

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 592**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2015** E 15382680 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019** EP 3187595

54 Título: **Método para la detección de cepas de Legionella spp. en muestras ambientales basadas en la amplificación isotérmica mediada por bucle (lamp), reactivo de detección y conjunto de cebadores**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.10.2019**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN GAIKER (100.0%)  
Parque Tecnológico, Edificio 202  
48170 Zamudio, Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**VERDOY BERASTEGUI, DOLORES y  
OLABARRIA DE PABLO, GARBIÑE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 727 592 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

Método para la detección de cepas de *Legionella* spp. en muestras ambientales basadas en la amplificación isotérmica mediada por bucle (lamp), reactivo de detección y conjunto de cebadores

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés *loop-mediated isothermal amplification*) diseñado para amplificar de manera específica secuencias del gen de ARN ribosómico (ARNr) 16S de *Legionella* usando un conjunto de cebadores de LAMP diseñados especialmente, a un reactivo de detección para detectar de manera específica las secuencias del gen de ARNr 16S de *Legionella*, a un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*.

10

**Antecedentes de la invención**

Los brotes epidémicos de *Legionella* tienen una gran importancia sanitaria, económica y social, con casos anuales de individuos gravemente infectados y fallecimientos. Por lo tanto, los sectores industriales implicados y la Administración, están desplegando un gran esfuerzo con el objetivo de reforzar las medidas de prevención, así como el control de la contaminación ambiental de *Legionella*.

20

La enfermedad de los legionarios es una forma de neumonía causada por la bacteria *Legionella pneumophila* y bacterias relacionadas. Una forma menos grave de la enfermedad es una infección respiratoria llamada fiebre de Pontiac. La enfermedad de los legionarios normalmente se contrae por inhalación de gotas minúsculas de agua (aerosoles), contaminadas con *Legionella*. Sin embargo, la mayoría de las personas expuestas a *Legionella* no llegan a enfermar y no se ha documentado la propagación de la enfermedad de persona a persona. Algunas personas están en mayor riesgo de contraer la enfermedad de los legionarios, por ejemplo, las de más de 45 años, los fumadores, las personas que beben mucho alcohol, las personas que padecen de enfermedad respiratoria o renal crónica y las personas con inmunosupresión. La enfermedad de los legionarios no solo afecta al público en general, por ejemplo, los viajeros que se hospedan en hoteles, sino también a los trabajadores, especialmente a los técnicos de mantenimiento de aire acondicionado o de sistemas de suministro de agua. Hay evidencias de que los trabajadores en lugares en los que están presentes las máquinas, los odontólogos, los trabajadores en instalaciones de petróleo y gas en alta mar, los soldadores, lavadores de vehículos, los mineros, el personal sanitario, los trabajadores en plantas de tratamiento de aguas residuales industriales y otras áreas industriales diferentes que implican flujos de aguas en sus procesos industriales, por ejemplo, fábricas de pasta y de papel, que también pueden estar expuestos a *Legionella*. Los sistemas de riesgo para la exposición a *Legionella* incluyen: sistemas de agua que incorporan una torre de refrigeración, sistemas de agua que incorporan un condensador evaporativo, sistemas de agua caliente y fría, piscinas de spa (también conocidas como baños de hidromasaje, jacuzzis y baños de spa), humidificadores y sistemas de nebulización de agua, flujos de agua para sillones de odontología, estanques de aireación en plantas de tratamiento biológico y en plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, máquinas de lavado con agua a alta presión, otras plantas y sistemas que contienen agua que probablemente exceda los 20 °C de temperatura y que se pueda liberar en pulverizador o aerosol.

25

30

35

40

Los riesgos de exposición a *Legionella* normalmente se controlan mediante medidas que evitan la proliferación de las bacterias en el sistema, y reduciendo la exposición a gotas de agua y a aerosoles. Las precauciones incluyen: controlar la liberación de los pulverizadores de agua; evitar temperaturas de agua entre 20 °C y 45 °C; evitar el estancamiento de agua que puede fomentar el crecimiento de la biopelícula; evitar el uso de materiales que albergan bacterias y otros microorganismos o proporcionar nutrientes para el crecimiento microbiano; mantener la limpieza del sistema y del agua en él. Como último recurso, el personal de mantenimiento puede necesitar usar equipos de protección del personal (tales como mascarillas de protección respiratoria).

45

50

Los métodos oficiales para la detección de *Legionella* se basan en el crecimiento del microorganismo en medios selectivos, se basa en el criterio de la ISO 11731. Se requieren al menos de 7 a 15 días para obtener resultados debido a la baja tasa de crecimiento de la bacteria. La detección del cultivo también presenta una baja sensibilidad, pérdida de la viabilidad de las bacterias tras la recolección, dificultad en el aislamiento de *Legionella* en muestras contaminadas con otros microbios y la incapacidad para detectar bacterias viables no cultivables. Este lapso de tiempo en el ensayo se considera excesivo y costoso por el sector de mantenimiento industrial.

55

Por lo tanto, el desarrollo de un método de detección rápido y específico para el control en tiempo real de las cepas infecciosas de *Legionella* sería crucial para la prevención eficaz de la legionelosis. Los métodos de inmunodetección y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han descrito como herramientas útiles para la detección de *L. pneumophila*. De hecho, la legislación está abierta al uso de otros métodos de detección como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

60

Con el fin de aumentar la eficacia y la efectividad del coste de las tareas de prevención y control frente a *Legionella*, existe una clara demanda de sistemas de detección rápidos, portátiles y fáciles de usar; que permitirán la rápida implementación de medidas correctoras, en las primeras señales de presencia de esta bacteria. Además, estos

65

sistemas más inteligentes brindarán la oportunidad de realizar la vigilancia *in situ* del tratamiento con biocidas, permitiendo de este modo que la variación de la dosificación y del compuesto biocida elimine el foco de un posible brote epidémico.

- 5 Básicamente, existen tres niveles de alarma para *Legionella* que se tienen que evaluar mediante el servicio de mantenimiento. Un nivel de alarma de riesgo: cuando el recuento de bacterias es > 10.000 (unidades formadoras de colonias (UFC)/1000 ml); un nivel requerido de operaciones de control: cuando el recuento de bacterias es 1.000 (UFC/1000 ml); y un nivel de seguimiento: cuando el recuento de bacterias es 100 (UFC/1000 ml).
- 10 En los últimos años se han desarrollado diferentes soluciones rápidas para la detección de *Legionella*. Entre ellas, los sistemas de PCR, que tienen en cuenta el límite de detección y la rapidez, son los más prometedores.

Sin embargo, aún tiene un número de problemas no resueltos de manera apropiada.

- 15 El cultivo convencional ISO 11731 administra casi el 60 % de falsos negativos (Díaz-Flores A, Montero JC, Castro FJ, *et al.* Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. BMC Microbiology. 2015; 15:91. doi:10.1186/s12866-015-0423-7), principalmente debido a la no detección de viables no cultivables; el umbral alto de nivel de detección; la inhibición del crecimiento de *Legionella* en muestras (microbiológicas) altamente contaminadas; la inhibición del crecimiento de *Legionella* en sistemas de agua con alto contenido de dispersantes y
- 20 metales traza. Por otro lado, los ensayos genéticos rápidos actuales no distinguen entre células de *Legionella* muertas viables y no viables y administran menos del 10 % de falsos positivos (Díaz-Flores A, Montero JC, Castro FJ, *et al.* Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. BMC Microbiology. 2015;15:91.doi:10.1186/s12866-015-0423-7). En ambos casos se requiere personal especializado y un laboratorio de microbiología, y en el caso de los ensayos genéticos se requiere un laboratorio molecular adicional equipado.

- 25 Por otro lado, puede haber discrepancias entre los resultados de PCR y del cultivo; que se pueden explicar por varios factores. El crecimiento de *Legionella* se puede inhibir o enmascarar por el sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes. Además, *L. pneumophila* llega a ser no cultivable en biopelículas en dosis de 1 mg/l de monoclóramina, lo que hace ineficaz la detección de este patógeno en el cultivo. La eficacia de los
- 30 tratamientos sobre *Legionella pneumophila* (cloro, calor, ozono, UV, monoclóramina) se ha evaluado principalmente basándose simplemente en la cultivabilidad y eso no podría ser un indicativo real de la ausencia de células viables intactas. *L. pneumophila* puede entrar en estado viable pero no cultivable (VPNC), del cual se puede recuperar tras el paso en amebas. Estas legionelas VPNC se pueden detectar mediante PCR, junto con las bacterias muertas, lo que posiblemente explica, al menos en parte, por qué los valores de PCR son normalmente mayores que los
- 35 obtenidos mediante el cultivo.

- Otros métodos rápidos alternativos son los basados en la inmunodetección, que han proporcionado la base para el desarrollo de poderosas herramientas analíticas para un amplio rango de dianas. Durante los últimos años, el número de publicaciones en este campo ha aumentado de manera significativa. De manera tradicional, el método
- 40 más común aplicado para la detección de microorganismos ha sido el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El principal inconveniente del ELISA es el elevado límite de detección generado; que a menudo está entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml. Este límite se puede mejorar a  $10^3$  y  $10^4$  células/ml usando métodos de detección más sensibles. La inmovilización de anticuerpos en la superficie de perlas magnéticas para obtener perlas inmunomagnéticas (PIM) ha promovido el desarrollo de la separación inmunomagnética (SIM). De este modo, la SIM proporciona un método
- 45 simple pero poderoso para la captura, la recuperación y la concentración específica del microorganismo deseado a partir de una suspensión heterogénea de bacterias, sin embargo, aún en el límite del límite de detección requerido para muestras ambientales; y mayor que los basados en procedimientos moleculares.

- La mayoría de los ensayos comercialmente disponibles se basan en la tecnología molecular, que usa biomarcadores de *Legionella*. El procedimiento se basa en el reconocimiento de secuencias específicas del ADN de la bacteria, su
- 50 amplificación mediante ciclos de temperatura de 60 °C-72 °C; y la posterior lectura óptica de señales de fluorescencia, mediante un equipo óptico sofisticado no portátil. Sin embargo, estos kits están dirigidos para su uso en laboratorios moleculares y para su manejo por personal cualificado.

- Más recientemente, han aparecido en el mercado nuevas soluciones portátiles basadas en tecnologías de la inmunodetección. Por ejemplo, Hydrosense™, dirigido al sector del mantenimiento, se basa en la tecnología de la
- 55 inmunodetección. Sus principales inconvenientes son: solo detecta 1 del total de 15 serogrupos de *Legionella pneumophila*; no detecta los otros 18 grupos de *Legionella* no neumofílicos que son dañinos para los seres humanos; y no distingue entre células vivas y muertas. Legipid® también se basa en la inmunodetección, pero es muy complejo de manejar *in situ* y, por lo tanto, no es intuitivo. Además, el sistema solo detecta *Legionella pneumophila*, dejando sin control a las otras 18 cepas de *Legionella* no neumofílicas, que son virulentas y dañinas. Este sistema es, sin embargo, capaz de distinguir entre células vivas y muertas.
- 60

- Por consiguiente, a la vista de lo anterior, aún existe la necesidad en la materia de proporcionar un nuevo método
- 65 simple, rápido e intuitivo para la detección de *Legionella* spp. en muestras ambientales que sea capaz de distinguir entre células vivas y muertas y que detecte tantas cepas infecciosas de *Legionella* como sea posible con un elevado

nivel de sensibilidad y de especificidad.

**Sumario de la invención**

5 El problema a resolver mediante la presente invención es, proporcionar un método simple, rápido e intuitivo para la detección de *Legionella* spp. infecciosa en muestras ambientales que sea capaz de distinguir entre células vivas y muertas y que detecte tantas cepas de *Legionella* como sea posible con un elevado nivel de sensibilidad, precisión y especificidad.

10 La solución se basa en que los presentes inventores han identificado que mediante la amplificación de manera específica de secuencias del gen de ARNr 16S de *Legionella* a una temperatura constante con una mezcla específica de soluciones de reactivos, que comprende un conjunto de cebadores LAMP diseñados de manera especial, era posible distinguir entre células vivas y muertas y detectar de manera específica 38 cepas de *Legionella* entre 18 serogrupos, a un umbral de sensibilidad y especificidad de 5-100 equivalentes genómicos hasta al menos  
15 100 unidades formadoras de colonias de *Legionella*, con un manejo simple, rápido e intuitivo.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de cepas de *Legionella* spp. en una muestra ambiental basándose en la amplificación isotérmica mediada por bucle caracterizado por que comprende las etapas de:

- 20 (a) recogida de la muestra;
- (b) extracción de material genético de la muestra con un reactivo de extracción que comprende al menos reactivos de lisis celular y una solución de soporte magnetizable;
- 25 (c) elución del material genético desde el soporte magnetizable y retrotranscripción isotérmica de ARN y amplificación de ADNc con un reactivo de detección que comprende al menos soluciones de elución, retrotranscriptasa, amplificación y lectura, en donde la solución de amplificación comprende un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*; y
- 30 (d) lectura del resultado, en donde el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* en la etapa (c) comprende al menos: un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1; un cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2; un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3; un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4; un cebador inverso B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5; un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6; un cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.

40 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un reactivo de detección para detectar de manera específica las secuencias del gen de ARNr 16S de *Legionella*, caracterizado por que comprende al menos soluciones de elución, retrotranscriptasa, amplificación y lectura, en donde la solución de amplificación comprende un conjunto de cebadores LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*, y en donde el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* comprende al menos: un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1; un  
45 cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2; un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3; un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4; un cebador inverso B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5; un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6; un  
50 cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.

55 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*, caracterizado por que comprende al menos: un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1; un cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2; un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3; un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4; un cebador inverso B2 que  
60 comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5; un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6; un cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.

65 El método para la detección de *Legionella* de acuerdo con la invención es una técnica molecular que tiene las ventajas de ser simple y rápido debido a la simplificación de las etapas de concentraciones mediante el uso de

medios magnéticos para capturar al analito, evitando de este modo las etapas de remoción y los compuestos inhibidores que podrían darse en las muestras ambientales. Además, permite la simplificación del procedimiento de calentamiento, dado que se lleva a cabo a una única temperatura sin el requerimiento de ciclos de temperatura. Además, el método es capaz de distinguir entre células vivas y muertas, dado que la detección se basa en biomarcadores de ARN asociados al metabolismo de las células vivas, en lugar de los biomarcadores comunes de ADN tanto en células vivas como muertas. Además, la lectura de los resultados se simplifica, debido a la implementación en el procedimiento de fluoróforos que se pueden detectar a simple vista, sin requerir medios sofisticados de lectura óptica.

Las ventajas anteriores y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la descripción detallada a continuación de las realizaciones preferidas proporcionadas solo a modo de ejemplos ilustrativos y no limitantes.

### Dibujos

FIG. 1: Secuencia de nucleótidos del gen de ARN ribosómico 16S de *Legionella pneumophila* subsp. Philadelphia 1, Secuencia de Referencia del NCBI: NR\_074231.1>gi|444303809|ref|NR\_074231.1|.

FIG. 2: Secuencia de nucleótidos del conjunto de cebadores de LAMP para amplificar las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*.

FIG. 3: a un conjunto de cebadores de bucle para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*.

FIG. 4: Resultados de especificidad del método de LAMP descrito. El ensayo se realizó con muestras de genoma, se calibró con el conjunto de cebadores especificado por la presente invención; los resultados muestran los datos obtenidos del ciclo de cuantificación (Cq) o el tiempo en minutos en el que la emisión de fluorescencia llega a ser exponencial.

FIG. 5: Resultados de especificidad del método de LAMP descrito. El ensayo se realizó con muestras de genoma, se calibró con un conjunto comparativo de cebadores especificado por la presente invención; los resultados muestran los datos obtenidos del ciclo de cuantificación (Cq) o el tiempo en minutos en el que la emisión de fluorescencia llega a ser exponencial. A continuación, la emisión de fluorescencia de cada uno de los tubos de reacción, en el momento final del ensayo.

### Descripción detallada de la invención

#### *Método para la detección de Legionella spp. en una muestra ambiental*

#### (a) Recogida de la muestra

Prácticamente todas las muestras ambientales conocidas de diferentes instalaciones se pueden analizar mediante el método de acuerdo con la invención.

#### (b) Extracción del material genético de la muestra con un reactivo de extracción que comprende reactivos de lisis celular y una solución de soporte magnetizable

En una realización de la invención, el reactivo de extracción de acuerdo con la invención comprende al menos una enzima adecuada para la lisis bacteriana, al menos un tampón de lavado y al menos un agente quelante.

En principio, se puede usar cualquier enzima capaz de la lisis celular. Las enzimas adecuadas de acuerdo con la invención comprenden, pero no se limitan a: glucósido hidrolasas, proteinasa K, muramidasa, lisozima. En una realización preferida de la invención se usa una glucósido hidrolasa de amplio espectro.

En una realización preferida, la al menos una enzima capaz de la lisis celular está comprendida en una cantidad de entre 5 a 40 mg/ml.

Los tampones de lavado adecuados de acuerdo con la invención comprenden pero no se limitan a tampones de Tris-HCl.

En una realización preferida, el tampón de lavado está comprendido a una concentración de entre 5 a 20 mM y con un pH de 5,5 a 8,5.

Los ejemplos de los agentes quelantes más preferidos de acuerdo con la invención son: DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético; ácido dietilenotriamino-N,N,N',N'-pentaacético; ácido pentético; N,N-Bis(2-(bis(carboximetil)amino)etil)-glicina; ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido [[(carboximetil)imino]bis(etilenonitrilo)]-

5 tetra-acético; EDTA(ácido edético; ácido etilendinitrilotetraacético; EDTA, base libre; ácido libre EDTA; ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético; Hampeno; Verseno; N,N'-1,2-Etanodiilbis-(N-(carboximetil)glicina); ácido etilendiamino tetraacético; NTA(N,N-bis(carboximetil)glicina; ácido triglucolámico; Trilona A; ácido alfa,alfa',alfa"-trimetilaminotricarboxílico; Tri(carboximetil)amina; ácido aminotriacético; ácido Hampshire NTA; ácido nitrilo-2,2',2"-triacético; Titriplex i; ácido nitrilotriacético.

En una realización preferida, el agente quelante está comprendido a una concentración de entre 0,1 mM a 10 mM.

10 Después de que las células de *Legionella* spp. se rompen, los ácidos nucleicos se liberan y se capturan mediante la solución de soporte magnetizable presente en el reactivo de extracción. Los ácidos nucleicos se retienen en la superficie de dicho soporte magnetizable y, por lo tanto, se separa de los otros restos celulares y lípidos residuales.

En consecuencia, en principio, se puede usar cualquier soporte magnetizable capaz de atrapar ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

15 En una realización, el soporte magnetizable comprende microperlas magnéticas.

20 En una realización preferida, el reactivo de extracción en la etapa (b) comprende: de 5 a 40 mg/ml de al menos una glucósido hidrolasa de amplio espectro, un tampón de lavado que comprende al menos Tris-HCl a una concentración de entre 5 a 20 mM y pH de 5,5 a 8,5, y al menos un agente quelante a una concentración de entre 0,1 mM a 10 mM.

25 (c) elución del material genético desde el soporte magnetizable y retrotranscripción isotérmica de ARN y amplificación de ADNc con un reactivo de detección que comprende al menos soluciones de elución, retrotranscriptasa, amplificación y lectura, en donde la solución de amplificación comprende un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*

30 El método para la detección de *Legionella* spp. de acuerdo con la presente invención se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Como consecuencia, de acuerdo con la invención, la amplificación isotérmica de las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* tiene lugar a una temperatura constante. Esto permite llevar a cabo el ensayo molecular a una única temperatura sin el requerimiento de ciclos de temperatura.

35 En una realización preferida del método según la invención, la retrotranscripción isotérmica del ARN y la amplificación del ADNc en la etapa (c) tiene lugar de manera simultánea en la misma cámara de reacción a una temperatura de entre 58 °C y 74 °C.

40 Otro logro del método de acuerdo con la presente invención es la mezcla de reactivos que permite llevar a cabo las etapas de retrotranscripción y amplificación de manera simultánea y en el mismo lugar, así como alcanzar un umbral de sensibilidad y especificidad de al menos 5-100 equivalentes genómicos para al menos 100 unidades formadoras de *Legionella* spp.

45 Las soluciones de elución adecuadas de acuerdo con la invención son las capaces de eluir el material genético a partir del soporte magnetizable. Los ejemplos comprenden, pero no se limitan a soluciones de proteína, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) y/o caseína, Tris hidroximetil aminometano (TRIS), dodecilsulfato sódico (SDS).

Las soluciones adecuadas de retrotranscriptasa de acuerdo con la invención son las que permiten la síntesis de ADN a partir de ARN mediante un proceso de transcripción inversa.

50 En una realización, las soluciones de retrotranscriptasa son un tampón de retrotranscriptasa que comprende al menos una retrotranscriptasa isotérmica y al menos un cofactor.

En una realización, la al menos una retrotranscriptasa isotérmica está comprendida en un intervalo de entre 2,0 y 4,5 unidades.

55 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el al menos un cofactor se selecciona del grupo que consiste en: MgSO<sub>4</sub>, acetato de 2-(trimetilazaniomilo) o mezclas de los mismos.

En una realización, el al menos un cofactor está comprendido a una concentración de entre 0,3 mM y 10 mM.

60 Las soluciones de amplificación adecuadas de acuerdo con la invención son las capaces de amplificar una única copia o unas pocas copias de una parte de ADN en varios órdenes de magnitud. En este caso ADNc, dado que se sintetizó a partir de un molde de ARN.

65 En una realización, la solución de amplificación comprende una mezcla de amplificación que comprende al menos una polimerasa isotérmica, una mezcla de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) y un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* spp.

En una realización, la polimerasa isotérmica está comprendida en un intervalo de 10 a 14 unidades, la mezcla de dNTP a una concentración de entre 1,0 a 2,3 mM y el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen del ARNr 16S de *Legionella* spp. en un promedio de entre 4.500 nM y 6.500 nM.

5 *Conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de Legionella spp.*

Los cebadores de LAMP específicos se han diseñado basándose en el gen de ARN ribosómico 16S de *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* cepa Philadelphia 1, Secuencia de Referencia del NCBI: NR\_074231.1>gij444303809|ref|NR\_074231.1| (FIG. 1). La estructura de los cebadores se diseñó teniendo en cuenta en la construcción de la secuencia, las que presentaban el mayor polimorfismo para la especie exclusiva; y al mismo tiempo, la mayor homología, para las cepas inclusivas. Por lo tanto, que reconoce tanto *Legionella pneumophila* como las cepas no neumófilas de *Legionella*.

Cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas en el presente documento o en el listado de secuencias adjunto se presenta usando las abreviaturas de letras convencionales para las bases de nucleótidos.

Se diseñó un mínimo de ocho cebadores basándose en un intervalo de entre 180 y 400 pares de bases:

Cebador directo interno F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1;

Cebador directo interno F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2;

Cebador directo interno F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3.

Cebador inverso interno B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4;

Cebador inverso interno B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5;

Cebador inverso interno B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6;

Cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7;

Cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.

La FIG. 2 muestra las secuencias de nucleótidos de los cebadores de LAMP de acuerdo con la invención.

Por consiguiente, en una realización del método de detección de acuerdo con la invención, el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* comprende al menos: un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1; un cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2; un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3; un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4; un cebador inverso B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5; un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6; un cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.

Con el fin de acelerar las reacciones moleculares se puede añadir otro par de "cebadores de bucle".

En consecuencia, en otra realización, el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* comprende adicionalmente un cebador de bucle directo que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO:9 y un cebador de bucle inverso que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO:10 (véase la FIG. 3).

A lo largo de la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos, la reacción produce altas cantidades de pirofosfato como subproducto de la reacción enzimática. Este pirofosfato reacciona con los iones de magnesio presentes en la mezcla de la reacción. Estos complejos se pueden teñir con diferentes fluoróforos específicos, en el espectro de

amplitud de frecuencia modulada (AFM), que pueden desarrollar un cambio de color en la mezcla de la reacción, que se puede detectar en el espectro visible al mismo tiempo en que la reacción tiene lugar. Por lo tanto, es posible una lectura directa de la reacción a simple vista.

- 5 En consecuencia, en una realización preferida de la invención, la solución de lectura comprende al menos un reactivo de lectura que comprende un fluoróforo de espectro de amplitud de frecuencia modulada (AFM).

Los fluoróforos de espectros de AFM adecuados de acuerdo con la invención comprenden, pero no se limitan a: calceína, azul de hidroxil naftol (HNB), 6-carboxifluoresceína, Alexa Fluor 488, Fluoresceína FITC.

- 10 En una realización, el al menos un reactivo de lectura está comprendido en una concentración de entre el 25 y el 75 % del volumen de la reacción.

- 15 En una realización todavía más preferida de la invención, el reactivo de detección que comprende la elución, la retrotranscriptasa, los tampones y/o reactivos de amplificación y lectura y los cofactores en la etapa (c) comprenden: de 2,0 a 4,5 unidades de retrotranscriptasa isotérmica, de 6,3 a 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y de 0,3 a 2,3 M de acetato de 2-(trimetilazaniomilo), de 1,0 a 2,3 mM de mezcla de dNTP y, en promedio, entre 4500 nM y 6500 nM de al menos ocho cebadores para amplificar las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*; de 10 a 14 unidades de polimerasa isotérmica, un fluoróforo de espectro de AFM en una concentración de entre el 25 y el 75 % del volumen de reacción, y del 25 al 65 %, con respecto al volumen total de la solución: Elución, retrotranscriptasa, amplificación y tampón de lectura, de agua apirogénica.

(d) Lectura del resultado

- 25 Tal como ya se ha mencionado anteriormente, el uso de una solución de lectura, en particular, de fluoróforos específicos, permite la lectura directa de la reacción a simple vista.

**Ejemplos**

- 30 Diseño y verificación del método para la detección de *Legionella* spp. de acuerdo con la invención

Se hizo un nuevo diseño e incluyó un estudio de simulación computacional (BioEdit v5.0.6) de la homología de las cepas; abarcó la amplificación isotérmica de 68 cepas bacterianas. 38 de 68, se consideran por la invención como cepas inclusivas de la diana (Tabla 1). Estas cepas están documentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como agentes responsables de los brotes epidémicos de la enfermedad de los legionarios ("*Legionella* and the prevention of legionellosis". Organización Mundial de la Salud, 2007). Estas cepas, que se corresponden con diferentes especies dentro del género *Legionella*, se reconocen por la invención como positivas, 30 de 68, deberían ser reconocidas por la invención como negativas, a pesar de su cercanía en ambientes similares.

- 40 Tabla 1: Especies inclusivas seleccionadas para el diseño de la amplificación isotérmica en silicio

	Especies inclusivas	Cepa	Serogrupo
1	<i>L. pneumophila</i>	Philadelphia 1	1
2	<i>L. pneumophila</i>	Knoxville-1	1
3	<i>L. pneumophila</i>	CA1	1
4	<i>L. pneumophila</i>	Alcoy	1
5	<i>L. pneumophila</i>	Cepa MDC1252	2
6	<i>L. pneumophila</i>	Cepa E5C1	3
7	<i>L. pneumophila</i>	Los Angeles-1	4
8	<i>L. pneumophila</i>	Los Angeles-1	4
9	<i>L. pneumophila</i>	Cepa U8W	5
10	<i>L. pneumophila</i>	Dallas - IE	5
11	<i>L. pneumophila</i>	JCM 7571	5
12	<i>L. pneumophila</i>	ATCC 33215	6
13	<i>L. pneumophila</i>	Cepa 4424	6

(continuación)

	Especies inclusivas	Cepa	Serogrupo
14	<i>L. pneumophila</i>	Cepa MDC1257	7
15	<i>L. pneumophila</i>		8
16	<i>L. pneumophila</i>	Cepa GgN7	8
17	<i>L. micdadei</i>	TATLOCK	
18	<i>L. dumoffii</i>	NY 23	
19	<i>L. dumoffii</i>	A1.4F	
20	<i>Legionella maceachernii</i>	ATCC 35300	
21	<i>Legionella maceachernii</i>	Cepa 4475	
22	<i>L. jordanis</i>	BL-540	
23	<i>L. erythra</i>	SE-32A-C8	
24	<i>L. tucsonensis</i>	1087-AZ-H	
25	<i>Legionella bozemanii</i>	WIGA	
26	<i>L. anisa</i>	30_T1_2007	
27	<i>L. anisa</i>	ucsc16	
28	<i>L. longbeachae</i>	Long-Beach-4	1
29	<i>L. longbeachae</i>	ATCC 33484	2
30	<i>L. wadsworthii</i>	NCTC 11532	
31	<i>L. hackeliae</i>	Lansing-2	
32	<i>L. sainthelensi</i>	NCTC 11988	
33	<i>L. feeleii</i>	WO-44C	
34	<i>L. birminghamensis</i>	NCTC 12437	
35	<i>L. cincinnatiensis</i>	NCTC 12438	
36	<i>L. lansingensis</i>	NCTC 12830	
37	<i>L. oakridgensis</i>	KFYY-2	
38	<i>L. parisiensis</i>	ATCC:700174	

Tabla 2: Especies exclusivas seleccionadas para el diseño de la amplificación isotérmica en silicio

	Especies exclusivas	Cepa
1	<i>Escherichia coli</i>	
2	<i>Enterococcus faecium</i>	Cepa Aus0004
3	<i>Clostridium perfringens</i>	Cepa 13
4	<i>Salmonella typhi</i>	
5	<i>Candida albicans</i>	
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepa DSM 50071
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	N315 cepa N315
8	<i>Proteus vulgaris</i>	KCCM:1153 9
9	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cepa 07PF0776

(continuación)

	Especies exclusivas	Cepa
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
11	<i>Serratia marcescens</i>	Cepa WW4
12	<i>Caulobacter</i> sp	Cepa K31
13	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
14	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cepa CCM 7232
15	<i>Bacillus subtilis</i>	BAB-1815
16	<i>Burkholderia cepacia</i>	GG4
17	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039
18	<i>Citrobacter koseri</i>	ATCC BAA-895
19	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KCTC 1686
20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf0-1
21	<i>Pseudomonas putida</i>	F1
22	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	phen8
23	<i>Ralstonia Pickettii</i>	12J
24	<i>Raoultella terrigena</i>	NBRC 14941
25	<i>Streptococcus pyrogenes</i>	M1 GAS
26	<i>Yersinia ruckeri</i>	
27	<i>Alcaligenes faecalis</i>	
28	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCTC 2190
29	<i>Flavobacterium</i> sp.	W1.09-205
30	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	R551-3

En relación con la estructura de los cebadores específicos, se hicieron 18 diseños diferentes, teniendo en cuenta en la construcción de la secuencia, las que presentaban el mayor polimorfismo para la especie exclusiva; y al mismo tiempo, la mayor homología, para las cepas inclusivas, que se identificaron como dianas entre las cepas del género de *Legionella*. Los datos se muestran en la Figura 11, los loci para los cebadores de especificidad están remarcados.

Los ensayos de inclusividad y exclusividad de los diferentes diseños de cebadores se realizaron siguiendo los criterios de AFNOR: "Validation protocol for commercial methods of detection and quantification of *Legionella* and *Legionella pneumophila* by concentration and gene amplification by polymerase chain reaction (PCR) No. NF148; 30 de octubre de 2013). Estos criterios se centran en la validación de procedimientos comerciales de PCR, para la detección de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila*.

Se optimizaron las condiciones de amplificación isotérmica, teniendo en cuenta los siguientes parámetros: la temperatura de la reacción, la concentración de los cofactores, la concentración de los cebadores, las mezclas enzimáticas y la longitud de onda de la emisión de fluorescencia. El control del ensayo se realizó mediante rt-PCR y mediante el análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel.

La Tabla 3 muestra las cepas ensayadas, para los ensayos de especificidad, que incluyen: diferentes serogrupos que pertenecen a *Legionella pneumophila*; así como, las cepas que pertenecen al género *Legionella*, pero que no son de la especie *pneumophila*. Y al final de la Tabla, las cepas definidas por el ensayo de exclusividad, que son de origen natural en el agua pero que no pertenecen a *Legionella* spp.

Tabla 3. Cepas seleccionadas para el ensayo de especificidad, que pertenecen a *Legionella* spp; y que no son de *Legionella* spp, que son cepas estrechamente relacionadas, en nichos ambientales acuáticos.

Especie	Serogrupo	Cepa	Resultado esperado
<i>L.pneumophila</i>	1	DMS 7513 <i>Philadelphia-1</i>	Positiva
<i>L.pneumophila</i>	1	DMS 25199 Benidorm	Positiva
<i>L.pneumophila</i>	3	DMS 2540	Positiva
<i>L.pneumophila</i>	6	DMS25182	Positiva
<i>L.pneumophila</i>	2	DMS25038	Positiva
<i>L.pneumophila</i>	4	DMS7514	Positiva
<i>L.pneumophila</i>	5	DMS24991	Positiva
<i>L. micdadei</i>		CCUG31229AT	Positiva
<i>L.bozemanii</i> ( <i>Fluoribacter bozemanii</i> )		DMS 16523	Positiva
<i>L. dumofii</i> ( <i>Fluoribacter dumofii</i> )		DMS 17625	Positiva
<i>L. longbeachae</i>		DMS 10572	Positiva
<i>Escherichia coli</i>		CECT 4056	Negativa
<i>Clastridium perfringens</i>		CECT 376	Negativa
<i>P. aeruginosa</i>		CECT 116	Negativa
<i>Enterobacter aerogenes</i>		CECT 684	Negativa

- 5 La Figura 4 muestra los resultados de especificidad del método de LAMP descrito. El ensayo se realizó con muestras de genoma, se calibró con el conjunto de cebadores especificado por la presente invención; los resultados muestran los datos obtenidos del ciclo de cuantificación (Cq) o el tiempo en minutos en el que la emisión de fluorescencia llega a ser exponencial.
- 10 La Figura 5 muestra los resultados de especificidad del método de LAMP descrito. El ensayo se realizó con muestras de genoma, se calibró con un conjunto comparativo de cebadores especificado por la presente invención; los resultados muestran los datos obtenidos del ciclo de cuantificación (Cq) o el tiempo en minutos en el que la emisión de fluorescencia llega a ser exponencial. A continuación, la emisión de fluorescencia de cada uno de los tubos de reacción, en el momento final del ensayo.
- 15 Tal como se puede mostrar en las figuras mencionadas anteriormente (4 y 5), el conjunto de cebadores de acuerdo con la invención tienen un mejor rendimiento que los otros.

Estudio del umbral de sensibilidad del ensayo de amplificación de acuerdo con la invención

- 20 El límite de detección analítico del método de detección de acuerdo con la invención se determinó basándose en el ARN calibrado de la cepa de referencia de *Legionella pneumophila* DSM 7513. Tal como se muestra en la Tabla 4, el método de detección de acuerdo con la invención es capaz de la detección del equivalente para 1 pg de ARN de *Legionella*, que se corresponde con el Equivalente Genómico (EG) de 10 UFC. El coeficiente de correlación entre el comienzo de la emisión de fluorescencia y la cantidad inicial de material genético fue mayor de 0,99 para cuatro
- 25 órdenes logarítmicos.

Tabla 4: Resultados obtenidos en el estudio del límite umbral del ensayo de amplificación, para la detección de *Legionella*. Se utilizaron muestras calibradas de ARN obtenido de la cepa de referencia

ADN de <i>Legionella pneumophila</i>	Cq 1	Cq 2	Desviación
1 ng (10000 EG)	14,9	15,15	0,177
100 pg (1000 EG)	18,32	18,07	0,177
10 pg (100 EG)	22,12	21,57	0,389
1 pg (10 EG)	25,4	25,31	0,064

La Tabla 5 muestra los resultados para tres concentraciones establecidas de acuerdo con la legislación: 1 ng (EG para 10.000 UFC), 100 pg (EG para 1.000 UFC) y 10 pg (EG para 100 UFC) por cinco muestras para controlar la precisión del método de detección de acuerdo con la invención. Como se puede ver, el coeficiente de variación es menor del 1,2 % para los tres niveles de *Legionella* (bajo, alto y muy alto).

5 Tabla 5: Estudio de la precisión del ensayo de amplificación para la detección de *Legionella*. Se utilizaron muestras calibradas de ARN obtenido de la cepa de referencia

ADN de <i>Legionella pneumophila</i>	Cq 1	Cq 2	Cq3	Cq4	Cq5	Desviación
1 ng (10000 EG)	14,78	14,55	14,53	14,43	14,26	0,163
100 pg (1000 EG)	17,94	18,00	18,04	17,89	17,77	0,105
10 pg (100 EG)	20,59	20,56	20,63	20,48	20,27	0,143

10 Los ensayos de sensibilidad para el método de detección de acuerdo con la invención se realizaron para cultivos puros de la cepa de referencia de *Legionella pneumophila* DSM 7513. Para estos ensayos, se prepararon los cultivos en placas BCYE (medio de cultivo para crecimiento *in vitro* de *Legionella* spp.), se permitió que crecieran durante 3 días a 37 °C. Posteriormente, los cultivos puros se recogieron en medio RINGER para la dilución a concentraciones de trabajo que se corresponden con las estipuladas por la legislación (10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>2</sup>) y requeridas por el mercado. La cantidad exacta de *Legionella* analizada por el ensayo genético también se confirma mediante el  
15 cultivo en placas. Por consiguiente, la extracción genómica se optimizó en combinación con la amplificación isotérmica para obtener una máxima reproducibilidad, especialmente a menor concentración bacteriana.

Se ensayaron varias muestras ambientales de diferentes instalaciones con el método de detección de acuerdo con la invención y se compararon con los criterios Gold de la ISO 11731 (véase la tabla 6).

20 Tabla 6: Resultados comparativos del método de detección de acuerdo con la invención y los criterios Gold de la ISO 11731

Muestra ambiental	Método de detección de acuerdo con la invención	Ensayo de los criterios Gold de la ISO 11731
M1	Negativo/litro	Negativo/litro
M2	Negativo/litro	Negativo/litro
M3	Positivo/650 ml	Negativo (7.500 UFC)/litro
M4	Positivo/350 ml	Negativo/litro
M5	Negativo/200 ml	Negativo/litro
M6	Negativo/350 ml	Negativo/litro

25 La muestra M4 tenía un alto contenido de hierro no soluble. Esto, sin embargo, no afectó al método de detección de acuerdo con la invención, tal como se muestra en la Tabla 1, dado que se detectó *Legionella* spp. de manera inequívoca. La detección de *Legionella* spp. en la misma muestra mediante el ensayo de los criterios Gold de la ISO11731 no fue posible, dado que la bacteria no se pudo cultivar, probablemente debido a que el hierro actúa como un inhibidor del crecimiento *in vitro*.

ADN de <i>Legionella pneumophila</i>	Cq 1	Cq 2	Desviación
1 ng (10000 EG)	14,9	15,15	0,177
100 pg (1000 EG)	18,32	18,07	0,177
10 pg (100 EG)	22,12	21,57	0,389
1 pg (10 EG)	25,4	25,31	0,064

30 La Tabla 5 muestra los resultados para las tres concentraciones establecidas de acuerdo con la legislación: 1 ng (EG para 10.000 UFC), 100 pg (EG para 1.000 UFC) y 10 pg (EG para 100 UFC) por cinco muestras para controlar la precisión del método de detección de acuerdo con la invención. Como se puede ver, el coeficiente de variación es menor del 1,2 % para los tres niveles de *Legionella* (bajo, alto y muy alto).

35

Tabla 5: Estudio de la precisión del ensayo de amplificación para la detección de *Legionella*. Se utilizaron muestras calibradas de ARN obtenido de la cepa de referencia

ADN de <i>Legionella pneumophila</i>	Cq 1	Cq 2	Cq3	Cq4	Cq5	Desviación
1 ng (10000 EG)	14,78	14,55	14,53	14,43	14,26	0,163
100 pg (1000 EG)	17,94	18,00	18,04	17,89	17,77	0,105
10 pg (100 EG)	20,59	20,56	20,63	20,48	20,27	0,143

5 Los ensayos de sensibilidad para el método de detección de acuerdo con la invención se realizaron para cultivos puros de la cepa de referencia de *Legionella pneumophila* DSM 7513. Para estos ensayos, se prepararon los cultivos en placas BCYE (medio de cultivo para crecimiento *in vitro* de *Legionella* spp.), se permitió que crecieran durante 3 días a 37 °C. Posteriormente, los cultivos puros se recogieron en medio RINGER para la dilución a concentraciones de trabajo que se corresponden con las estipuladas por la legislación ( $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$ ) y requeridas por el mercado. La cantidad exacta de *Legionella* analizada por el ensayo genético también se confirma mediante el cultivo en placas. Por consiguiente, la extracción genómica se optimizó en combinación con la amplificación isotérmica para obtener una máxima reproducibilidad, especialmente a menor concentración bacteriana.

10 Se ensayaron varias muestras ambientales de diferentes instalaciones con el método de detección de acuerdo con la invención y se compararon con los criterios Gold de la ISO 11731 (véase la tabla 6).

15 Tabla 6: Resultados comparativos del método de detección de acuerdo con la invención y los criterios Gold de la ISO 11731

Muestra ambiental	Método de detección I de acuerdo con la invención	Ensayo de los criterios Gold de la ISO 11731
M1	Negativo/litro	Negativo/litro
M2	Negativo/litro	Negativo/litro
M3	Positivo/650 ml	Negativo (7.500 UFC)/litro
M4	Positivo/350 ml	Negativo/litro
M5	Negativo/200 ml	Negativo/litro
M6	Negativo/350 ml	Negativo/litro

20 La muestra M4 tenía un alto contenido de hierro no soluble. Esto, sin embargo, no afectó al método de detección de acuerdo con la invención, tal como se muestra en la Tabla 1, dado que se detectó *Legionella* spp. de manera inequívoca. La detección de *Legionella* spp. en la misma muestra mediante el ensayo de los criterios Gold de la ISO11731 no fue posible, dado que la bacteria no se pudo cultivar, probablemente debido a que el hierro actúa como un inhibidor del crecimiento *in vitro*.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de cepas de *Legionella* spp. en una muestra ambiental basándose en la amplificación isotérmica mediada por bucle **caracterizado por que** comprende las etapas de:
- 5 (a) recogida de la muestra;
- (b) extracción de material genético de la muestra con un reactivo de extracción que comprende al menos reactivos de lisis celular y una solución de soporte magnetizable;
- 10 (c) elución del material genético desde el soporte magnetizable y retrotranscripción isotérmica de ARN y amplificación de ADNc con un reactivo de detección que comprende al menos soluciones de elución, retrotranscriptasa, amplificación y lectura, en donde la solución de amplificación comprende un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*; y
- (d) lectura del resultado,
- 15 en donde el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* en la etapa (c) comprende al menos:
- un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1;
- 20 un cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2;
- un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3;
- un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4;
- un cebador inverso B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5;
- un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6;
- 25 un cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y
- un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la retrotranscripción isotérmica del ARN y la amplificación del ADNc en la etapa (c) tiene lugar de manera simultánea a una temperatura de entre 58 °C y 74 °C.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado por que** el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* en la etapa (c) comprende adicionalmente un cebador de bucle directo que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO:9 y un cebador de bucle inverso que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 10.
- 35 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la solución de lectura en la etapa (c) comprende al menos un reactivo de lectura que comprende un fluoróforo de espectro de amplitud de frecuencia modulada (AFM).
- 40 5. Un reactivo de detección para detectar de manera específica las secuencias del gen de ARNr 16S de *Legionella*, **caracterizado por que** comprende al menos soluciones de elución, retrotranscriptasa, amplificación y lectura, en donde la solución de amplificación comprende un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar las regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*, y
- 45 en donde el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* comprende al menos: un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1; un cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 2; un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3; un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4; un cebador inverso B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5; un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6; un cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.
- 50 6. El reactivo de detección para detectar de manera específica las secuencias del gen de ARNr 16S de *Legionella* de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** el conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* comprende adicionalmente un cebador de bucle directo que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO:9 y un cebador de bucle inverso que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 10.
- 60 7. Un conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella*, **caracterizado por que** comprende al menos: un cebador directo F3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 1; un cebador directo F2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal
- 65

- como se establece en la SEQ ID NO: 2; un cebador directo F1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 3; un cebador inverso B3 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 4; un cebador inverso B2 que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 5; un cebador inverso B1c que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 6; un cebador directo interno FIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 7; y un cebador inverso interno BIP que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 8.
- 5
8. El conjunto de cebadores de LAMP para amplificar regiones específicas del gen de ARNr 16S de *Legionella* de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** comprende adicionalmente un cebador de bucle directo que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO:9 y un cebador de bucle inverso que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se establece en la SEQ ID NO: 10.
- 10

FIG. 1

AACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCT  
 TAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATTGTCTAGCTTGCTAGACAGA  
 TGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATATGCCTTGAA  
 GAGGGGGACAACCTGGGGAACTCAAGCTAATACCGCATAATGTCT  
 GAGGACGAAAGCTGGGGACCTTCGGGCCTGGCGCTTTAAGATTAGCC  
 TCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCTACCAAGGCGACG  
 ATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA  
 CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATGGACA  
 ATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC  
 GAGGGTTGTAAAGCACCTTCAGTGGGGAGGAGGGTTGATAGGTTAA  
 GAGCTGATTAACGGACGTTACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTC  
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGA  
 ATTACTGGGCGTAAAGGGTGGCTAGGTTGGTTGATTAAGTTATCTGTG  
 AAATTCCTGGGCTTAACCTGGGACGGTCAGATAATACTGGTTGACTC  
 GAGTATGGGAGAGGGTAGTGGAAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGAGATCGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTACCTGGCC  
 AATACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
 ATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGTT  
 ATATGAAAATAATTAGTGGCGCAGCAAACGCGATAAGTTGACCGCCT  
 GGGGAGTACGGTTCGAAGATTAAAAC

TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACCCTTGACATACAGT  
 AATTTGTCAGAGATGCAITAGTGGCTTCGGGAACACTGATACAGGT  
 CTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC  
 GTAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTAGTTGCCAGCATGTGATGGTGGG  
 GACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATG  
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACACACGTGCTAC  
 AATGGCCGATACAGAGGGCGGGCAAGGGGCGACCTGGAGCAAATCC  
 TAAAAGTCGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT  
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATA  
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGT  
 TGCACCAGAAGTAGATAGTCTAACCTTCGGGGGGACGTTTACCACGG  
 TGT

FIG. 2

Cebador directo F3: SEQ ID NO 1: TCCTTAGTTGCCAGCATGTG  
Cebador directo F2: SEQ ID NO 2: ATGGTGGGGACTCTAAGGAG  
Cebador directo F1c: SEQ ID NO 3: TTGACGTCATCCCCGCCTTC  
Cebador inverso B3: SEQ ID NO 4: ACTCCAATCCGGACTACGAC  
Cebador inverso B2: SEQ ID NO 5: GGATTTGCTCCAGGTCGC  
Cebador inverso B1c: SEQ ID NO 6: GGCCCTTACGGGTAGGGCTA  
Cebador directo interno FIP: SEQ ID NO 7: TTGACGTCATCCCCGCCTTC-  
ATGGTGGGGACTCTAAGGAG  
Cebador inverso interno BIP: SEQ ID NO 8: GGCCCTTACGGGTAGGGCTA-  
GGATTTGCTCCAGGTCGC

FIG. 3

Cebador de bucle directo. SEQ ID NO 9: CGGCAGTCTCCTTAGAGTC  
Cebador de bucle inverso. SEQ ID NO 10: CTACACACGTGCTACAATGGC

FIG. 4

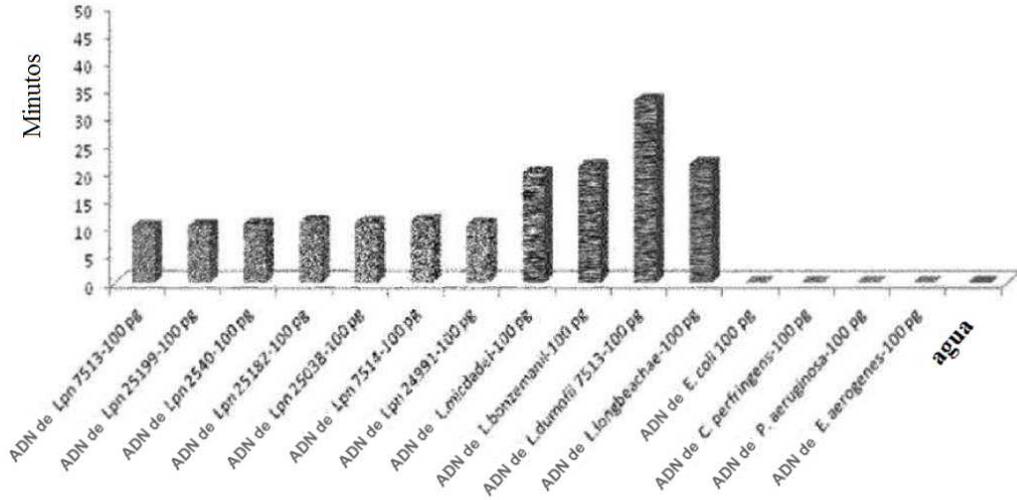
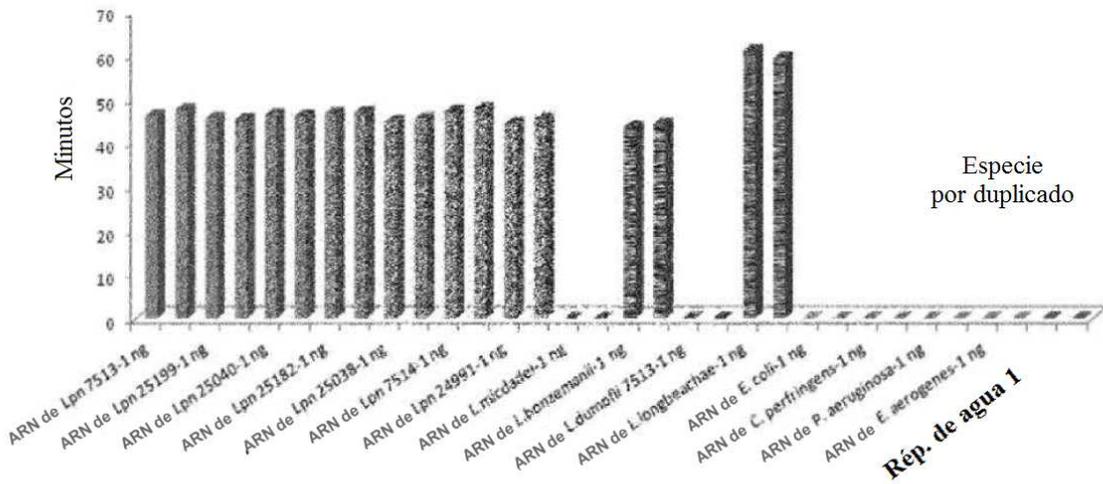


FIG. 5



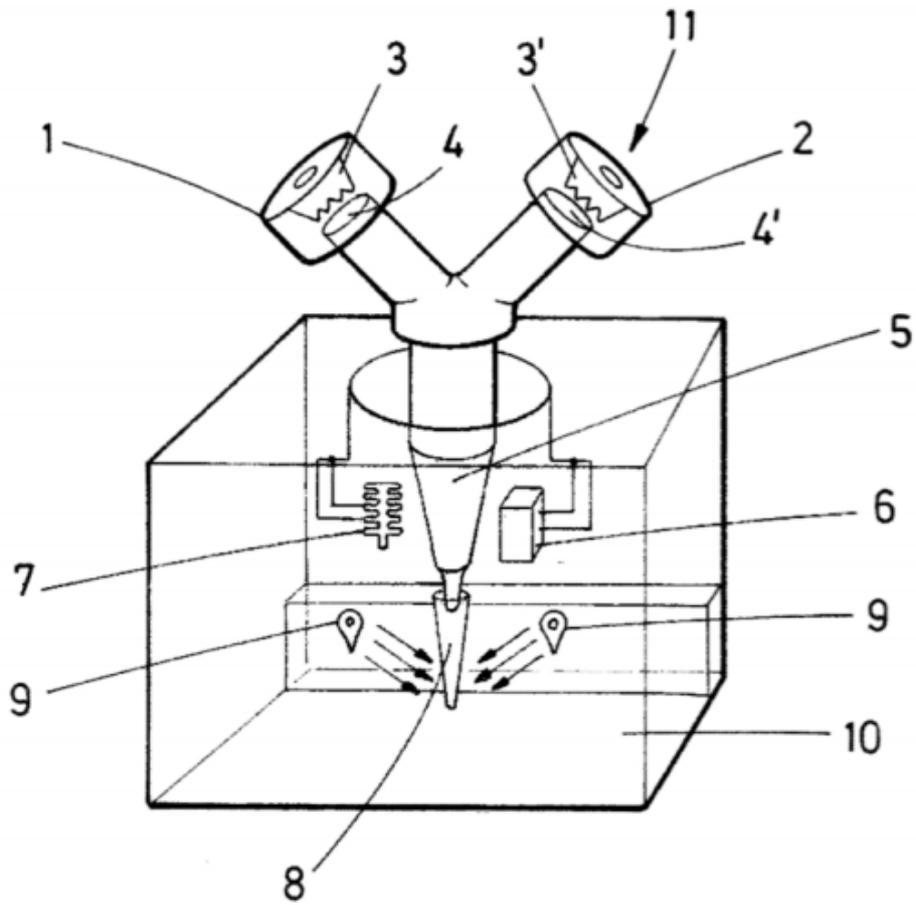
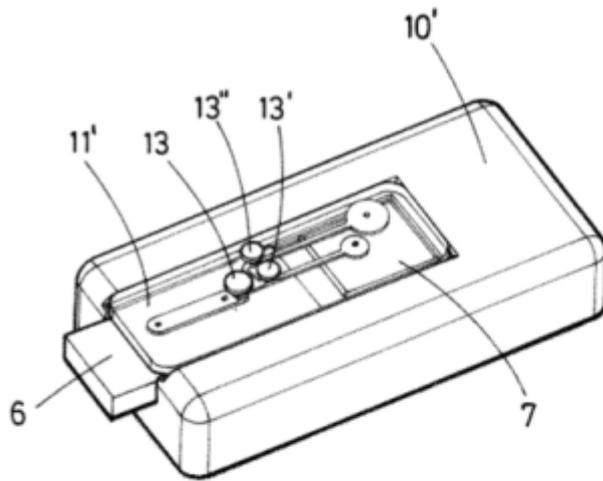
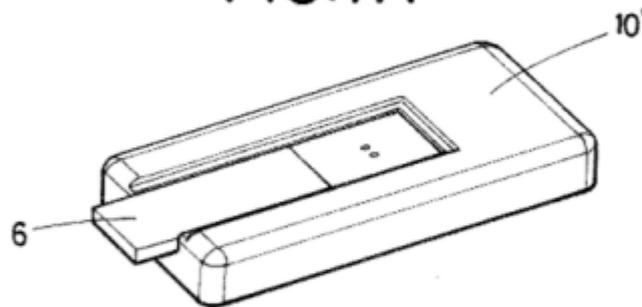


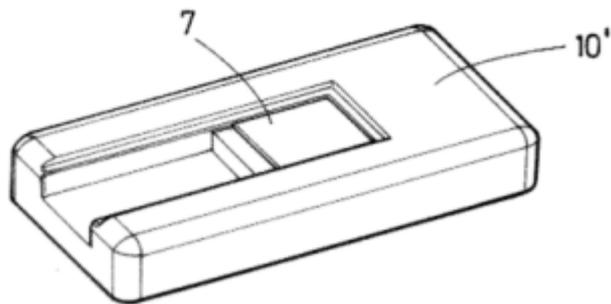
FIG. 6



**FIG. 7A**



**FIG. 7B**



**FIG. 7C**

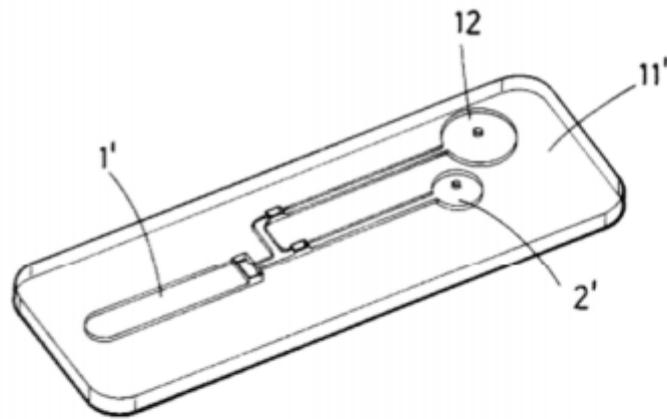


FIG. 7D

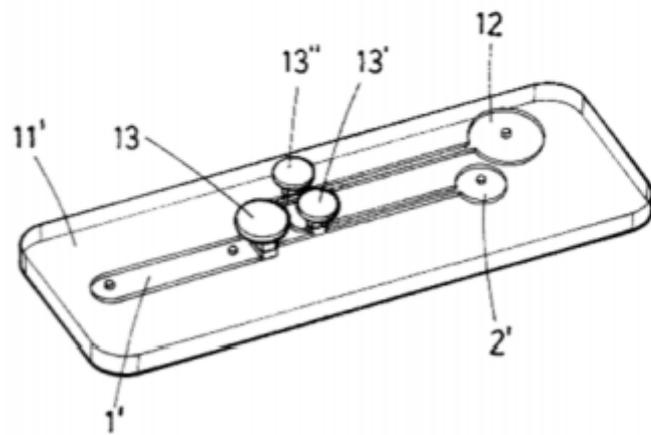


FIG. 7E