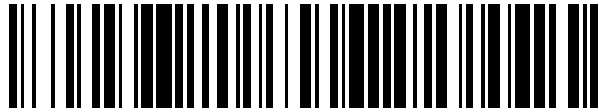


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 555**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2009 E 09756026 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2352839**

54 Título: **Medio de reacción para la detección y/o la identificación de bacterias del género Legionela**

30 Prioridad:

17.10.2008 FR 0857078

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.05.2015

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**CELLIER, MARIE;
ORENGA, SYLVAIN;
ROBICHON, DENIS y
SAUVONNET, VÉRONIQUE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 536 555 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

Medio de reacción para la detección y/o la identificación de bacterias del género *Legionella*

5 La presente invención se refiere a un medio de reacción para las legionelas, así como a la utilización de tal medio, y a un procedimiento que utiliza este medio.

10 Las legionelas (*Legionella sp*) son unas bacterias del entorno hídrico (ecosistemas naturales y redes de distribución de aguas) susceptibles de provocar unas infecciones, a veces mortales en el ser humano. Se han puesto en evidencia varias especies del género *Legionella* en el ser humano, pero la más importante es la *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), responsable de aproximadamente el 90% de los casos de legionelosis. Otras especies, tales como *L. jordanis* están generalmente aisladas en unos sujetos inmunodeprimidos. La legionelosis (o enfermedad del legionario) es una enfermedad respiratoria caracterizada por una neumopatía aguda severa, cuya infección es adquirida por la inhalación de aerosoles contaminados por la *Legionella*, como las torres de refrigeración, los sistemas de climatización, los establecimientos termales, las duchas, etc. Después de un periodo de incubación de 2 a 10 días, los pacientes presentan un síndrome pseudogripal. Aparece después una fiebre elevada, una pleuresía, una tos importante, asociadas a trastornos gastrointestinales (diarrea, vómitos) incluso a veces neurológicos (delirio, somnolencia, confusión). En 2005, se señalaron más de 1500 casos en Francia y aproximadamente 5700 en Europa; en los Estados Unidos, el CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades) estima que habría de 8000 a 18000 casos de legionelosis al año.

25 El diagnóstico de la legionelosis es muy complejo ya que la enfermedad es atípica: clásica de una neumopatía, no tiene nada específico. La mortalidad es del 20% de los casos de media, más bien bajo en los casos comunitarios pero sin embargo, importante en los casos nosocomiales. Un diagnóstico precoz es esencial para proponer al paciente un tratamiento adecuado.

El diagnóstico se puede realizar según los métodos siguientes:

30 - la identificación mediante un método de inmunofluorescencia directa. Realizado sobre la extracción con anticuerpos de los principales serogrupos de *L. pneumophila*, este método permite la puesta en evidencia de los antígenos solubles. Los métodos utilizados principalmente son ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), la RIA (análisis por radioinmunología) o ICM (inmunocromatografía sobre membrana). El mayor inconveniente de estas técnicas es que permiten detectar sólo la presencia eventual de ciertos serogrupos de *L. pneumophila*.

35 - el diagnóstico serológico de los anticuerpos anti-antígeno O de LPS por inmunofluorescencia indirecta. Este método permite identificar sólo *L. pneumophila* serogrupo 1 y presenta el riesgo de numerosos falsos positivos debidos a las reacciones cruzadas con las micobacterias, las leptospiros, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, etc.

40 - la identificación bacteriológica mediante el método de cultivo. El crecimiento de las legionelas es difícil. En efecto, no se cultivan sobre gelosas con sangre, el pH debe ser estrictamente controlado (6,9 +/- 0,2) y se deben cumplir las exigencias de la bacteria. Así, los cultivos se realizan generalmente sobre una gelosa BCYE (Extracto de Levadura con Carbón Tamponado) suplementada en tampón ACES, en L-cisteína, y en Fer; siendo estos dos últimos elementos unos factores de crecimiento indispensables; o GVPC. Las colonias son observables a partir de 48h de incubación a 37°C. La identificación de las legionelas se puede realizar en medio *Legionella* GVPC (bioMérieux), que es un medio específico y selectivo que favorece el aislamiento de la mayoría de las especies de *Legionella*, en particular *L. pneumophila*. Este medio permite una inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas, de la mayoría de las bacterias Gram negativas, de las levaduras y de los mohos, gracias a una mezcla optimizada de tres antibióticos.

55 Sin embargo, los medios de cultivo actuales contienen carbón activado para adsorber los compuestos tóxicos producidos por las *Legionelas*, o presentes en el medio (extracto de levadura, agar, etc.) o por tratamiento en autoclave del medio de cultivo que genera la formación de radicales libres, también tóxicos para las legionelas. Estos medios son, por lo tanto, de un color negro, que los hace inadecuados para la incorporación de sustratos enzimáticos cromógenos o fluorescentes, que podrían sin embargo facilitar la lectura del medio.

60 La invención se propone resolver los problemas del estado de la técnica presentando un nuevo medio de reacción para las bacterias del género *Legionella*.

De manera sorprendente, los inventores han puesto en evidencia que la utilización de compuestos siliciados en un medio de reacción permitía una detección rápida y fácil de las *Legionella*.

65 Antes de presentar la invención, se dan las definiciones siguientes para permitir entender mejor la invención. No son de ninguna manera limitativas.

Por “medio de reacción”, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o para el crecimiento de microorganismos tales como las legionelas.

5 El medio de reacción puede ser sólido, semisólido o líquido. Por medio sólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado. El agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar Gelrite, gelatina, agarosa u otros gelificantes naturales o artificiales. El medio de reacción según la invención debe permitir el crecimiento de las legionelas.

10 El medio de reacción puede comprender uno o más elementos en combinación, tales como unos aminoácidos, unos hidratos de carbono, unos nucleótidos, unos minerales, unas vitaminas, etc.

15 El medio puede comprender asimismo un colorante. A título indicativo, se puede citar como colorante el azul de Evans, el rojo neutro, un opacificante tal como el óxido de titanio, la nitroanilina, el verde malaquita, el verde brillante, uno o más indicadores metabólicos, uno o más reguladores metabólicos, etc.

El medio de reacción puede ser un medio de cultivo, un medio de revelación o un medio de cultivo y de revelación. En el caso de un medio de revelación, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la inoculación y, en el segundo caso, el medio de revelación constituye asimismo el medio de cultivo.

20 El experto en la materia puede también utilizar una placa de doble compartimento, que permite comparar fácilmente dos medios, que comprende diferentes sustratos o diferentes mezclas selectivas, en los que se depositará una misma muestra biológica.

25 Por mezcla selectiva, se entiende una mezcla de compuestos que permiten el cultivo selectivo de microorganismos particulares. En el ámbito de la presente invención, la mezcla selectiva puede permitir el cultivo selectivo de las legionelas. Tal medio de cultivo comprende en particular los siguientes compuestos: Glicina, Sulfato de polimixina B, Vancomicina o cefamandol, Cicloheximida, o Anisomicina, o también natamicina, solos o en combinación.

30 El medio selectivo puede permitir también el cultivo selectivo de algunas especies de legionelas, como por ejemplo *L. pneumophila*. En este caso, la mezcla selectiva comprende en particular los compuestos siguientes: glicina, Sulfato de polimixina B, Vancomicina o cefamandol, Cicloheximida, Anisomicina, natamicina, púrpura de Bromocresol, azul de Bromotímol solos o en combinación.

35 Por compuesto siliciado, se entiende cualquier compuesto que contiene el elemento silicio. Se puede citar de manera no limitativa las zeolitas naturales o sintéticas, las arcillas, de manera preferida la illita, la montmorillonita y preferiblemente la sepiolita, o también las sílices apolares.

40 Por sílice apolar, se entiende una o más partículas de sílice en las que se ha injertado unas funciones químicas apolares, lo más frecuentemente unas cadenas alquiladas que tienen al menos 2 átomos de carbono. Preferiblemente, tienen de 4 a 24 átomos de carbono, aún más preferiblemente 18 átomos de carbono (octadecilo), 8 (octilo) o 4 átomos de carbono (butílico).

Preferiblemente, esta sílice apolar es una octadecil-sílice o una octil-sílice.

45 Por sustrato enzimático, se entiende una molécula que puede ser metabolizada por una enzima, en un producto que permite la detección, directa o indirecta de un microorganismo. Puede tratarse de sustrato natural o sintético. El metabolismo del sustrato provocará una variación de las propiedades fisicoquímicas del medio de reacción o de las células de organismos. Esta variación se puede detectar mediante unos métodos fisicoquímicos, en particular unos métodos ópticos visuales por el operario o con la ayuda de instrumentos, espectrométricos, eléctricos, magnéticos, etc. Preferiblemente, se tratará de una variación de las propiedades ópticas, tales como una modificación de adsorción, de fluorescencia o de luminiscencia.

50 Por sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno, se entiende un molécula cuyo metabolismo genera un producto que tiene una fluorescencia o un color diferente del sustrato.

55 En el ámbito de la presente invención, el sustrato enzimático se selecciona preferiblemente de entre los sustratos de oxidorreductasa, de hidrolasa.

60 Preferiblemente, este sustrato es un sustrato de nitrorreductasa, de oxidorreductasa, acetoacetil-CoA reductasa, de deshidrogenasa, de superóxido dismutasa, de osidasa, de peptidasa, de nucleasa o de esterasa.

Como sustrato cromógeno, se puede citar en particular aquellos a base de alizarina, los sustratos de alfa-glucosidasa y muy particularmente el alizarina-alfa-glucósido.

65 Como sustrato fluorógeno, se pueden citar aquellos a base de cumarina, los descritos en la patente EP 0641351 (“Enzymatic analysis using substrates that yield fluorescent precipitates” HAUGLAND *et al.*) o en la solicitud

de patente FR 07/55371, los sustratos de reductasa y en particular los de nitrorreductasa y más preferiblemente los descritos en la solicitud de patente FR 07/55373 o en la patente EP 1124986. Como sustrato de actividad enzimática de oxidorreductasa, se pueden citar más particularmente los sustratos de reductasa y preferiblemente los sustratos de nitrorreductasa.

5 La introducción de un segundo sustrato enzimático y en particular un segundo sustrato de alfa-glucosidasa en un medio que contiene ya alizarina-alfa-glucósido permite incrementar la diferenciación de las legionelas de los otros géneros que llegan a crecer en el medio.

10 Por muestra biológica, se entiende una muestra clínica, procedente de una extracción de aspiración bronquial, traqueal o pulmonar de líquido pleural, de un lavado broncoalveolar, de expectoraciones, de la sangre o de una biopsia pulmonar, y más raramente de líquido articular o pericárdico; una muestra alimenticia. Esta muestra puede ser así líquida o sólida y se puede citar de manera no limitativa, una muestra de sangre, de plasma, de orinas, de heces, de extracciones de nariz, de garganta, de piel, de heridas, de líquido cefalorraquídeo, una muestra alimenticia de agua (agua potable).

15 Por muestra ambiental, se entiende una extracción de agua, y se puede citar de manera no limitativa: la red de alimentación en agua, el sistema de climatización, una torre aerorefrigerante, un vaporizador o un atomizador.

20 Para ello, la invención se refiere en primer lugar a un medio de reacción para el cultivo y/o la detección y/o la identificación de bacterias del género *Legionella*, que comprende al menos una sílice apolar. Preferiblemente, dicha sílice apolar es la octadecil-sílice. Preferiblemente, dicha sílice apolar está en combinación con una arcilla, preferiblemente la sepiolita. Preferiblemente, la octadecil-sílice está en combinación con la sepiolita.

25 Según un modo preferido de realización de la invención, dicho medio de reacción comprende, además, un sustrato enzimático.

Preferiblemente, dicho sustrato enzimático es un sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno, preferiblemente cromógeno.

30 Preferiblemente, dicho sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno es un sustrato de oxidorreductasa o un sustrato de hidrolasa.

35 Según un modo preferido de realización de la invención, la concentración en sílice apolar está comprendida entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l. En el caso en el que el medio según la invención comprenda una sílice apolar en combinación con una arcilla, la concentración en arcilla está asimismo comprendida entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l.

40 Según un modo preferido de realización de la invención, el medio de reacción comprende además una mezcla selectiva que permite el cultivo selectivo de bacterias del género *Legionella*. Preferiblemente, esta mezcla selectiva comprende Glicina, Sulfato de polimixina B, Vancomicina, Cicloheximida, Anisomicina, Púrpura de Bromocresol, Azul de Bromotimol solos o en combinación.

45 La utilización de tal medio permite la detección selectiva de bacterias del género *Legionella*.

El medio según la invención puede también comprender una mezcla selectiva que permite el cultivo selectivo de especies particulares de *Legionella* tal como *Legionella pneumophila*. Esta mezcla selectiva comprende entonces preferiblemente Glicina, Sulfato de polimixina B, Vancomicina, una Quinolona o una Fluoroquinolona, Cicloheximida, Anisomicina, Púrpura de Bromocresol, Azul de Bromotimol solos o en combinación. La diferencia de selectividad se puede obtener asimismo por la variación de la concentración en Glicina, que va de 2,5 g/l a 7,5 g/l (Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens, Robert M. Wadowski y Robert B. Yee).

50 La invención se refiere asimismo a la utilización de un medio de reacción que comprende al menos un compuesto siliciado, para el cultivo, la detección y/o la identificación de bacterias del género *Legionella*. Preferiblemente, dicho compuesto siliciado es una sílice apolar. Preferiblemente, dicha sílice apolar es la octadecil-sílice.

60 Según un modo preferido de realización de la invención, la concentración en compuesto siliciado, en el medio de reacción utilizado, está comprendida entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l. En el caso en el que el medio de reacción utilizado comprenda una combinación de compuestos siliciados, la concentración de cada uno de los compuestos está comprendida entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l.

La invención se refiere finalmente a un procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias del género *Legionella*, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

65 a) poner en contacto una muestra susceptible de contener unas bacterias del género *Legionella* con un medio de

reacción tal como se ha definido anteriormente,

b) incubar, y

5 c) detectar la presencia de bacterias del género *Legionella*.

La incubación se realiza preferiblemente a una temperatura comprendida entre 30°C y 50°C, y más preferiblemente entre 36°C y 42°C. Las legionelas se detectan preferiblemente mediante una actividad alfa-glucosidasa u oxidorreductasa que permite obtener unas colonias coloreadas o fluorescentes. Las colonias de otros géneros, si no están inhibidas, aparecen o bien incoloras, o bien de un color diferente, o bien de un color de fluorescencia idéntica a la de *Legionella*.

El tiempo de incubación permite el crecimiento de las bacterias del género *Legionella* para permitir su detección. Sin ser limitativo, una incubación de 48-72h es muy adecuada, pero es posible una incubación más corta.

15 Durante la utilización de este medio, las legionelas son preferiblemente detectadas por una actividad oxidorreductasa que permite obtener unas colonias coloreadas o fluorescentes. Las otras bacterias son o bien inhibidas, o bien incoloras, o bien de un color o fluorescencia diferente, o bien de un color o fluorescencia idéntica a la de las legionelas.

20 Los ejemplos siguientes son dados a título explicativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

Ejemplo 1

25 Se ensayaron diferentes cepas del género *Legionella* sobre 5 medios diferentes. La lectura de las cajas se efectúa después de 72h y 96h de incubación.

30 1. MEDIOS Y MICROORGANISMOS

Se ha utilizado el medio de composición siguiente (composición en g/l):

- extracto de levadura: 10 g/l

35 - ácido alfa-cetoglutarico: 1 g/l

- ACES/KOH: 4/1,65 g/l

- Glicina: 3 g/l

40 - Hidrocloruro de cisteína: 0,4 g/l

- pirrofosfato férrico: 0,25 g/l

45 - Glutati6n: 5 g/l

- Agar: 17 g/l

50 A este medio, se añaden 5 g/l de sílice apolar (octadecil-sílice, medio 1), 5 g/l de sílice polar (Silica gel, medio 2), 5 g/l de sílice muy polar (3-aminopropil-sílice, medio 3) o 5 g/l de sílice apolar (octil-sílice, medio 4).

El medio BCYE (Feeley *et al.*, J Clin Microbiol. 1979 10:437-41) es un medio que sirve de control de crecimiento.

55 2. Ensayos

Los medios se reparten en cajas de Petri. La inoculación de las diferentes cepas de *Legionella* se efectúa por aislamiento en tres cuadrantes. Las cajas se incuban durante 96h a 37°C en presencia de CO₂.

Se efectúan unas lecturas después de 72 y 96h de incubación.

60 3. Resultados

Los resultados son consignados en la tabla siguiente:

65

| | | BCYE | | medio 1 | | medio 2 | | medio 3 | | medio 4 | |
|-----------------------|-----|-------------|------|-------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-------------|------|
| | | Crecimiento | | Crecimiento | | Crecimiento | | Crecimiento | | Crecimiento | |
| | | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C |
| <i>L. pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,5+ | 3 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1 |
| 07 10 139 | 96h | 3 | 1 | 3 | 1,25 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1 |
| <i>L. pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 | 3 | 0,25 | 3 | 0,25 | 3 | 0,75 |
| 07 10 146 | 96h | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| <i>L. pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,75 | 3 | 1 | 1 | 0,75 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 07 10 138 | 96h | 3 | 1 | 3 | 1,25 | 2 | 1,25 | 1+ | 0 | 3 | 1 |
| <i>L. pneumophila</i> | 72h | 3 | 1 | 3 | 1,25 | 3 | 0,5 | 3 | 0,5 | 3 | 1 |
| 07 10 142 | 96h | 3 | 1,25 | 3 | 1,25 | 3 | 0,5+ | 3 | 0,5+ | 3 | 1 |
| <i>L. pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,75 | 3 | 1 | mancha pulmonar | | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 07 10 144 | 96h | 3 | 1,25 | 3 | 1 | mancha pulmonar | | mancha pulmonar | | 3 | 1 |
| <i>L. pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,75 | 3 | 1,25 | 3 | 0,1 | 3 | 0,1 | 3 | 1,25 |
| 07 10 143 | 96h | 3 | 1 | 3 | 1,25 | 3 | 0,5 | 3 | 0,5 | 3 | 1,25 |
| <i>L. erythra</i> | 72h | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5+ |
| 04 12 069 | 96h | 3 | 0,5 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5+ |
| <i>L. rubrilucens</i> | 72h | 3 | 0,5+ | 3 | 1 | mancha pulmonar | | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 04 12 075 | 96h | 3 | 0,75 | 3 | 1 | 2 | 0 | mancha pulmonar | | 3 | 1 |
| <i>L. feeleii</i> | 72h | 3 | 0,25 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 04 12 070 | 96h | 3 | 0,25 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| <i>L. longbeachae</i> | 72h | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 04 12 073 | 96h | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |

M: masa; C: colonias

La anotación "1", "2" o "3" en la columna M (masa) indica el crecimiento de la cepa ensayada en 1, 2 ó 3 cuadrantes; "0" indica una ausencia de crecimiento. El tamaño de las colonias (C) se da en milímetros.

5 4. INTERPRETACIÓN

Los medios que contienen unas sílices de naturaleza apolar permiten el crecimiento de todas las cepas ensayadas, crecimiento superior al medio BCYE.

10 Ejemplo 2

Se han ensayado diferentes cepas del género *Legionella* sobre 8 medios diferentes. La lectura de las cajas se efectúa después de 72h y 96h de incubación.

15 1. MEDIOS Y MICROORGANISMOS

Se ha utilizado el medio de composición siguiente (composición en g/l):

- 20 - extracto de levadura: 10 g/l
- ácido alfa-cetoglutarico: 1 g/l
- ACES/KOH: 4/1,65 g/l
- 25 - glicina: 3 g/l
- hidrocloreuro de cisteína: 0,4 g/l
- pirrofosfato férrico: 0,25 g/l
- 30 - glutatión: 5 g/l

ES 2 536 555 T3

- Agar: 17 g/l

A este medio se añadió 1 g/l de sílice apolar (octadecil-sílice, medio T), o respectivamente, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 g/l de sepiolita (medios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

5

2. ENSAYOS

Los medios se reparten en cajas de Petri. La inoculación de las diferentes cepas de *Legionella* se efectúa por aislamiento en tres cuadrantes. Las cajas se incuban durante 96h a 37°C en presencia de CO₂.

10

Se efectúan las lecturas después de 72 y 96h de incubación.

3. RESULTADOS

15 Se consignan los resultados en la tabla siguiente:

| | | T | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | |
|----------------------|-----|-----------------------|------|------------------|-----|-----|------|---|------|-----|------|---|------|-----|------|----|------|
| | | octadecilo sílice g/l | | Sepiolita en g/l | | | | | | | | | | | | | |
| | | 1 | | 0,1 | | 0,5 | | 1 | | 2,5 | | 5 | | 7,5 | | 10 | |
| | | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C |
| <i>L pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,75 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,1 | 3 | 0,75 | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 |
| 07 10 139 | 96h | 3 | 0,75 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,1 | 3 | 0,75 | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 |
| <i>L pneumophila</i> | 72h | 3 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,25 | 3 | 0,25 | 3 | 0,75 | 3 | 0,75 | 3 | 1 |
| 07 10 143 | 96h | 3 | 1,5 | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1,25 | 3 | 1,25 | 3 | 1,25 |
| <i>L pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,5 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,1 | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 |
| 07 10 138 | 96h | 3 | 0,75 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,25 | 3 | 0,5 | 3 | 1 | 3 | 0,75 | 3 | 1 |
| <i>L pneumophila</i> | 72h | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 | 3 | 0,5 | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 | 3 | 1 | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 |
| 07 10 142 | 96h | 3 | 0,75 | 3 | 1 | 3 | 0,75 | 3 | 1 | 3 | 1,25 | 3 | 1,25 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| <i>L erythra</i> | 72h | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 04 12 069 | 96h | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L rubrilucens</i> | 72h | 3 | 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,1 | 3 | 0,1 |
| 04 12 075 | 96h | 3 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 |
| <i>Lfeelii</i> | 72h | 3 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,5 | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 |
| 04 12 070 | 96h | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0,75 | 3 | 0,5 | 3 | 0,75 |
| <i>L longbeachae</i> | 72h | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 04 12 073 | 96h | 3 | 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Crecimiento: M: masa; C: colonias

20 La anotación "1", "2" o "3" en la columna M (masa) indica el crecimiento de la cepa ensayada en 1, 2 ó 3 cuadrantes; "0" indica una ausencia de crecimiento. El tamaño de las colonias (C) se da en milímetros.

4. INTERPRETACIÓN

25 Los medios que contienen sepiolita a concentraciones comprendidas entre 5 y 10 g/l permitan un crecimiento de todas las *Legionella pneumophila*, crecimiento sustancialmente idéntico al medio control.

Ejemplo 3

30 Se han ensayado diferentes cepas del género *Legionella* sobre 3 medios diferentes. La lectura de las cajas se efectúa después de 72h y 96h de incubación.

1. MEDIOS Y MICROORGANISMOS

35 Se ha utilizado el medio de composición siguiente (composición en g/l):

- extracto de levadura: 10 g/l

- ácido alfa-cetoglutarico: 1 g/l

40

- ACES/KOH: 4/1,65 g/l

- glicina: 3 g/l
- hidrocloreto de cisteína: 0,4 g/l

5 - pirrofosfato férrico: 0,25 g/l

- glutatión: 5 g/l

- Octadecil-sílice: 1 g/l

10 A este medio se añadieron 17 g/l de agar (medio T), 17 g/l de Gelrite (medio T1) y 5 g/l de sepiolita y 17 g/l de agar (medio T2).

15 2. ENSAYOS

Los medios se reparten en cajas de Petri. La inoculación de las diferentes cepas de *Legionella* se efectúa por aislamiento en tres cuadrantes. Las cajas se incuban durante 96h a 37°C en presencia de CO₂.

Se efectúan las lecturas después de 72 y 96h de incubación.

20 3. RESULTADOS

Los resultados se consignan en la tabla siguiente:

| | | T | | T1 | | T2 | |
|--------------------------------------------|-----|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| Sepiolita g/l | | 0 | | 0 | | 5 | |
| Gelrite g/l | | 0 | | 17 | | 0 | |
| Agar g/l | | 17 | | 0 | | 17 | |
| | | Crecimiento | | Crecimiento | | Crecimiento | |
| | | M | C | M | C | M | C |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 139 | 72h | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 1,25 |
| | 96h | 3 | 1,25 | 3 | 3 | 3 | 1,25 |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 138 | 72h | 3 | 1,25 | 3 | 1,5 | 3 | 1,25 |
| | 96h | 3 | 1,5 | 3 | 2 | 3 | 1,25 |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 142 | 72h | 3 | 0,75 | 3 | 1,25 | 3 | 1 |
| | 96h | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 1 |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 147 | 72h | 3 | 0,25 | 3 | 1 | 3 | 0,75 |
| | 96h | 3 | 1 | 3 | 1,5 | 3 | 1 |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 149 | 72h | 3 | 0,25 | 3 | 1,25 | 3 | 0,75 |
| | 96h | 3 | 1 | 3 | 1,5 | 3 | 1 |
| <i>Legionella rubrilucens</i> 04 12 075 | 72h | 3 | 0,25 | 3 | 1,5 | 3 | 0,75 |
| | 96h | 3 | 0,5 | 3 | 1,5 | 3 | 0,75 |
| <i>Legionella feelii</i> 04 12 070 | 72h | 2 | 0 | 3 | 1,25 | 3 | 0,25 |
| | 96h | 3 | 0,25 | 3 | 1,5 | 3 | 0,75 |
| <i>Legionella longbeachae</i> 04 12 073 | 72h | 3 | 0,1 | 3 | 1 | 3 | 0,5 |
| | 96h | 3 | 0,75 | 3 | 1,25 | 3 | 0,75 |

25 La anotación "1", "2" o "3" en la columna M (masa) indica el crecimiento de la cepa ensayada en 1, 2 ó 3 cuadrantes. El tamaño de las colonias (C) se da en milímetros.

30 4. INTERPRETACIÓN

Todos los medios ensayados aquí permiten un crecimiento de todas las legionelas con tamaños de colonias aisladas importantes.

35 Ejemplo 4

Se han ensayado diferentes cepas del género *Legionella* sobre un medio según la invención que comprende un sustrato fluorógeno de nitrorreductasa, el 2-(5'-fluoro-2'-nitrofenil)-benzotiazol. La lectura de las cajas se efectúa después de 72h, 96h y 120h de incubación.

1. MEDIOS Y MICROORGANISMOS

Se ha utilizado el medio de composición siguiente (composición en g/l):

- 5 - extracto de levadura: 10 g/l
- ácido alfa-cetoglutarico: 1 g/l
- 10 - ACES/KOH: 4/1,65 g/l
- glicina: 3 g/l
- 15 - hidrocloreuro de cisteína: 0,4 g/l
- pirrofosfato férrico: 0,25 g/l
- glutatión: 5 g/l
- 20 - agar: 17 g/l
- Octadecil-sílice: 1 g/l

25 Una solución madre de sustrato fluorógeno 2-(5'-fluoro-2'-nitrofenil)-benzotiazol se realiza en un disolvente de tipo DMSO a razón de 50 g/l. Se añade un volumen que corresponde a una concentración final de 5 mg/l de sustrato en dicho medio en sobrefusión.

2. ENSAYOS

30 Los medios se vierten en cajas de Petri de un diámetro de 55 mm, después se inoculan unas cepas de *Legionella* por aislamiento en tres cuadrantes a partir de suspensiones a 0,5 McFarland. Las cajas se incuban a 37°C durante 5 días.

3. RESULTADOS

35 Se examinan visualmente las colonias formadas después de 72, 96 y 120 horas de incubación. Se anotan la fluorescencia (leída bajo lámpara UV a 366 nm) así como la intensidad.

40 Los resultados se consignan en la tabla siguiente:

| | | T | | | | | I=T+5mg/l en sustrato fluorescente de nitrorreductasa | | | | |
|--------------------------------------------|------|-------------|------|---------------|---|------|-------------------------------------------------------|------|---------------|-----|------|
| | | Crecimiento | | Fluorescencia | | | Crecimiento | | Fluorescencia | | |
| | | M | C | M | C | Col. | M | C | M | C | Col. |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 139 | 72h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 0,5 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 2- | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,5 | 2 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 2+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,5 | 3 | 3 | Azul |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 146 | 72h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 1 | 0,5 | Azul |
| | 96h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,25 | 1 | 3 | Azul |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 138 | 72h | 3 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 1 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,5 | 2 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,5 | 1 | 2 | Azul |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 142 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 1 | 0,1 | Azul |
| | 96h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | 3 | Azul |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 144 | 72h | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 2- | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,25 | 3 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 3 | Azul |
| <i>Legionella pneumophila</i> 07 10 143 | 72h | 3 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0,5 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,25 | 1 | 3 | Azul |

| | | T | | | | | I=T+5mg/l en sustrato fluorescente de nitrorreductasa | | | | |
|--------------------------------------------|------|-------------|---|---------------|---|------|-------------------------------------------------------|------|---------------|-----|------|
| | | Crecimiento | | Fluorescencia | | | Crecimiento | | Fluorescencia | | |
| | | M | C | M | C | Col. | M | C | M | C | Col. |
| <i>Legionella erythra</i> 04 12 069 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0,1 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,5 | Azul |
| | 120h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0,1 | 0,5 | Azul |
| <i>Legionella rubilucens</i> 04 12 075 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5+ | 1 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5+ | 2 | 1 | Azul |
| | 120h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 2 | 2 | Azul |
| <i>Legionella feelii</i> 04 12 070 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 1 | 0,1 | Azul |
| | 96h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 2 | 2 | Azul |
| | 120h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 1 | 3 | Azul |
| <i>Legionella longbeachae</i> 04 12 073 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5 | 0,5 | 0 | Azul |
| | 96h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5 | 0 | 1 | Azul |
| | 120h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,5 | 0 | 1 | Azul |

0 indica o bien la ausencia de colonias aisladas, o bien la ausencia de fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia son leídas en una escala que va de 0 (ninguna fluorescencia) a 4 (fluorescencia muy intensa).

5 4. INTERPRETACIÓN

Un medio según la invención, que comprende un sustrato fluorógeno, permite el crecimiento de todas las cepas ensayadas, y una detección fácil de las legionelas.

10 **Ejemplo 5**

Se han ensayado diferentes cepas del género *Legionella* sobre un medio según la invención que comprende un sustrato cromógeno de alfa-glucosidasa, el alizarina-alfa-glucósido. La lectura de las cajas se efectúa después de 72h y 96h de incubación.

15

1. MEDIOS Y MICROORGANISMOS

Se ha utilizado el medio de composición siguiente (composición en g/l):

20

- extracto de levadura: 10 g/l

- ácido alfa-cetoglutarico: 1 g/l

25

- ACES/KOH: 4/1,65 g/l

- glicina: 3 g/l

- hidrocloreuro de cisteína: 0,4 g/l

30

- pirrofosfato férrico: 0,25 g/l

- glutatión: 5 g/l

35

- agar: 17 g/l

- Octadecil-sílice: 1 g/l

40

Una solución madre de sustrato cromógeno (alizarina-alfa-glucósido) se realiza en un disolvente de tipo DMSO a razón de 40 g/l. Se añade un volumen que corresponde a una concentración final de 50 mg/l de sustrato en dicho medio en sobrefusión. De la misma manera, se realiza una solución madre de citrato de hierro en agua en ósmosis, después se filtra la solución antes de ser añadida en el medio a razón de 100 mg/l.

2. ENSAYOS

45

Los medios se vierten en cajas de Petri de un diámetro de 55 mm, después se inoculan unas cepas de *Legionella* por aislamiento en tres cuadrantes a partir de suspensiones a 0,5 McFarland. Las cajas se incuban a 37°C durante 4 días.

3. RESULTADOS

5 Se examinan visualmente las colonias formadas después de 72 y 96 horas de incubación. Se anotan las coloraciones así como las intensidades.

Los resultados se consignan en la tabla siguiente:

| Cepas | Tiempo de incub. | Medio T | | | | | | Medio 1 50mg/l Alizarina-alfa-Glu + 100mg/l citrato de hierro | | | | | | |
|------------------------------------|------------------|-------------|------|------------|---|-------|---|---------------------------------------------------------------|------|------------|-----|-------|-----|---|
| | | Crecimiento | | Intensidad | | Color | | Crecimiento | | Intensidad | | Color | | |
| | | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C | |
| <i>L. pneumophila</i> 07 10 144 | 72h | 3 | 0,5+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96h | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. pneumophila</i> 07 10 146 | 72h | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0,5 | 0 | R | 0 | |
| <i>L. pneumophila</i> 07 10 142 | 72h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,50 | 1 | 1 | R | R | |
| | 96h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 1,5 | 1,5 | R | R | |
| <i>L. pneumophila</i> 07 10 141 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,10 | 2 | 0 | RVi | 0 | |
| | 96h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,75 | 2 | 1 | RVi | Rvi | |
| <i>L. pneumophila</i> 07 10 139 | 72h | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1,5 | 0 | RVi | 0 | |
| | 96h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1,5 | 0 | Rvi | 0 | |
| <i>L. jordanis</i> 04 09 055 | 72h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,10 | 2 | 0,5 | Vi | Vi | |
| | 96h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,25 | 2 | 1 | Vi | Vi | |
| <i>L. erythra</i> 04 12 069 | 72h | 3 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 96h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>L. rubrilucens</i> 04 12 075 | 72h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | R | 0 | |
| | 96h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1,5 | 0 | Vi | 0 | |
| <i>L. longbeachae</i> 04 12 073 | 72h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 96h | 3 | 1,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,9 | 0,50 | 0,5 | 0 | R | 0 | |
| <i>L. feellii</i> 04 12 070 | 72h | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,10 | 0,5 | 0 | R | 0 | |
| | 96h | 3 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,25 | 0,5 | 0 | R | 0 | |

10 0 indica bien la ausencia de crecimiento, o bien la ausencia de colonias aisladas, o bien la ausencia de coloración. Las intensidades de coloración son leídas en una escala que va de 0 (ninguna coloración) a 4 (coloración muy intensa). Los colores varían de rosa (anotado R) a violeta (Vi) pasando por Rvi (rosa/violeta).

4. INTERPRETACIÓN

15 Un medio según la invención, que comprende un sustrato cromógeno, permite el crecimiento de 8/10 de las cepas ensayadas, y una detección fácil de las legionelas por medio de la aparición de una coloración rosa a violeta de la masa y de las colonias.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medio de reacción para el cultivo, la detección y/o la identificación de bacterias del género *Legionella*, que comprende al menos un compuesto siliciado, caracterizado por que dicho compuesto siliciado es una sílice apolar.
2. Medio de reacción según la reivindicación 1, caracterizado por que la concentración en sílice apolar está comprendida entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l.
- 10 3. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además un sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno.
4. Medio de reacción según la reivindicación 3, en el que dicho sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno es un sustrato de oxido-reductasa o de hidrolasa.
- 15 5. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una mezcla selectiva que permite el cultivo selectivo de bacterias del género *Legionella*.
- 20 6. Utilización de un medio de reacción que comprende al menos un compuesto siliciado que es una sílice apolar, para el cultivo, la detección y/o la identificación de bacterias del género *Legionella*.
7. Utilización según la reivindicación 6, de un medio de reacción en el que la concentración en compuesto siliciado está comprendida entre 0,01 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l.
- 25 8. Utilización según una de las reivindicaciones 6 ó 7, de un medio de reacción que comprende además un sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno.
9. Utilización según la reivindicación 8 de un medio de reacción en el que dicho sustrato enzimático fluorógeno o cromógeno es un sustrato de oxido-reductasa o de hidrolasa.
- 30 10. Utilización según una de las reivindicaciones 6 a 9, de un medio de reacción que comprende además una mezcla selectiva que permite el cultivo selectivo de bacterias del género *Legionella*.
- 35 11. Procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias del género *Legionella*, que comprende las etapas siguientes:
- 40 a. poner en contacto una muestra susceptible de contener unas bacterias del género *Legionella* con un medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5;
- b. incubar, y
- c. detectar la presencia de bacterias del género *Legionella*.