SEQ ID nº 7) descrita en Manz *et al.* (Manz *et al.* 1995) con una secuencia de bases de 5' a 3' de CTGGT GTTCC TTCCG ATC, la sonda LEG226 (SEQ ID nº 8) descrita en Manz *et al.* (Manz *et al.* 1995), con una secuencia de bases de 5' a 3' de TCGGA CGCAG GCTAA TCT, la sonda Legall11 (SEQ ID nº 9) descrita en Leskela *et al.* (Leskela *et al.* 2005) con una secuencia de bases de 5' a 3' de CCTCC TCCC ACTGA AAGT, la sonda Legall22 (SEQ ID nº 10) descrita en Leskela *et al.* (Leskela *et al.* 2005) con una secuencia de bases de 5' a 3' de CACTG TATGT CAAGG GTAGG, la sonda Leg120v (SEQ ID nº 11) descrita en Buchbinder *et al.* (Buchbinder *et al.* 2002) con una secuencia de bases de 5' a 3' de AAGGC ATATT CCTAC GCG.

También puede ser deseable emplear alternativamente sondas con secuencias que tienen al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80% y más preferiblemente al menos el 90% de identidad con cualquiera de las tres sondas, sonda LEG705, sonda LEG226, sonda Legall11, sonda Legall22 y sonda Leg120v.

La segunda sonda puede hibridarse sólo con la especie específica de *Legionella pneumophila* y puede ser cualquiera de las sondas nucleotídicas mencionadas anteriormente con esta característica, por ejemplo cualquiera de las tres sondas, sonda PNE 1, sonda LEGPNE 1, o sonda LP2.

Puede usarse cualquiera de los colorantes fluorescentes que se sabe que son compatibles con los espectros de emisión/excitación apropiados de FITC (por ejemplo Syto9, Alexa 488, etc.) o Cy3 (por ejemplo Rodamina, Alexa 583, etc.).

La etapa 3 implica cuantificar bacterias relevantes usando un microscopio. Esto puede lograrse manual o automáticamente, por ejemplo usando un microscopio de epifluorescencia. Preferiblemente, la detección y el recuento de bacterias marcadas mediante hibridación *in situ* y fijadas sobre un filtro necesitan el uso de un microscopio equipado con un sistema de epifluorescencia.

Los dispositivos de detección adecuados incluyen ChemScan RDI y ScanVIT-Legionella TM (Vernicon AG, Munich, Alemania). Es posible usar ChemScan (citometría sólida desarrollada por AESChemunex) para detectar y contar bacterias marcadas. Sin embargo, este sistema sólo puede usar 1 conjunto de espejo de emisión/excitación (488 nm) y por tanto limita el presente protocolo a usar sólo una sonda marcada.

Se prefiere el dispositivo ScanVIT-Legionella TM especialmente según el aspecto preferido mencionado anteriormente de la invención empleando al menos dos sondas, puesto que esta técnica permite el uso de dos señales fluorescentes diferentes con el fin de eliminar los microorganismos fluorescentes de manera natural que no son *Legionella pneumophila*.

El método según la presente invención facilita la determinación cuantitativa rápida y precisa de la existencia de *Legionella pneumophila*. El método es adecuado para detectar *Legionella pneumophila* en muestras derivadas de cualquiera del grupo seleccionado de aguas de refrigeración industrial, agua potable y aguas naturales.

La presente invención también incorpora un kit para detectar y contar más rápidamente microorganismos viables de la especie *Legionella pneumophila* en una muestra de la que se sospecha que contiene dichos microorganismos que comprende:

(1) un recurso nutritivo celular, que contiene un complemento de crecimiento que comprende un antioxidante, preferiblemente ácido pirúvico (o sal del mismo),

(2) un inhibidor de la proliferación celular,

(3) sondas oligonucleotídicas marcadas por fluorescencia que pueden hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos, que comprenden una primera sonda y una segunda sonda en el que la primera sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos y la segunda sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte diferente de los ácidos nucleicos ribosómicos de los microorganismos

(4) un medio para detectar y cuantificar la señal fluorescente, en el que el inhibidor de la proliferación celular se selecciona del grupo que consiste en ciprofloxacino y cefalexina.

5 En una forma preferida, un kit puede comprender las siguientes disoluciones: una composición de medio (tal como se definió anteriormente) que puede deshidratarse para almacenamiento prolongado; una disolución para fijar la membrana externa de las bacterias, por ejemplo formaldehído; una disolución de hibridación, por ejemplo tal como se describió anteriormente, que debe constituirse poco antes de su uso; una disolución de lavado, por ejemplo tal como se describió anteriormente, que debe constituirse poco antes de su uso; un colorante de fluorescencia de ácido nucleico, por ejemplo DAPI que puede deshidratarse para almacenamiento prolongado; un reactivo de preparación microscópica antidesvanecimiento. Preferiblemente, el kit puede comprender filtros. Más preferiblemente, el kit puede comprender adicionalmente un tampón fisiológico; disoluciones de etanol de concentración variable entre el 50 y el 90%; y agua estéril. El kit también puede contener Eppendorf, por ejemplo 2 ml.

El kit también puede contener cualquiera de las realizaciones descritas con respecto al primer aspecto de la invención.

El kit es adecuado para su uso con el método de la presente invención y permite el recuento de manera rápida y fiable de *Legionella pneumophila*.

15 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

20 Se prepara una suspensión de *Legionella pneumophila* a una concentración final de 10^6 bacterias/ml en 2 suspensiones del mismo volumen. Sólo la primera suspensión (S1) se fija con formaldehído al 3,7% (v/v) a temperatura ambiente (de 20 a 22°C) durante 30 min. Ambas suspensiones se lavan entonces tres veces mediante centrifugación (6.000 x g, 5 min. a 20°C), en PBS pH 7,4.

Finalmente, se mezclan ambas suspensiones según la tabla 1.

Tabla 1

% de células viables	S1 [ml]	S2 [ml]
100	0	2
50	1	1
10	1,8	0,2
1	1,98	0,02
0	2	0

Se trata cada mezcla según el protocolo experimental a continuación.

25 Resultados

Se representan los resultados en la figura 1. La figura 1 muestra la correlación entre el método convencional AFNOR (8 días) y el método de la presente invención que requiere menos de 24 horas. Los resultados indican una buena correlación entre los dos métodos en cuanto a precisión de la identificación de *Legionella pneumophila*.

Protocolo experimental

30 Se filtraron muestras (V_1) a través de una membrana de policarbonato blanca de tamaño de poro de 0,2 μm , de 25 mm de diámetro (Millipore, GTTP02500). Se enjuagaron los filtros dos veces con 10 ml de disolución A y se colocaron en un tubo estéril (Eppendorf 2 ml) que contenía 1 ml de disolución A. Se agitaron los tubos 1 min. a 30 Hz (4°C). Tras retirar los filtros, se preparó cada suspensión tal como sigue:

35 1. Se colocan de manera aséptica 500 μl de suspensión en un tubo estéril que contenía 500 μl de disolución B. Entonces se incubaron los tubos 24 horas a 37°C o 45°C con agitación. Tras la incubación, se filtraron las suspensiones a través de una membrana de policarbonato blanca de tamaño de poro de 0,2 μm , de 25 mm de

diámetro (Millipore, GTTP02500) y se fijaron con disolución C a temperatura ambiente (de 20 a 22°C) durante 30 min. Se enjuagaron los filtros dos veces con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y se secaron al aire.

5 2. Se filtraron directamente 500 µl de suspensiones a través de una membrana de policarbonato blanca de tamaño de poro de 0,2 µm, de 25 mm de diámetro (Millipore, GTTP02500) y se fijaron con disolución C a temperatura ambiente (de 20 a 22°C) durante 30 min. Se enjuagaron los filtros dos veces con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y se secaron al aire.

10 Se deshidrataron los filtros mediante lavados secuenciales en disolución D, disolución E y disolución F (2 min. cada uno) y entonces se secaron mediante incubación 30 min. a 37°C. Se colocaron los filtros sobre un portaobjetos y se aplicaron 50 µl de disolución G al filtro. Se colocó un cubreobjetos sobre el filtro para evitar la deshidratación. La hibridación se realizó durante 2 horas a $46 \pm 1^\circ\text{C}$ en una cámara de humedad. Entonces, se lavaron los filtros tres veces con 5 ml de disolución H precalentada a 46°C y luego se enjuagaron dos veces con agua estéril. Se incubaron los filtros 15 min. con 1 ml de disolución I y se enjuagan dos veces con agua estéril. Tras secar al aire, se montaron finalmente los filtros sobre un portaobjetos con 20 µl de disolución J. Se visualizaron las células hibridadas mediante microscopía de epifluorescencia con una lente de objetivo de inmersión 100x y 2 filtros de emisión/excitación: un filtro de excitación de 510 a 550 nm y un filtro de barrera de 590 nm.

15

Disoluciones

Tabla 2

Disolución	Detalles	Descripción general
A	Solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS)	Tampón fisiológico
B	Medio	Véase la tabla 3
C	Formaldehído [3,7%] (Sigma, F-1635)	
D	Etanol al 50%	
E	Etanol al 80%	
F	Etanol al 90%	
G	Disolución de hibridación	Véase la tabla 4
H	Disolución de lavado	Véase la tabla 5
I	DAPI [0,5 µg/ml] (Sigma, D-95421)	Colorante fluorescente de ácido nucleico
J	Citifluor (Ted Pella, INC., 19476-A)	Reactivo de preparación microscópica antidesvanecimiento

Medio 2X

Tabla 3

	Compuestos	Concentración	CAS
Medio	Extracto de levadura	20 g/l	
	Pirofosfato férrico	0,5 g/l	
	L-cisteína (clorhidrato)	0,8 g/l	
	α -cetoglutarato	2 g/l	
	Tampón ACES/hidróxido de potasio	2 g/l	
Complemento selectivo	Glicina	6 mg/l	
	Vancomicina	2 μ g/l	
	Polimixina	160 UI/l	
	Cicloheximida	160 μ g/l	
Antibiótico que bloquea la división celular	Ciprofloxacino	8 mg/l	85721-33-1
Complemento de crecimiento	Piruvato	2 g/l	

Se esterilizaron todos los reactivos mediante filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,2 μ m (Millipore, SLGS025 OS). Para detalles de cada conjunto de reactivo véase a continuación.

5 Disolución de hibridación

Tabla 4

Compuestos	Concentración
formamida (Sigma, F-9037)	20%
NaCl (Sigma, S-9625)	0,9 M
SDS (Sigma, L-4522)	0,1%
Tris-HCl pH 7,2 (Sigma, T-2538)	20 mM

Se esterilizaron todos los reactivos mediante filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,2 μ m (Millipore, SLGS025 OS).

- 10 Las sondas usadas para la detección de FISH son: LEG705 (Eurogentec: 5'-CTGGTGTTCCCTCCGATC-3'), específica de *Legionellaceae* y marcada con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y PNE1 (Eurogentec: 5'-CTGGTGTTCCCTCCGATC-3'), específica del género *Legionella pneumophila* y marcada con Cy3.

Se añadieron las sondas a la disolución de hibridación a una concentración final de 1 ng/μl.

Disolución de lavado

Tabla 5

Compuestos	Concentración
NaCl (Sigma, S-9625)	215 mM
SDS (Sigma, L-4522)	0,1%
Tris-HCl pH 7,2 (Sigma, T-2538)	20 mM

- 5 Se esterilizaron todos los reactivos mediante filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,2 μm (Millipore, SLGS025 OS).

Ejemplo 2

Se aplica el protocolo experimental del ejemplo 1 a una muestra empleando la primera sonda leg705 marcada con un colorante fluorescente verde y la segunda sonda PNE1 marcada con un colorante fluorescente rojo.

- 10 La figura 2 muestra cuatro casos que permiten que se distinga *Legionella pneumophila* de bacterias fluorescentes de manera natural. En referencia a la figura 2:

Caso 1 - Bacteria ni fluorescente roja ni verde – la bacteria no pertenece al género *Legionella* ni a la especie *Legionella pneumophila*;

- 15 Caso 2 - Sólo bacteria fluorescente verde – la bacteria pertenece al género *Legionella* o es fluorescente de manera natural;

Caso 3 - Sólo bacteria roja – A pesar de la fluorescencia roja, la bacteria no pertenece a la especie *Legionella pneumophila* porque no es fluorescente verde y por tanto no pertenece al género *Legionella*. Esta bacteria es fluorescente roja de manera natural; y

- 20 Caso 4 - Bacteria fluorescente roja y verde – la bacteria pertenece al género *Legionella* y la especie *Legionella pneumophila*.

Usando este método, puede detectarse de manera precisa *Legionella pneumophila* limitando la detección de bacterias fluorescentes de manera natural que de lo contrario indicarían erróneamente estas bacterias.

La sonda PNE1 se describe por primera vez en Grimm *et al.* (Grimm *et al.*, 1998). La secuencia específica es: 5'-ATC TGA CCG TCC CAG GTT-3'.

- 25 La sonda Leg705 se describe por primera vez en Manz *et al.* (Manz *et al.*, 1995). La secuencia específica es: 5'-CTGGTGTTCCTTCCGATC-3'.

Se usaron tres colorantes en esta prueba y se usaron como sigue:

El primer colorante se usa para teñir el ácido nucleico de todos los microorganismos. Se usa DAPI para teñir las bacterias de azul bajo excitación UV. Este colorante no está acoplado con una sonda oligonucleotídica.

- 30 Los segundos dos colorantes están acoplados con una sonda oligonucleotídica para permitir la detección específica. Estos dos colorantes deben caracterizarse por dos espectros diferentes de excitación/emisión. En la prueba, se usan FITC y Cy3, que son los colorantes más comúnmente usados para la detección mediante FISH, pero están disponibles muchos colorantes con los mismos espectros respectivamente.

Tabla 6

Colorantes usados	λ de excitación [nm]	λ de emisión [nm]	Colorantes disponibles
DAPI	350	461	
FITC	494	521	Alexa 488, Hylite 488, Dylight 488,
Cy3	550	570	Rodamina, Alexa 555, Hylite 555, ...

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar y contar microorganismos viables en una muestra de la que se sospecha que contiene dichos microorganismos que comprende:

5 (1) poner en contacto dicha muestra con un recurso nutritivo celular y un inhibidor de la proliferación celular, en el que el recurso nutritivo celular contiene un complemento de crecimiento que comprende un antioxidante, preferiblemente ácido pirúvico (o sal del mismo),

10 (2) poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda oligonucleotídica marcada por fluorescencia que puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos, en el que dicha muestra se pone en contacto con al menos una primera sonda y una segunda sonda en el que la primera sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos y la segunda sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte diferente de los ácidos nucleicos ribosómicos de los microorganismos,

15 (3) detectar y cuantificar la señal fluorescente, en el que los microorganismos son de la especie *Legionella pneumophila* y en el que el inhibidor de la proliferación celular se selecciona del grupo que consiste en ciprofloxacino y cefalexina.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el recurso nutritivo celular de la etapa 1) contiene ácido glutámico (o sal del mismo).

3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el recurso nutritivo celular de la etapa 1) contiene ácido glutámico (o sal del mismo) y ácido pirúvico (o sal del mismo).

20 4. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la sonda oligonucleotídica se selecciona del grupo que consiste en una sonda con una secuencia de bases de 5' a 3' de ATC TGA CCG TCC CAG GTT; una sonda que tiene una secuencia de bases de 5' a 3' de ATCTG ACCG T CCCAG GTT; y una sonda que tiene una secuencia de bases de 5' a 3' de AGCTT TCATC CAAAG ATA.

25 5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que en la etapa (2) dicha muestra se pone en contacto con al menos una primera sonda y una segunda sonda en el que la primera sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos pertenecientes todos al género *Legionella* y en el que la segunda sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos pertenecientes todos a la especie *Legionella pneumophila*.

30 6. Método según la reivindicación 5, en el que la primera sonda se selecciona del grupo que consiste en una sonda con una secuencia de bases de 5' a 3' de CTGGT GTTCC TTCCG ATC; una sonda con una secuencia de bases de 5' a 3' de TCGGA CGCAG GCTAA TCT; una sonda con una secuencia de bases de 5' a 3' de CCTCC TCCCC ACTGA AAGT; una sonda con una secuencia de bases de 5' a 3' de CACTG TATGT CAAGG GTAGG; y una sonda con una secuencia de bases de 5' a 3' de AAGGC ATATT CCTAC GCG.

35 7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa (3) se lleva a cabo automáticamente usando un microscopio de epifluorescencia.

8. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la muestra se deriva de cualquiera del grupo seleccionado de aguas de refrigeración industrial, agua potable y aguas naturales.

9. Kit para detectar y contar más rápidamente microorganismos viables de la especie *Legionella pneumophila* en una muestra de la que se sospecha que contiene dichos microorganismos, que comprende:

40 (1) un recurso nutritivo celular, que contiene un complemento de crecimiento que comprende un antioxidante, preferiblemente ácido pirúvico (o sal del mismo),

(2) un inhibidor de la proliferación celular,

45 (3) sondas oligonucleotídicas marcadas por fluorescencia que pueden hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos, que comprenden una primera sonda y una segunda sonda en el que la primera sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte de los ácidos nucleicos ribosómicos de dichos microorganismos y la segunda sonda puede hibridarse específicamente con al menos una parte diferente de los ácidos nucleicos ribosómicos de los microorganismos

(4) un medio para detectar y cuantificar la señal fluorescente, en el que el inhibidor de la proliferación celular se selecciona del grupo que consiste en ciprofloxacino y cefalexina.

Figura 1

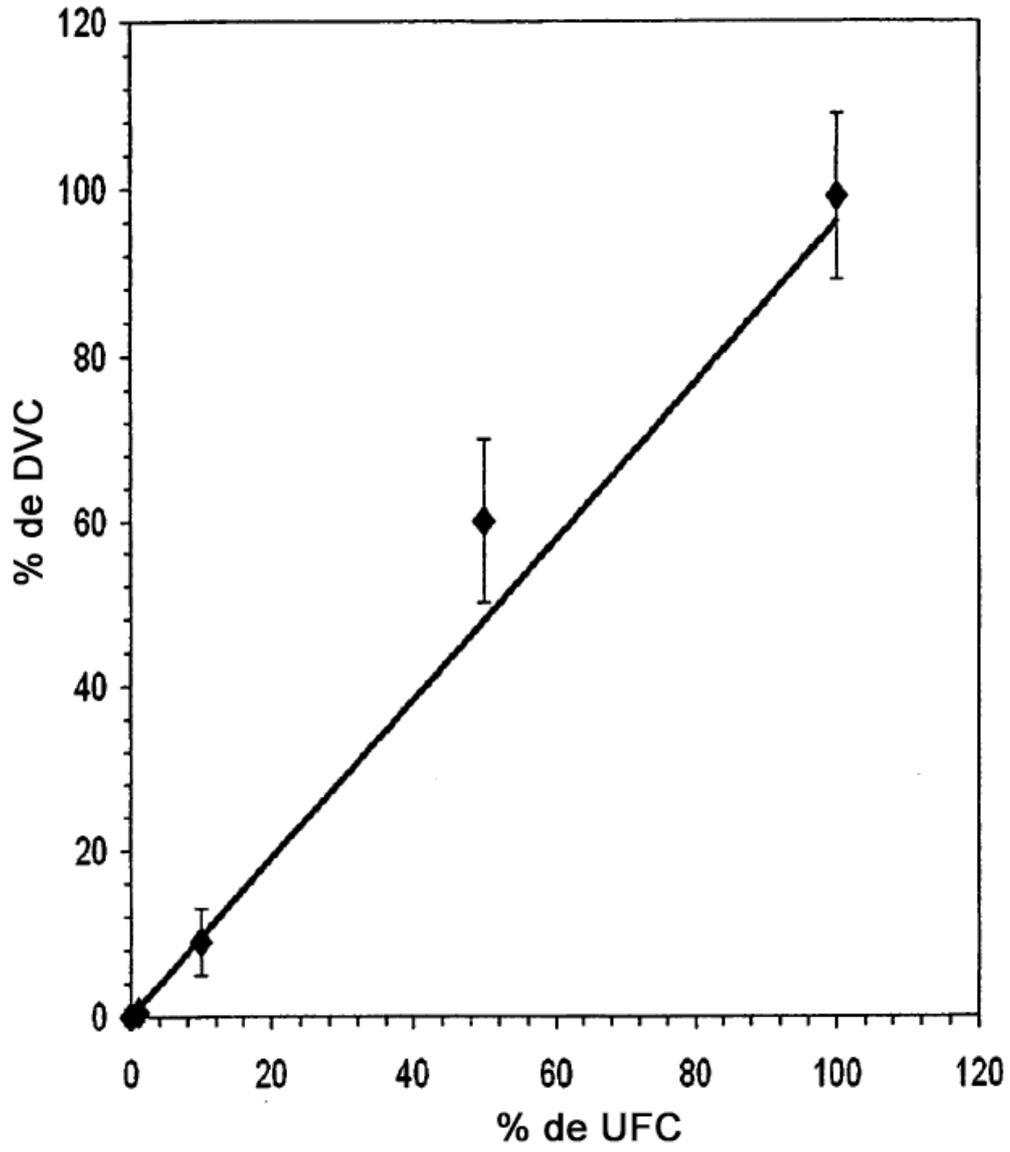


Figura 2

