

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 413**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2011 PCT/IB2011/052408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11151793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11789340 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2576810**

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

30 Prioridad:

03.06.2010 EP 10164836

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2017

73 Titular/es:

**BASF SE (50.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FOVET, YANNICK;
DUCRET, ADRIEN;
DUKAN, SAM y
PERIAME, MARINA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 646 413 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

5 La presente invención se refiere a un método para detectar y hacer un recuento de microorganismos viables de las especies de *Legionella pneumophila* en una muestra. La divulgación también incluye un kit adecuado para su uso en un método de este tipo. Este método y kit permiten la cuantificación de microorganismos viables de una forma más rápida.

Las bacterias de *Legionella* son están extendidas en entornos húmedos o humedecidos tales como suelo y hábitats acuáticos no marinos. También se pueden encontrar en instalaciones de agua caliente y fría, torres de refrigeración de sistemas de aire acondicionado y humidificador es de agua.

10 La *Legionella*, especialmente *Legionella pneumophila*, son agentes patógenos que pueden producir una neumonía bacteriana aguda, conocida generalmente como "enfermedad del legionario", que a menudo es letal para los individuos infectados.

15 Tradicionalmente la detección y recuento de *Legionella pneumophila* se consiguen mediante cultivo celular. Este método se puede conseguir midiendo las bacterias cultivables usando recuento de placas o medición de microcolonias empleando un método de membrana de filtro. Estas técnicas evalúan las bacterias viables por su capacidad para formar una colonia o microcolonia. Desafortunadamente, los métodos de este tipo por lo general requieren entre 3 y 10 días para permitir la formación de colonias o microcolonias. En lugares en los que las instalaciones de agua aún están en funcionamiento existe un riesgo inaceptable de infección humana durante este tiempo.

20 Otros métodos para detectar los microorganismos totales de *Legionella* incluyen técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La PCR emplea ADN polimerasa para amplificar un trozo de ADN mediante replicación enzimática *in vitro*. Durante el desarrollo de la técnica, el ADN generado se usa como molde para la replicación que provoca una reacción en cadena en la que el mol de de ADN se amplifica de manera exponencial. La PCR permite que una o varias copias de un trozo de ADN se amplifiquen generando millones o más copias del trozo de ADN. Por
25 lo general, un método de este tipo es descrito por Diederer *et al.*, J Med Microbiol. Enero de 2007; 56 (Pt 1): 94-101.

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

35 Otra técnica es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en la que una sonda oligonucleotídica etiquetada con 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. A continuación las bacterias en las que se fija la sonda emitirán una señal fluorescente. Esta señal fluorescente se puede cuantificar posteriormente mediante técnicas tales como la citometría de flujo, citometría en fase sólida, o microscopía epifluorescente. Una técnica habitual de FISH es descrita por Dutil S *et al.*, J Appl Microbiol. Mayo de 2006; 100 (5): 955-63. Sin embargo, usando la técnica FISH solo se
40 pudo detectar el índice total de *Legionella pneumophila* viable pero desafortunadamente el método no pudo identificar exclusivamente a las bacterias de *Legionella pneumophila* capaces de dividirse y, en consecuencia, crear una colonia.

45 Un método adicional para hacer un recuento de *Legionella pneumophila* viable implica Chem-Chrome V6 y es descrito 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 diferenciación entre bacterias viables y no viables. Combina la detección específica de células de *Legionella* usando anticuerpos y un marcador de viabilidad bacteriana (Chem-Chrome V6) y empleando microscopía epifluorescente para el recuento. Sin embargo, aunque esta técnica distingue entre células viables y no viables, no es capaz de identificar por separado esas bacterias formadoras de colonias.

50 El documento US 20070218522 describe métodos y composiciones para detectar y cuantificar *Legionella* viable y otras bacterias aerobias heterótrofas. El método incluye el uso de deslizamientos de portaobjetos de inmersión que incluyen un medio absorbente, sustancias promotoras del crecimiento y selectivas del crecimiento para la detección y cuantificación rápidas de microcolonias de *Legionella*. Esta técnica podría no hacer el recuento de las bacterias dañadas.

El documento EP 1329515 se refiere a un método para someter a ensayo la presencia de microorganismos en un entorno gaseoso que comprende peróxido de hidrógeno poniendo el entorno gaseoso en contacto con un medio de crecimiento de agar que comprende una sal de ácido pirúvico y que permite el desarrollo de colonias de los microorganismos.

5 En general se considera que las técnicas que implican el crecimiento de colonias en un medio de crecimiento, tal como una placa de agar con nutrientes son más precisas. En consecuencia, el método de recuento de placas sigue siendo la elección preferida del método para obtener el recuento viable total. Por lo general esto significa la aplicación de una muestra de la que se sospecha que contiene el microorganismo en una placa que contiene una fuente de nutriente sólido o medio de crecimiento. Por lo general una técnica de este tipo se denomina siembra en
10 placas. Por recuento viable total los inventores hacen referencia al índice total de bacterias capaces de producir una población discernible por el observador. Por lo general esto hará referencia a una colonia visible en la superficie de un medio de crecimiento tal como una placa de agar con nutrientes.

Sin embargo, los microorganismos tales como *Legionella pneumophila* en el medio pueden estar sujetos a una o más tensiones que evitan que el microorganismo crezca y se multiplique en su situación ambiental. Los
15 microorganismos estresados de este tipo no se podrían dividir en absoluto ni podrían formar una colonia visible en condiciones de cultivo normales. En el medio, una proporción de células de microorganismos por lo general se estresarán debido a las condiciones ambientales, tales como inanición, presencia de biocidas, choque térmico y desecación. Además, estas células pueden estar en un estado fisiológico vulnerable en el que la técnica de siembra en placas de los microorganismos puede empeorar el estrés de las células de los microorganismos ya estresados
20 debido a la presencia de oxígeno atmosférico. Además, esto podría conducir a la muerte de las bacterias estresadas producida por cualquier circunstancia, lo que conduce a una subestimación del recuento total viable.

Además, la subestimación del método viable de siembra en placas de *Legionella pneumophila* podría llegar a ser peligrosa en cuanto a su patogenicidad.

Desde la década de 1970, se ha informado que los neutralizadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) se
25 deberían usar para limitar el efecto del estrés oxidativo durante el proceso de siembra en placas. Esto fue informado por Speck *et al.*, enumeration of injured coliforms by a plating procedure, Appl Microbiol 29, 549-50 (1975); Martin *et al.*, Catalase: its effect on microbial enumeration. Appl Environ Microbiol 32, 731-4 (1976); Brewer *et al.*, Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol 34, 797-800 (1977); McDonald *et al.*, Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds
30 that degrade hydrogen peroxide or block its formation. Appl Environ Microbiol 45, 360-5 (1983); Marthi *et al.* Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. Appl Environ Microbiol 57, 2775-6 (1991); Busch and Donnelly Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Appl Environ Microbiol 58, 14-20 (1992); y Dukan *et al.*, Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. J Biol Chem 274, 26027-32 (1999).

35 Sin embargo, en todos los casos mencionados, los inventores de la presente invención creen que las ROS se podrían reducir mediante una ruta directa en la que el compuesto reacciona de forma química con ROS.

Bérubé *et al.*, "Rapid detection and identification of *Legionella pneumophila* by membrane immunoassay", Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55, 1640-1641 describe la detección e identificación de *Legionella pneumophila* mediante un ensayo de inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal. No se proporciona
40 ningún medio para tratar el problema de las bacterias lesionadas.

Un artículo de Pine *et al.*, (Role of keto acids and reduced-oxygen-scavenging enzymes in the growth of *Legionella* species. J Clin Microbiol 23, 33-42 (1986)) describe la necesidad de la adición de cetoácidos y la reducción de enzima neutralizante de oxígeno reducido para optimizar el crecimiento de *Legionella pneumophila* y sugería el uso de estos materiales en el medio usado para el recuento estándar de este microorganismo.

45 Sin embargo, el uso de cetoácidos y enzima neutralizante de oxígeno reducido solo es insuficiente para reparar las células estresadas de *Legionella pneumophila* a reparar y permitir un recuento precisa. Esto es especialmente así cuando se usa un medio de crecimiento específico para *Legionella pneumophila*, tal como el medio de crecimiento tamponado con carbón vegetal y extracto de levadura (BCYE). De hecho, no hay datos disponibles sobre la optimización de un medio estándar útil para el recuento preciso de *Legionella pneumophila*.

50 El documento WO 2009 121726 describe un método para detectar y hacer el recuento de microorganismos viables de *Legionella pneumophila* en una muestra poniendo en contacto los microorganismos con al menos un compuesto de reparación y un medio de crecimiento seguido de las etapas de incubación y detección y cuantificación de microorganismos viables. El compuesto de reparación causa directa o indirectamente un efecto sobre el metabolismo para reducir el estrés oxidativo del microorganismo. Existen sugerencias de compuestos de reparación
55 incluyendo piruvato y ácido glicólico. El método proporciona un medio excelente para hacer el recuento de *Legionella*

pneumophila viable de forma más precisa en un lapso de tiempo más corto que los métodos anteriores.

Sin embargo, sería deseable proporcionar un método mejorado para hacer el recuento viable de *Legionella pneumophila* incluso de forma más precisa e incluso de forma más rápida. Además, también podría ser deseable conseguir esto a través de un espectro más amplio de cepas de *Legionella pneumophila*.

5 Por lo tanto de acuerdo con la presente invención los inventores proporcionan un método para detectar y hacer un recuento de microorganismos viables en una muestra de la que se sospecha que contiene dichos microorganismos, en el que la muestra se obtiene a partir de cualquiera del grupo seleccionado entre aguas de refrigeración industrial, aguas potables, y aguas naturales, que comprende

10 (1) Poner en contacto dichos microorganismos de dicha muestra con compuestos de reparación y un medio de crecimiento,

(2) Incubar el producto de las etapas (1), y

(3) Detectar y cuantificar dichos microorganismos viables,

en el que los microorganismos son de la especie *Legionella pneumophila*, y en el que los compuestos de reparación comprenden

15 (a) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de serina;

(b) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de treonina;

(c) un compuesto que contiene iones de calcio a una dosis de 10^{-6} a 10^{-2} mM;

(d) un compuesto que contiene iones de magnesio a una dosis de 10^{-6} a 10^{-2} mM;

(e) un compuesto que contiene iones de potasio.

20 (f) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de ácido glutámico o una sal del mismo,

y

(g) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de ácido pirúvico o sal del mismo.

25 Los inventores han encontrado que el uso de estos compuestos en conjunto con compuestos de reparación en el presente método reduce de forma significativa el periodo de latencia de los micro organismos de *Legionella pneumophila*. De hecho. Los inventores han encontrado que esto se consigue a través de un amplio espectro de cepas de *Legionella pneumophila*.

30 Sin quedar limitado a la teoría, se cree que la combinación de piruvato, glutamato y las concentraciones específicas de calcio e iones de magnesio que provocan un efecto beneficioso en la eliminación o en la reducción del estrés oxidativo directa o indirectamente y se cree que los iones de potasio disminuyen el shock osmótico mientras que la serina y la treonina aumentan el metabolismo. Se cree que esta combinación especial de compuestos de reparación proporciona una mejora sinérgica de la eliminación o reducción del estrés oxidativo, una disminución del shock osmótico y un aumento del metabolismo consiguiendo de ese modo los objetivos de la presente invención.

En la invención la dosis deseada de serina o treonina está entre un 0,1 % y un 1 % basándose en el peso del compuesto de reparación por volumen de muestra.

35 El ácido glutámico (o sal del mismo) y/o ácido pirúvico (o sal del mismo) se usan a una dosis deseada entre un 0,1 % y un 1 % basándose en el peso del compuesto de reparación por volumen de muestra.

40 Cada uno de los compuestos que contienen los iones de calcio, iones de magnesio o iones de potasio puede ser cualquier sal adecuada. De forma deseable estos deberían ser solubles en agua al menos lo suficiente como para permitir la dosis requerida. Las sales pueden tener cualquier contraión adecuada. En cualquier caso, el experto en la materia podría observar que los contraiones no deberían ser toxinas conocidas para microorganismos tales como *Legionella pneumophila*. Por lo general, los contraiones incluirán, pero no se limitarán, cloruro, sulfato, nitrato, etc.

Como se ha indicado anteriormente, cuando el compuesto contiene iones de calcio, éste se debería usar a una dosis de 10^{-6} mM a 10^{-2} mM, preferentemente éste debería estar dentro del intervalo de 10^{-5} mM a 10^{-3} mM, más

preferentemente de 5×10^{-4} mM a 5×10^{-3} mM, especialmente aproximadamente 10^{-4} mM. Con respecto a un compuesto que contiene iones de magnesio, como se ha indicado anteriormente, la dosis debería ser de 10^{-6} mM a 10^{-2} mM, preferentemente ésta debería estar en el intervalo de 10^{-5} mM a 10^{-3} mM, más preferentemente de 5×10^{-4} mM a 5×10^{-3} mM, especialmente aproximadamente 10^{-4} mM.

- 5 De forma deseable, el compuesto de reparación que contiene iones de potasio se debería usar a una dosis que puede ser de 1 mM a 10^{-4} mM, por ejemplo entre 10^{-1} mM y 10^{-3} mM, más preferentemente entre 5×10^{-1} mM y 5×10^{-2} mM, especialmente aproximadamente 10^{-2} mM.

10 Los compuestos de reparación se usan en conjunto, lo que significa que se pueden usar de forma simultánea o de forma secuencial. Por forma secuencial los inventores hacen referencia a añadir cada compuesto sustancialmente uno detrás del otro. Por forma simultánea, los inventores hacen referencia a añadir esos dos o más compuestos de reparación a la muestra al mismo tiempo. También puede ser deseable combinar los dos o más dos compuestos de reparación en una formulación y de ese modo anular las adiciones separadas de los compuestos de reparación.

15 Los inventores creen que los compuestos de reparación que contienen piruvato, glutamato, calcio y magnesio actúan directa o indirectamente en el metabolismo del microorganismo en un modo tal que reduce el estrés oxidativo del microorganismo. De este modo, los inventores creen que los compuestos de reparación que contienen piruvato, glutamato, calcio magnesio actúan de forma endógena en el microorganismo.

Por estrés oxidativo los inventores hacen referencia a un desequilibrio entre la concentración de ROS (producción endógena o aducción exógena) y la capacidad de los microorganismos para purificar fácilmente los compuestos intermedios reactivos o para preparar de forma eficaz el daño resultante.

- 20 Una alteración de este tipo de los procesos metabólicos normales del microorganismo puede producir efectos tóxicos debidos a la formación de radicales libres y agentes oxidantes, tales como peróxidos, que pueden conducir al daño a los componentes de las células de los microorganismos, por ejemplo ADN, proteínas y lípidos.

Producir un efecto en el metabolismo del microorganismo hace referencia a desencadenar cambios en los procesos químicos internos naturales dentro de la célula del microorganismo.

- 25 La referencia a de forma endógena significa que se producen cambios dentro de la célula del microorganismo para reducir el estrés oxidativo. Estos podrían ser cambios, por ejemplo, en dos procesos metabólicos dentro del microorganismo. También pueden incluir la eliminación de ROS dentro de la célula del microorganismo.

30 Además, se cree que el piruvato, glutamato, iones de calcio e iones de magnesio pueden inhibir directa o indirectamente la formación de y/o degradan las ROS. Un compuesto de este tipo que ejerce un efecto indirecto en las ROS puede hacer esto interfiriendo con el metabolismo del microorganismo. Se puede contemplar que una combinación de compuestos de reparación de este tipo reduce indirectamente las ROS por vía endógena, por ejemplo durante la respiración aerobia.

35 Los compuestos de potasio ayudan a reducir el shock osmótico. Por shock osmótico los inventores hacen referencia al desequilibrio de la concentración de soluto entre el entorno que rodea a una célula y el interior de la célula. Este desequilibrio produce un cambio rápido en el movimiento del agua a través de la membrana celular y podría conducir a daño celular. Las células lesionadas o las células alteradas son mucho más sensibles al estrés osmótico y podrían perder la viabilidad debido a este tipo de estrés.

40 Se cree que la serina y la treonina modifican el metabolismo del microorganismo. Con esto los inventores hacen referencia a que la serina y la treonina están implicadas en una ruta metabólica que se cree que induce directa o indirectamente un aumento de la tasa metabólica en células que tienen un metabolismo limitado o reducido. Usando estas dos moléculas, las células fueron capaces de presentar un aumento del crecimiento.

45 De forma deseable, la combinación de compuestos de reparación mencionada anteriormente de acuerdo con la presente invención aumenta de forma sinérgica la combinación de ROS reductoras o de eliminación, reduciendo el shock osmótico y aumentando el metabolismo. Esto es especialmente cierto para un espectro más amplio de cepas de *Legionella pneumophila* que el que era posible anteriormente.

50 Los inventores han encontrado que el presente método induce la reparación de células de *Legionella pneumophila* estresadas a través de un espectro más amplio de cepas de *Legionella pneumophila* y de este modo proporciona un recuento viable total más preciso. De forma inesperada los inventores también han encontrado que el método reduce adicionalmente la cantidad de tiempo de incubación necesario. En general los inventores encuentran que el método puede reducir el tiempo de incubación en muchas horas en algunos casos al menos uno o dos días.

De forma inesperada los inventores también han encontrado que el método de la invención puede provocar una

reducción de microorganismo de interferencia, es decir, los microorganismos que son distintos a *Legionella pneumophila*.

5 El método de la presente invención que de forma adecuada implica poner en contacto células estresadas del microorganismo *Legionella pneumophila* con una combinación de los compuestos de reparación de acuerdo con la presente invención de forma deseable inhibe la formación de y/o reduce y/o elimina las ROS y reduce el shock osmótico y mejora el metabolismo y esto tiende a inducir la reparación de las células estresadas.

10 El microorganismo *Legionella pneumophila* se puede poner directamente en contacto con el compuesto de reparación después de la recogida de la muestra. Por lo tanto, el recipiente en el que la muestra de agua, de la que se cree que contiene el microorganismo, se recoge ya puede contener los compuestos de reparación. Como alternativa una vez que se ha recogido una muestra de agua que contiene la *Legionella pneumophila*, ésta se puede diluir con compuestos de reparación que contienen agua de dilución con fines de análisis. En una alternativa adicional, la muestra, que opcionalmente se ha diluido, se puede poner en contacto con el medio de crecimiento que contiene los compuestos de reparación o los compuestos de reparación se pueden aplicar después de poner en contacto del microorganismo con el medio de crecimiento. Una vez que la muestra se ha recogido, puede ser deseable ponerla en almacenamiento hasta que sea conveniente realizar el método de acuerdo con la presente invención. Puede ser deseable incorporar todos los compuestos de reparación durante el almacenamiento.

Preferentemente, todos los compuestos de reparación usados en conjunto de acuerdo con la presente invención se deberían poner en contacto con los microorganismos durante la etapa de dilución o durante el almacenamiento de la muestra.

20 Una forma de la presente invención implica de forma deseable poner en contacto dicha muestra con un medio de reparación, preferentemente un medio de reparación no selectivo, que contiene dicho compuesto de reparación y a continuación poner esto en contacto con un medio de crecimiento, preferentemente un medio de crecimiento selectivo. Preferentemente el medio de reparación es un líquido y más preferentemente un caldo de cultivo. Cuando el medio de reparación es un líquido, éste se denomina de forma adecuada método de reparación líquido. Por lo general, en un método de reparación líquido, la muestra se introduce en primer lugar en un medio líquido que contiene la combinación de acuerdo con la presente invención. De forma ideal, el método de reparación líquido permite la reparación de las bacterias estresadas en un medio líquido no selectivo. Preferentemente, el método de reparación líquido usará un caldo de cultivo como medio líquido. En general el medio líquido que contiene los microorganismos *Legionella pneumophila* se transferirá a continuación a un medio de crecimiento. Los microorganismos estresados se podrían haber reparado antes de la transferencia al medio de crecimiento o se podrían reparar después del contacto con el medio de crecimiento. Más preferentemente el medio de crecimiento es un medio de crecimiento selectivo. Por lo general el medio líquido que contiene los microorganismos se sembrará en placas en una placa de medio de crecimiento selectivo tal como una placa de medio de crecimiento de agar selectivo.

35 En una forma preferente alternativa, la etapa (1) comprende poner en contacto dicha muestra con un medio de crecimiento, preferentemente un medio de crecimiento no selectivo que contiene dicha combinación de compuestos de reparación, y a continuación poner esto en contacto con un medio de reparación que también que contiene dicho compuesto de reparación. Preferentemente el medio de reparación es un medio de reparación no selectivo, más preferentemente un sólido, y de forma particularmente preferente un medio de crecimiento de agar selectivo. Cuando el medio de reparación es un sólido éste se podría denominar método de reparación sólido. Por lo general el método de reparación sólido implicará poner en contacto la muestra con un medio de crecimiento no selectivo que contiene la combinación de compuestos de reparación de acuerdo con la presente invención. Posteriormente esto se puede poner en contacto con un medio de crecimiento selectivo que contiene el compuesto de reparación o combinación de compuestos de reparación. En esta forma, los ingredientes selectivos y el compuesto o compuestos, lo que evita la formación, reduce o elimina las ROS, se difundirán a través del medio no selectivo. De forma deseable el medio de crecimiento no selectivo puede ser un medio de crecimiento de agar no selectivo. De forma adecuada, en esta forma, la muestra se puede sembrar en placas sobre cualquier agar no selectivo y a continuación un medio de crecimiento de agar selectivo que contiene el compuesto o compuestos que evitan la formación, reduce o elimina las ROS se reviste sobre el medio de crecimiento de agar no selectivo.

50 En una forma alternativa adicional, la muestra se puede aplicar a un medio de crecimiento selectivo que ya contiene la combinación de compuestos de reparación. Un medio de crecimiento selectivo de este tipo puede ser un medio de crecimiento de agar selectivo. La siembra en placas de la muestra se puede realizar como se ha descrito anteriormente.

55 En una forma alternativa adicional, la muestra se puede recoger del agua en forma de aerosol. Por lo general con el aerosol se puede localizar en una torre de refrigeración o acondicionador de aire. De forma deseable, el agua condensada del aerosol se puede recoger antes del ensayo de acuerdo con el método de la presente invención. En una forma preferente alternativa, la etapa (1) comprende poner en contacto dicha muestra de aerosol con un medio de reparación que contiene agua de dilución, preferentemente un medio de reparación no selectivo que contiene

dicha combinación de compuestos de reparación, y a continuación poner esto en contacto con un medio de crecimiento que también contiene dicha combinación de compuestos de reparación.

5 En todas las formas de la invención mencionadas anteriormente, en medio de crecimiento debería ser adecuado para el crecimiento de *Legionella pneumophila*. En la bibliografía se documentan algunos tipos de medio de crecimiento adecuados y son bien conocidos por la persona experta en la materia. Normalmente, el medio de crecimiento debería contener carbón activado y cisteína.

10 Es preferente que el medio de crecimiento selectivo sea un medio de crecimiento de agar selectivo y más preferentemente es un medio de crecimiento de agar tamponado con carbón vegetal y extracto de levadura (BCYE). El medio de crecimiento de BCYE se haría selectivo mediante la adición de suplemento de antibióticos. Un medio de crecimiento de BCYE altamente deseable con antibióticos se conoce como GVPC (Glicina, Vancomicina, Polimixina B, Cicloheximida).

15 El método de siembra en placas está documentado en la bibliografía y es bien conocido por la persona con experiencia en la materia. Por lo general, el método implicará la aplicación de una cantidad de estas muestras de agua sobre gel de agar que se ha colocado en una placa de Petri. Este se puede denominar método de placa de Petri o método de siembra en placas de agar. El objeto de la siembra en placas de agar es propagar una alícuota, por lo general de 100 µl de agua de la que sospecha que contiene el microorganismo, denominada suspensión bacteriana, en un medio sólido en una placa de Petri. Para propagar la suspensión bacteriana en la placa de agar se pueden usar perlas de vidrio o un raspador celular. Después de la propagación, la mayor parte de líquido es absorbido por el agar y una fina capa con bacterias permanece en la superficie del agar. Mediante la incubación, en la superficie del agar se desarrolla un crecimiento bacteriano en forma de colonias. La incubación se produce a una temperatura que se haga más adecuada para el microorganismo, que está bien documentada en la bibliografía y es bien conocida por la persona con experiencia en la materia. Por lo general, la temperatura estará entre 30 °C y 50 °C, por ejemplo aproximadamente 37 °C.

25 La combinación de compuestos de reparación se debería añadir en una cantidad eficaz para reducir el estrés oxidativo del microorganismo. Preferentemente esta será una cantidad eficaz para reducir o eliminar de forma sustancial las ROS en la célula del microorganismo.

30 De hecho, los inventores han encontrado que el uso de una combinación de compuestos de reparación provoca una reducción significativa del desfase de tiempo durante el desarrollo de la *Legionella pneumophila*, en particular en un medio líquido. Una reducción del desfase en medio líquido de este tipo da como resultado una reducción del tiempo necesario para obtener una colonia visible en placas de agar.

35 También puede ser deseable incluir un cetóácido y/o una enzima neutralizante de oxígeno reducido con el medio de reparación y/o medio de crecimiento. Un cetóácido y/o una enzima neutralizante de oxígeno reducido no se consideran un compuesto de reparación de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, puede ser beneficioso incluir uno o ambos de estos compuestos con cualquiera de las combinaciones de compuestos de reparación mencionadas anteriormente.

La detección y la cuantificación de los microorganismos viables se pueden realizar mediante cualquier técnica conocida que esté documentada en la bibliografía. Por lo general esto hará referencia al recuento de las colonias visibles de la superficie del medio de crecimiento, tal como placa de agar con nutrientes.

40 El método de acuerdo con la presente invención facilita la determinación cuantitativa precisa para la existencia de *Legionella pneumophila*. Además, el tiempo de incubación se puede reducir de forma significativa. El método es adecuado para detectar *Legionella pneumophila* en muestras obtenidas a partir de cualquiera del grupo seleccionado entre aguas de refrigeración industrial, aguas potables, y aguas naturales.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

45 Selección de compuestos y determinación de sus concentraciones óptimas

50 Para medir los efectos de diferentes compuestos, se comparan 2 criterios: la latencia y la tasa de crecimiento se observan con el medio de cultivo y el cultivo sin suplementar con medio suplementado. Por cuestiones de simplicidad, la latencia se calcula como el tiempo necesario para obtener una densidad óptica de 0,1 a 600 nm. Para todos los compuestos sometidos a ensayo, el aumento de latencia (indicado por GT) se obtiene mediante la diferencia entre las latencias obtenidas en el medio de referencia (YEC) y las obtenidas en el medio suplementado. En las mismas condiciones, la proporción de la tasa de crecimiento (indicada como RVC) se define como la proporción entre la tasa de crecimiento obtenida en el medio de referencia y la obtenida en el medio suplementado

ES 2 646 413 T3

(YEC + X). En el medio de referencia (YEC), las cepas de *L. pneumophila* tienen un desfase de tiempo entre 5 h y 15 h y requieren aproximadamente 10 horas para alcanzar una densidad óptica (indicada como DO) entre 0,1 y 0,3.

5 Cuando se usa serina o treonina como los compuestos de reparación en cada caso, se observan mejoras en la latencia y/o tasa de crecimiento para una diversidad de cepas de *Legionella pneumophila*. Las mejoras se observan en un intervalo de dosis, por ejemplo entre un 0,01 % y un 5 % basándose en el peso del compuesto por volumen de muestra con la dosis óptima siendo aproximadamente 1 g por litro.

Se observan mejoras en la latencia y/o tasa de crecimiento para numerosas cepas de *Legionella pneumophila* cuando se usa cloruro cálcico o cloruro de magnesio a dosis entre 10^{-6} mM y 10^{-2} mM, especialmente 10^{-4} mM.

10 Se observan mejoras en la latencia y/o tasa de crecimiento para un número de cepas de *Legionella pneumophila* cuando se usa cloruro potásico a dosis entre 1 mM y 10^{-4} mM, en especial aproximadamente 10^{-2} mM.

Las combinaciones particularmente eficaces de los compuestos de reparación incluyen:

Combinación A

1 g por litro de piruvato, 1 g por litro de serina, 1 g por litro de treonina, 1 g por litro de ácido glutámico, cloruro cálcico 10^{-4} mM, cloruro de magnesio 10^{-4} mM.

15 Combinación B

1,5 g por litro de piruvato, 1,5 g por litro de serina, 1,5 g por litro de treonina, 1 g por litro de ácido glutámico, cloruro cálcico 10^{-4} mM y cloruro de magnesio 10^{-4} mM.

Combinación C

20 2 g por litro de piruvato, 2,5 g por litro de serina, 1 g por litro de treonina, 1 g por litro de ácido glutámico, cloruro cálcico 10^{-4} mM, cloruro de magnesio 10^{-4} mM y cloruro potásico $1,16 \times 10^{-2}$ mM.

Los resultados mostrarán que varias combinaciones son beneficiosas para el crecimiento en especial en medio líquido que contiene diferentes cepas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y hacer el recuento de microorganismos viables en una muestra de la que se sospecha que contiene dichos microorganismos, en el que la muestra se obtiene a partir de cualquiera del grupo seleccionado entre aguas de refrigeración industrial, aguas potables, y aguas naturales, que comprende
- 5 (1) Poner en contacto dichos microorganismos de dicha muestra con compuestos de reparación y un medio de crecimiento,
- (2) Incubar el producto de las etapas (1), y
- (3) Detectar y cuantificar dichos microorganismos viables,
- 10 en el que los microorganismos son de la especie *Legionella pneumophila*, y en el que los compuestos de reparación comprenden
- (a) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de serina;
- (b) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de treonina;
- (c) un compuesto que contiene iones de calcio a una dosis de 10^{-6} a 10^{-2} mM;
- (d) un compuesto que contiene iones de magnesio a una dosis de 10^{-6} a 10^{-2} mM;
- 15 (e) un compuesto que contiene iones de potasio.
- (f) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de ácido glutámico o una sal del mismo;
- y
- (g) de un 0,1 a un 1 % en peso/volumen de ácido pirúvico o sal del mismo.
- 20 2. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la etapa (1) comprende poner en contacto dicha muestra con un medio de reparación, preferentemente un medio de reparación no selectivo, que contiene dicho compuesto de reparación y a continuación poner esto en contacto con un medio de crecimiento, preferentemente un medio de crecimiento selectivo.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el medio de reparación es un líquido, preferentemente un caldo de cultivo.
- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la etapa (1) comprende poner en contacto dicha muestra con un medio de crecimiento, preferentemente un medio de crecimiento no selectivo, y a continuación poner esto en contacto con un medio de reparación que contiene dicho compuesto de reparación.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el medio de reparación es un medio de reparación selectivo, preferentemente un sólido, y más preferentemente un medio de crecimiento de agar selectivo.
- 30 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la etapa (1) comprende poner en contacto dicha muestra con un medio de crecimiento que contiene dicho compuesto de reparación.
7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el medio de crecimiento es un medio tamponado con carbón vegetal y extracto de levadura (BCYE) o medio de crecimiento de agar GVPC.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el medio de reparación y/o el medio de crecimiento incluye un cetoácido y/o una enzima neutralizante de oxígeno reducido.
- 35