



# Determinación de *Legionella spp* viable mediante qPCR utilizando la concentración óptima de PMA

**Adela Soriano Ponce** responsable del Área de Microbiología de Gamaser

**Guadalupe Sastre Salas** responsable adjunta del Área de Microbiología de Gamaser

**José Luis Alonso Molina** responsable del Área Química y de Microbiología del Agua del Instituto de Ingeniería del Agua y del Medio Ambiente de la Universidad Politécnica de Valencia

**Yolanda Moreno Trigos** profesora asociada del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

Debido a la importancia que ha adquirido en los últimos años la enfermedad causada por la bacteria *Legionella* y ya que los métodos clásicos de detección, aislamiento y recuento en medios de cultivo selectivos requieren largos períodos de incubación, se propone el empleo de un método molecular (más sensible y específico) que preste un servicio más rápido y eficiente a la población: la qPCR (*Polymerase Chain Reaction*) combinada con una concentración óptima de Propidio Monoazida (PMA). Este método ofrece resultados en aguas de *Legionella spp* viable en 24 horas.

#### Palabras clave

*Legionella*, qPCR, PMA, fotoactivación, viabilidad celular, agua de abastecimiento.

#### ***Viable Legionella spp determination by qPCR using the optimal concentration of PMA***

*Because of the importance it has acquired in recent years, the disease caused by the bacterium Legionella, and because conventional methods of detection, isolation and enumeration on selective culture media require long incubation periods, is proposed the use of a molecular method (more sensitive and specific) to provide faster service and efficient to the population: the qPCR (Polymerase Chain Reaction) combined with an optimal concentration of Propidium Monoazide (PMA). This method delivers results in the waters of Legionella spp viable in 24 hours.*

#### **Keywords**

*Legionella, qPCR, PMA, photoactivation, cell viability, water supply.*



## 1. Introducción

La *Legionella pneumophila* es una bacteria sobradamente conocida como el agente causante de una de las más graves enfermedades pulmonares, la llamada legionelosis, muy agresiva en personas con un sistema inmunológico comprometido que, incluso, llega a causar una importante tasa de mortalidad. Se trata de una bacteria ambiental presente tanto en sólidos como en el medio natural acuático, en donde puede sobrevivir como un microorganismo de vida libre, como parte de biofilms o como parásito intracelular de amebas y ciliados (Brand y Hacker, 1996; Steinert *et al.*, 2002).

Dada la importancia que en los últimos tiempos ha adquirido este patógeno para la salud pública, se han ido desarrollando métodos más rápidos de detección y cuantificación de *Legionella*. Los métodos clásicos de aislamiento de colonias por cultivo en medio selectivo suponen

largos tiempos de incubación (10-15 días) y una baja recuperación de células debido a la propia limitación del ensayo. Frente a estos, los métodos moleculares se presentan como una alternativa, por ser muy sensibles, permitir la detección de pocos microorganismos por volumen de muestra, ser muy rápidos, específicos y, también, por detectar aquellas células que no pueden crecer en las condiciones que les ofrecen los medios de cultivo.

En este sentido, métodos moleculares basados en DNA, tales como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) directa o PCR cuantitativa (qPCR) o DVC-FISH (recuento directo de células viables combinado con un fluoróforo marcador y posterior identificación y recuento), han emergido como una herramienta efectiva para los laboratorios de referencia y así ensayar más rápidamente las muestras clínicas, de alimentos y ambientales (**Figura 1**).

## 2. Objetivos

En este trabajo, tras estudiar todas las ventajas e inconvenientes de ambas técnicas moleculares, se observa que la qPCR podía ser la herramienta que mejor servicios ofrecía para lograr los objetivos fundamentales, que eran:

- Dar rapidez de resultados de *Legionella* en aguas, incluso cuando se tienen muchas muestras que procesar a la vez, y con una gran sensibilidad y especificidad.
- Que dichos resultados correspondan a células vivas.

En este sentido, la investigación se ha centrado en encontrar una manera de ofrecer resultados de *Legionella* viable por qPCR en diversas matrices de aguas.

Para el estudio de la viabilidad celular se pueden emplear diversos métodos (Keer y Birch, 2003; Villarino *et al.*, 2000), algunos basados en:



**Figura 1.** Vista general del Área de Microbiología de Gamaser.

- La actividad metabólica de las células (actividad esterasa, cadena de transporte de electrones, reducción de sales de tetrazolio, transporte de glucosa), inhibición de la girasa en la división celular (*Direct Viable Count*).
- La integridad celular (citometría de flujo, integridad de la membrana celular).
- La presencia de ácidos nucleicos como mRNA, rRNA, hibridación con sondas 16SrDNA o 23SrDNA marcadas con fluoróforos (FISH).

En este estudio se emplea, como criterio de diferenciación de células vivas y muertas de *Legionella*, la integridad de la membrana celular en el método de la qPCR. Pero, ¿cómo se consigue una PCR de solo células viables utilizando la integridad de la membrana celular?

En la comunidad científica se está empleando como herramienta muy eficaz el colorante Propidio Monoazida (PMA) que, intercalado

en el DNA de las células muertas, consigue inhibir su amplificación en la PCR. Este colorante solo puede penetrar en las células con la membrana comprometida de las células muertas y, una vez dentro, se une al DNA irreversiblemente intercalándose entre él y formando un complejo PMA-DNA gracias a la fotoactivación con una fuente de luz. En este estado de unión, teóricamente, el DNA no puede amplificarse en la PCR (Nocker *et al.*, 2007).

El modo de acción del PMA en las señales de amplificación del DNA todavía no se conoce (Fittipaldi *et al.*, 2012). El grupo azida que posee el colorante permite el enlace covalente del colorante al DNA con una exposición constante a la luz. Un elemento tan vinculante dentro de la cadena de DNA podría ser la causa de la inhibición de la amplificación del DNA en la qPCR (Nocker y Camper, 2009; Rudi *et al.*, 2005). La fotólisis del PMA convierte al grupo azi-

da en un radical nitreno altamente reactivo que reacciona con cualquier molécula orgánica que tenga próxima, incluido el DNA (Agustí *et al.*, 2012). Este enfoque analítico está todavía en desarrollo y se tiene que investigar más a fondo (Fittipaldi *et al.*, 2012). Otro estudio sugirió, también, que debido a la fotoactivación y la posterior unión, el DNA se volvía insoluble y desaparecía junto con el resto de desechos de la extracción del DNA (Nocker y Camper, 2006).

Así pues, en este caso el PMA sería la herramienta para la obtención de resultados de solo viables por PCR.

### 3. Esquema de trabajo

Atendiendo a lo anterior, el esquema de trabajo propuesto se basa en dos puntos:

- Buscar la concentración óptima de PMA para los ensayos de *Legionella spp* por qPCR viable en agua desionizada estéril.



Figura 2. Detalle de la zona de ensayos dentro del Área de Microbiología de Gamaser.



- Aplicar esa concentración para la determinación de *Legionella spp* y *Legionella pneumophila* en muestras de aguas de red.

#### 4. Materiales y métodos

Los ensayos se llevaron a cabo en las instalaciones de Gamaser, en concreto en el Área de Microbiología. Este laboratorio pertenece al Grupo Aguas de Valencia (**Figura 2**).

El PMA empleado fue el de Biotium (Hayward, CA, Estados Unidos).

Para la preparación de muestras de agua con concentraciones conocidas de células de *Legionella pneumophila* vivas se emplea el kit Film-tracer Lived/Dead Biofilm Viability kit (Invitrogen, Fischer Scientific). Dicho kit lleva dos fluoróforos que tiñen los ácidos nucleicos: Syto 9 y yoduro de propidio (PI). Con la mezcla adecuada de ambos colorantes, Syto 9 penetra por la membrana, tanto intacta como dañada, y tiñe las células de verde. El PI penetra solamente en las células de membrana dañada, desplazando al Syto 9 y tiñéndolas de rojo.

Se empleó una cepa de *Legionella pneumophila* procedente de la CECT (*Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*, serovar 1, Brenner et al., 1979. CECT 7109).

Las colonias de *Legionella pneumophila* se hicieron crecer a 35 °C en agar BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*). Una colonia de menos de 24 h de vida se resuspendió en 100 ml de agua desionizada estéril. Tras 15 minutos en agitación, se tomaron 250 µl y se llevaron a un tubo de microcentrifuga estéril al cual se le añadieron 0,75 µl de la mezcla de los dos reactivos, Syto 9 y PI. El tubo, al abrigo de la luz, se agitó en un vórtex para mezclar y luego se llevó a agitación durante 15 minutos evitando que le diera la luz. A continuación, se realizó el recuento en porta

(Poly-Prep Slides, Sigma) con 10 µl de suspensión teñida y se contaron células en 20 campos. Se empleó un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop II con un filtro de doble banda. En verde se vieron las células vivas y en rojo, las que estaban muertas.

##### 4.1. Tratamiento con calor para matar las células

Parte de los experimentos consistieron en utilizar concentraciones conocidas de células muertas de *Legionella*. Los primeros experimentos que se realizaron fueron para la determinación de la temperatura (Tª) óptima para matar a las células de *Legionella pneumophila*. Así, se comenzó utilizando una Tª de 72 °C durante 15 minutos, pero se observó que seguían creciendo colonias en agar BCYE y que no era totalmente efectivo. Se decidió subir la Tª a 80 °C manteniendo el tiempo, 15 minutos, y se observó en repetidas muestras que no había crecimiento en ninguna placa de agar BCYE.

##### 4.2. Preparación de las muestras a ensayar

Para cada concentración de células estudiada se han preparado las siguientes muestras:

- Muestra con células vivas sin tratamiento con PMA (Vivas -PMA).
- Muestra con células vivas con tratamiento con PMA (Vivas +PMA).
- Muestra con células muertas por calor sin tratamiento con PMA (Muertas -PMA).

- Muestra con células muertas por calor con tratamiento con PMA (Muertas +PMA).

Se prepararon muestras de 1 l de agua desionizada estéril inoculadas con una concentración de células de *Legionella* tal que, al separar cada muestra en 9 concentrados de 100 µl (tras la filtración y separación de las células) para los diferentes tratamientos (Vivas -PMA, Vivas +PMA, Muertas -PMA y Muertas +PMA) y sus duplicados, cada uno de los mismos tuvieran concentraciones de 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> células.

El noveno tubo de concentrado sería de células muertas para, de ahí, sembrar 0,1 ml en una placa de agar BCYE a 35 °C durante 10 días y observar la efectividad del tratamiento de calor para matar las células.

Las concentraciones de PMA que se estudiaron fueron las siguientes: 100 µM, 90 µM, 70 µM, 50 µM, 25 µM y 6,25 µM.

Para cada una de esas concentraciones de PMA, se analizaron muestras inoculadas con 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> células de *Legionella pneumophila* por duplicado.

##### 4.3. Protocolo de ensayo

Un litro de agua desionizada estéril, tras ser inoculada con la concentración correspondiente, se filtra por una membrana de policarbonato de 0,2 µm de poro y de 47 mm de diámetro (Isopore, 0,2 µm, Millipore). Tras la filtración, la membrana se lleva a 10 ml de agua desionizada estéril. Se agita en un agitador de tubos

**Se ha logrado determinar la bacteria *Legionella* viable para aguas de red en 24 horas, frente a los 10-15 días que tardan los métodos tradicionales**

(Multireax, Heidolph Instruments), a una velocidad de 2000 rpm y con 3 mm de órbita, durante 10 minutos para obtener la separación de las células de la membrana. Pasado el tiempo de agitación, se extrae la membrana con mucho cuidado y el tubo se centrifuga durante 20 minutos a 4.000 rpm (Megafugue 1.0, Heraeus). Se extrae el sobrenadante y el pellet resultante se resuspende en 900 µl de agua desionizada estéril para luego repartirlos en 9 tubos de microcentrifuga de 1,5 ml a razón de 100 µl por tubo.

De estos 9 tubos se realizan todos los tratamientos:

- Dos tubos para llevar directamente a la extracción del DNA.
- Dos tubos para aplicarle el tratamiento del PMA.
- Dos tubos para llevar a 80 °C durante 15 minutos para matar a las células.
- Dos tubos para llevar a 80 °C durante 15 minutos para matar a las células y luego aplicarle el tratamiento del PMA.
- El noveno para sembrar en agar BCYE el cual ha sido sometido a tratamiento de calor.

#### 4.4. Tratamiento con PMA

Tras la adición del PMA en las cantidades adecuadas para conseguir las concentraciones de estudio (100 µM, 90 µM, 70 µM, 50 µM, 25 µM y 6,25 µM), las muestras se incuban 5 minutos a Tª ambiente en la oscuridad para que entre en las células que tienen su membrana celular dañada, y se colocan en el equipo de fotoactivación con sistema led de iluminación azul constante (Phast Blue, GenIUL, Barcelona, España), durante 15 minutos para que el PMA se una al DNA de las células de *Legionella* no viables (**Figura 3**). Este nuevo sistema de iluminación

desplaza al que se estaba utilizando hasta ahora, que era una exposición de la luz con una lámpara halógena a unos 20 cm de las muestras en el cual, para que las muestras no tuvieran excesivo calor, estas se colocaban sobre hielo.

#### 4.5. Extracción del DNA y qPCR

A continuación se realiza la extracción del DNA utilizando la resina quelante Chélex-100 (Real, Durviz, Valencia, España) (Lamballerie *et al.*, 1992). Los 8 primeros tubos, con las muestras tratadas y las no tratadas, se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 100 µL de Chélex-100. A continuación se realizó la extracción del DNA manteniendo los tubos en un baño a 100 °C durante 10 minutos, dejando enfriar a Tª ambiente y luego extrayendo el sobrenadante donde se encuentra el DNA, el cual se lleva a otro tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 ml donde queda listo para realizar la qPCR inmediatamente, o se congela a -20 °C hasta que se realice.

La PCR cuantitativa se realizó empleando el equipo LightCycler 2.0 de Roche Applied Science y el kit de *Legionella spp* LightMix (TIB Molbiol, Alemania) en un volumen final de 20 µl. Dicho kit proporciona un fragmento amplificado de 386 pb del gen 16S de *Legionella spp* con iniciadores específicos. El resultado de la qPCR se analiza con sondas de hibridación detectables en el canal 640 del equipo LightCycler 2.0. El propio kit lleva incorporado un control interno (CI) que consiste en una secuencia de DNA artificial que se amplifica simultáneamente con el DNA diana y que se añade a cada reacción con el resto de los reactivos

### Se propone el método de la qPCR combinada con el PMA como alternativa eficaz y rápida para los ensayos cualitativos de *Legionella spp* en aguas de red

que se incorporan. Este CI permitirá evaluar la presencia de inhibidores de la PCR. En la qPCR se empleó el LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (TIB Molbiol, Alemania). Se realizaron ensayos de detección cualitativa a 640 nm.

#### 4.6. Resultados obtenidos con las concentraciones probadas de PMA

Con los resultados obtenidos a 100 µM, 90 µM, 70 µM, 50 µM, 25 µM y 6,25 µM se observó que solo las concentraciones superiores a 50 µM conseguían la inhibición completa de señal de las muestras muertas y tratadas con PMA, por lo que se descartaron las concentraciones de 6,25 y 25 µM. Sin embargo, el resto de concentraciones, exceptuando la de 50 µM, llegaron a reducir incluso totalmente la señal de las muestras vivas tratadas con PMA. Por todo ello, se ha elegido dicha concentración, 50 µM, como la más adecuada para la realización de este trabajo.

#### 4.7. Ensayos realizados en muestras reales

La siguiente y última fase del experimento consistió en comprobar que dicha concentración de PMA, 50µM, podría funcionar en muestras reales de agua de consumo de la red de la ciudad de Valencia. Se repitieron los mismos experimentos que an-



teriormente cuando se investigó la concentración idónea de PMA, pero solo a la concentración de 50  $\mu$ M con agua de red.

## 5. Resultados

### 5.1. *Legionella spp* en aguas de red

Los resultados se muestran en la **Tabla 1**. El incremento en la reducción de la señal por el efecto del PMA para células vivas a la concentración de 50  $\mu$ M ha sido de 1,0 ( $10^3$  células) a 1,9 ( $10^4$  células). A la concentración de 50  $\mu$ M de PMA se inhibió por completo la señal de las células muertas con 50 ciclos de amplificación, con una inhibición de la señal de 22  $C_p$  (*Crossing point*), tomando como referencia el valor de  $C_p$  de  $10^6$  células vivas sin PMA ( $21,9 \pm 0,6$ ).

Los resultados obtenidos fueron óptimos para las concentraciones celulares estudiadas.

### 5.2. *Legionella spp* en aguas de piscina y torres de refrigeración

También se han realizado varios experimentos en aguas de piscina y aguas de torre de refrigeración y los resultados han sido óptimos en concentraciones de  $10^3$  y  $10^4$ , pero a partir de  $10^5$  los resultados no han sido lineales. Se sigue investigando al respecto (**Figura 4**).

### 5.3. *Legionella pneumophila* en aguas de red

Se realizaron los mismos ensayos para la determinación cualitativa de *Legionella pneumophila* a partir de los mismos extraídos de DNA que se

emplearon para *Legionella spp* y empleando el kit de *Legionella pneumophila* LightMix (TIB Molbiol, Alemania) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Dicho kit proporciona un fragmento amplificado de 183 pb del gen MIP de *Legionella pneumophila* con iniciadores específicos. El resultado de la PCR es analizado con sondas de hibridación detectables en el canal 640. También se empleó el mismo cóctel que para las reacciones de *Legionella spp*, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (TIB Molbiol, Alemania). Se realizaron ensayos de detección cualitativa a 640 nm.

Los resultados obtenidos fueron óptimos para las concentraciones celulares habituales que puede haber en un agua de red. Para altas concentraciones de células, todavía se está trabajando en la fase experimental.

### 5.4. *Legionella pneumophila* en aguas de piscina y torres de refrigeración

También se han realizado varios experimentos en aguas de piscina y aguas de torre de refrigeración y los resultados han sido óptimos en concentraciones de  $10^3$ , pero a partir de  $10^4$  los resultados no han sido lineales. Se sigue investigando al respecto.

## 6. Conclusiones

Se propone el método de la qPCR combinada con el PMA como alter-

**Tabla 1.** Efecto del PMA (concentración 50  $\mu$ M) en las señales de amplificación en la qPCR para *Legionella spp*.

Mes	Vivas sin PMA	Vivas con PMA	$\Delta C_p^{(b)}$	Vivas sin PMA	Muertas sin PMA	$\Delta C_p^{(c)}$	Muertas con PMA
$10^3$	29,8 $\pm$ 0,4 <sup>(a)</sup>	30,8 $\pm$ 0,2	1,0	29,8 $\pm$ 0,4	30,4 $\pm$ 0,8	0,6	ND <sup>(d)</sup>
$10^4$	27,3 $\pm$ 0,3	29,2 $\pm$ 0,2	1,9	27,3 $\pm$ 0,3	28,0 $\pm$ 0,2	0,7	ND
$10^5$	24,7 $\pm$ 0,8	26,3 $\pm$ 1,1	1,6	24,7 $\pm$ 0,8	25,6 $\pm$ 0,9	0,9	ND
$10^6$	21,9 $\pm$ 0,6	23,6 $\pm$ 0,6	1,7	21,9 $\pm$ 0,6	23,5 $\pm$ 0,6	1,6	ND

**Nota:** (a) = los valores de  $C_p$  corresponden a la media +/- desviación estándar (n = 2); (b) =  $\Delta C_p$ :  $C_p$  Vivas con PMA -  $C_p$  Vivas sin PMA; (c) =  $\Delta C_p$ :  $C_p$  Muertas sin PMA -  $C_p$  Vivas sin PMA; (d) = ND: no detectadas, inhibición completa por el PMA.

**Figura 4.** Los ensayos cualitativos han dado resultado con muestras de *Legionella spp* en aguas de red, por lo que se continuó trabajando en aguas de piscinas y torres de refrigeración, incluso con muestras de *Legionella pneumophila*.



nativa eficaz y rápida para los ensayos cualitativos de *Legionella spp* en aguas de red.

El método oficial subestima los resultados positivos y ofrece un gran peligro por tener el riesgo de dar resultados falsos negativos, lo cual pone en peligro la salud pública. Es cierto que existe una propuesta al RD 865, que todavía no ha entrado en vigor, en la que se hace eco de los progresos técnicos y permitirán en empleo de la PCR para la toma de decisiones urgentes como en el caso de brotes o positivos, pero en ningún caso permiten la sustitución de sus datos por los de las técnicas de cultivo.

Es deseable que las autoridades sanitarias empiecen a tomar conciencia de la calidad de los resultados moleculares y los puedan dar como válidos a la vista de estudios como este y, por qué no, puedan aparecer como nuevos métodos oficiales de ensayo.

## 7. Agradecimientos

El más sincero agradecimiento al personal del Instituto de Ingeniería del Agua y del Medio Ambiente (IIA-MA) de la Universidad Politécnica de Valencia por toda la ayuda desinteresada, tanto material como huma-

na, en la realización de este trabajo de investigación. También al equipo de Dirección de Gamaser, que ha puesto toda su confianza en la ejecución del trabajo.

### Bibliografía

- [1] Agustí, A.; Fittipaldi, M.; Morató, J.; Codony, F. (2013). 'Viable quantitative PCR for assessing the response of *Candida albicans* to antifungal treatment'. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, núm. 97, págs. 341-349.
- [2] Chang, B.; Sugiyama, K.; Taguri, T.; Amemura-Maekawa, K.; Watanabe, F. (2009). 'Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/Real-Time PCR'. *Applied and Environmental Microbiology*, núm. 75, págs. 147-153.
- [3] Fittipaldi, M.; Nocker, A.; Codony, F. (2012). 'Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 91, págs. 276-289.
- [4] Fittipaldi, M.; Pino, N.; Adrados, B.; Agustí, G.; Peñuela, Morató, J.; Codony, F. (2011). 'Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction'. *J. of Eukaryotic Microbiology*, núm. 58, págs. 359-364.
- [5] Frankenhuyzen, J.K.; Trevors, J.T.; Lee, H.; Flemming, C.A.; Habash, M.B. (2011). 'Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration'. *Journal of Microbiological Methods*.
- [6] Gião, M.; Wilks, A.; Azevedo, F.; Vieira, M.J.; Keevil, C.W. (2009). 'Validation of Syto 9/Propidium Iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*'. *Micro. Ecol.*, núm. 58, págs. 56-62.
- [7] Hellein, N.K.; Kennedy, E.M.; Harwood, V.J.; Gordon, K.V.; Wang, S.Y.; Lepo, J.E. (2012). 'A filter-based propidium monoazide technique to distinguish live from membrane-compromised microorganisms using quantitative PCR'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 89, págs. 76-78.

[8] Hilbi, H.; Jarraud, S.; Hartland, E.; Buchrieser, C. (2010). 'Update on Legionnaires disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control'. *Mol. Microbiol.*, núm. 76, págs. 1-11.

[9] Kahlisch, L.; Henne, K.; Groebe, L.; Draheim, J.; Höfle, M.G.; Brettar, I. (2010). 'Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status'. *Water Science & Technology*, núm. 61 (1).

[10] Keer, J.T.; Birch, L. (2003). 'Molecular methods for the assessment of bacterial viability'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 53, págs. 175-183.

[11] Lamballerie, X.; Zandoti, C.; Vignoli, C.; Bollet, C.; Micco, P. (1992). 'A one-step microbial DNA extraction method using Chelex 100 suitable for gene amplification'. *Res. Microbio.*, núm. 143, págs. 785-790.

[12] Liang, Z.; Keeley, A. (2012). 'Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples'. *Water Research*, núm. 46, págs. 5.941-5.953.

[13] Nkuiipou-Kenfack, E.; Engel, H.; Fakih, S.; Nocker, A. (2013). 'Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 93, págs. 20-24.

[14] Nocker, A.; Cheung, C.Y.; Camper, A.K. (2006). 'Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 67, págs. 310-320.

[15] Slimani, S.; Robyns, A.; Jarraud, S.; Molmeret, M.; Dussre, E.; Mazure, C.; Facon, J.P.; Lina, G.; Etienne, J.; Ginevra, C. (2012). 'Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 88, págs. 31-321.

[16] Villarino, A.; Bouvet, O.M.M.; Regnault, B.; Martin-Delautre, S.; Grimont, P.A.D. (2000). 'Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells'. *Res. Microbiol.*, núm. 151, págs. 755-768.

[17] Yáñez, A.M.; Nocker, A.; Soria-Soria, E.; Múrtula, R.; Martínez, L.; Catalán, V. (2011). 'Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR'. *Journal of Microbiological Methods*, núm. 85, págs. 124-130.