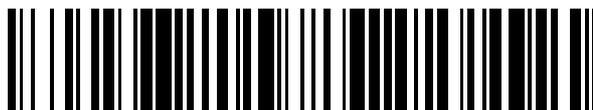


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 035**

51 Int. Cl.:

C12R 1/90 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C02F 3/32 (2006.01)

C02F 103/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2012 PCT/EP2012/074248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2012 E 12795802 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2785879**

54 Título: **Procedimiento de control biológico contra las Listeria**

30 Prioridad:
02.12.2011 FR 1161111

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.01.2017

73 Titular/es:
**AMOEBA (100.0%)
38 Avenue des Frères Montgolfier
69680 Chassieu, FR**

72 Inventor/es:
**PLASSON, FABRICE y
BODENNEC, SÉLÉNA**

74 Agente/Representante:
VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 597 035 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

Procedimiento de control biológico contra las *Listeria*

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de control biológico contra las *Listeria* y, en particular, *Listeria monocytogenes*, así como a una nueva composición destinada al control de la proliferación de *Listeria monocytogenes*.

10

Estado de la técnica

La *Listeria monocytogenes* es una bacteria gram positiva que pertenece a la familia de las *Listeriaceae*. En seres humanos, esta bacteria es responsable de la listeriosis con un pronóstico frecuentemente mortal (10). En los supervivientes se observan con frecuencia secuelas graves. La bacteria patógena puede atravesar la barrera intestinal y la barrera placentaria, pudiendo provocar, por tanto, infecciones del feto, del recién nacido, o nacimientos prematuros. La *Listeria monocytogenes* es también la causa principal de la infección neuroinvasiva con una prevalencia en aumento a lo largo de estos últimos años (5) (10). Asimismo, la vigilancia y la prevención de la listeriosis constituyen una preocupación cada vez más importante.

15

20

La *Listeria monocytogenes* es una bacteria de diseminación/distribución ubicua: está presente en el suelo, el agua, en epifitas sobre las plantas, etc. Muy resistente a los tratamientos de limpieza y desinfección, puede persistir también en las unidades de producción de la industria agroalimentaria, por ejemplo, o en las redes de distribución de agua o de aire acondicionado, por ejemplo.

25

De forma general, y a pesar de la importancia médica de esta bacteria, los conocimientos sobre la ecología de las *Listeria* siguen siendo relativamente limitados (1). No obstante, se sabe que en el medio ambiente, la *Listeria monocytogenes* presenta una diseminación ubicua (15), ya que esta bacteria se ha aislado del suelo, de aguas residuales o de aguas residuales industriales (4), característica que comparte con las amebas libres. Asimismo, la capacidad de resistencia de la *Listeria monocytogenes* frente a la destrucción por los macrófagos humanos ha permitido a ciertos científicos formular la hipótesis de que esta bacteria patógena podría resistir a las amebas libres en el medio ambiente, por analogía con los conocimientos adquiridos sobre las relaciones entre bacterias parásitas y hospedadores amebianos (6). Así, Ly y Müller han sugerido que las *Listeria* podrían ser resistentes a las amebas libres (6, 9). Estas hipótesis se han podido verificar ya que estos autores han demostrado que la *Listeria monocytogenes* era capaz de proliferar en presencia de amebas libres pertenecientes al género *Acanthamoeba* (9) (6). Además, se ha demostrado un efecto citotóxico de la *Listeria monocytogenes* sobre sus hospedadores amebianos ya que se ha observado un enquistamiento de *Acanthamoeba* cuando estas últimas se colocan en co-cultivo con la bacteria patógena (6, 9). Zhou et al. han podido demostrar también que la *Listeria monocytogenes* presentaba la facultad de resistir a las amebas libres de *Acanthamoeba castellanii*: (16). Se ha demostrado también que la *Listeria monocytogenes* es capaz de crecer en presencia de material biológico liberado por las amebas durante su enquistamiento o su lisis (1). Los autores de esta observación habían sugerido que estos factores podían proporcionar las condiciones favorables a las *Listeria* para su mantenimiento y/o proliferación en el medio ambiente (1). Otras observaciones realizadas por Pushkareva y Ermolaeva han permitido demostrar en otro protozoo libre (*Tetrahymena pyriformis*) que la *Listeria monocytogenes* era internalizada eficazmente (11). La infestación del *Tetrahymena pyriformis* por la *Listeria monocytogenes* induce el enquistamiento del protozoo (11). Los datos obtenidos por estos investigadores han demostrado también que las *Listeria monocytogenes* internalizadas en estos quistes de protozoos permanecen viables, conservan su virulencia y son capaces de causar infecciones en modelos animales (11).

30

35

40

45

50

55

60

Por tanto, parece claramente que los protozoos y las amebas libres constituyen un elemento importante de la ecología de la *Listeria monocytogenes*, favoreciendo su mantenimiento, su crecimiento en el medio ambiente y favoreciendo la emergencia de las características de virulencia bacteriana. Asimismo, la capacidad de la *Listeria* para infectar a los protozoos y para sobrevivir en sus formas quísticas (11) es un indicador poderoso de que los protozoos son factores que favorecen la resistencia de las *Listeria* frente a los tratamientos biocidas actualmente utilizados. Los quistes de las amebas presentan, en efecto, una gran resistencia a los tratamientos biocidas químicos y/o físicos actualmente empleados (7, 8, 14). Los tratamientos biocidas actualmente empleados para prevenir el riego de *Listeria* no son satisfactorios ya que, además del desarrollo de resistencias intrínsecas a la bacteria *per se* (12, 13), las bacterias presentes en el interior de los protozoos y en las biopelículas (2) están relativamente protegidas y, por tanto, seguirán proliferando/colonizando su medio.

65

En este contexto, los inventores han puesto en evidencia, de forma totalmente inesperada, que el género de amebas *Willarta magna* erradica las bacterias *Listeria monocytogenes*. A este efecto biocida se añade a la capacidad de depredación ya mostrada por las *Willarta magna* frente a otros agentes amebianos que pueden servir de vector a la *Listeria monocytogenes* (3).

Objeto de la invención

Así pues, en primer lugar la presente invención tiene por objeto un procedimiento de control de la proliferación de las *Listeria* y, en particular, la *Listeria monocytogenes*, que usa protozoos del género *Willaertia magna*. Los procedimientos de acuerdo con la invención no incluyen los métodos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o animal. En el procedimiento de acuerdo con la invención, lo más frecuente es una corriente líquida o gaseosa que se trata con protozoos del género *Willaertia magna* y, en particular, de la especie *Willaertia magna*.

Para los fines de la invención, por "*Listeria*" se entiende cualquier especie de *Listeria* y, en particular, *Listeria monocytogenes*.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede utilizar particularmente en la desinfección de redes de distribución de aguas sanitarias o de aguas industriales, de circuitos de refrigeración de instalaciones industriales, o de redes de aire acondicionado, o como desinfectante de superficies. Los protozoos podrán añadirse directamente a las aguas o líquidos que circulan en las tuberías o redes que se han de tratar. También es posible pulverizarlos, por ejemplo, en forma de una solución acuosa en aerosol, en las redes, chimeneas, instalaciones y superficies industriales que se van a desinfectar.

De forma ventajosa, los protozoos utilizados en el contexto de la invención corresponden a la cepa depositada el 26 de agosto de 2006 con el número **PTA 7824** en la ATCC, o la cepa depositada el 26 de agosto de 2006 con el número **PTA 7825** en la ATCC, habiéndose depositado ambas cepas a nombre del CENTRO NACIONAL PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CNRS) - 3 rue Michel Ange -75794 PARIS CEDEX 16 / FRANCIA - y la UNIVERSIDAD DE LYON 1 CLAUDE BERNARD - 43 Boulevard du 11 Novembre 1918 - 69622 VILLEURBANNE Cedex / FRANCIA.

Los protozoos, que pertenecen al género *Willaertia* que corresponden a la cepa depositada con el número **PTA 7824** en la ATCC, o a la cepa depositada con el número **PTA 7825** en la ATCC, forman parte integrante de la invención. Dichas cepas depositadas **PTA 7824** y **PTA 7825** se describen también en la publicación de la solicitud internacional PCT WO2008/043969.

Por tanto, tales protozoos se podrán utilizar en agentes desinfectantes, destinados, en particular, a la eliminación de bacterias *Listeria* y, en particular, *Listeria monocytogenes*, y al control de la proliferación y la contaminación por listeriosis.

De forma ventajosa, el agente desinfectante de acuerdo con la invención se presenta en forma de una solución o una suspensión acuosa, por ejemplo en agua destilada. El agente desinfectante se podrá presentar en forma pulverizable, por ejemplo en aerosol o cualquier otro medio de aplicación.

La actividad de los protozoos del género *Willaertia* y, en particular de la especie *Willaertia magna*, que inhiben la proliferación de *Listeria monocytogenes*, ha sido demostrada por los inventores comparando la replicación de *Listeria monocytogenes* en los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* usados como modelos amebianos con la observada en el género de amebas *Willaertia*.

Dado el papel esencial que desempeñan las amebas en la proliferación y mantenimiento de las *Listeria* y, particularmente, las *Listeria monocytogenes* en el medio exterior, elementos que condicionan la epidemiología de la listeriosis puesto que no existe transmisión entre humanos, el procedimiento y el desinfectante de acuerdo con la invención presentan numerosas ventajas, en términos de coste, eficacia y respeto por el medio ambiente, en particular.

Los siguientes ejemplos permiten ilustrar la invención si bien no tienen ningún carácter limitativo.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la evolución espontánea de poblaciones respectivas de amebas *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Willaertia* tras ponerlas en co-cultivo con *Listeria monocytogenes* en una proporción inicial amebas/bacterias de 10.

Las diferentes amebas libres se ponen en co-cultivos (tiempo 0 horas) con *Listeria monocytogenes* en una proporción de 10 (10 bacterias / 1 ameba) tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Se toman después alícuotas de las suspensiones celulares cada 3 horas tras la colocación en el co-cultivo y se determina el porcentaje de amebas vivas mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano y observación microscópica utilizando una célula de Malassez. Los datos se expresan en % de células vivas, negativas en el ensayo de exclusión con azul de tripano.

La **Figura 2** muestra las cinéticas comparadas del desarrollo de *Listeria monocytogenes* obtenido en co-cultivo con diferentes géneros de amebas, entre ellos el género *Willaertia*.

Las diferentes amebas libres se ponen por separado en co-cultivos (tiempo 0 horas) con *Listeria monocytogenes* en

una proporción de 10 (10 bacterias / 1 ameba). Se toman después alícuotas de las suspensiones celulares cada 3 horas tras la colocación en el co-cultivo y se determinan las concentraciones de *Listeria monocytogenes* tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

- 5 La **Figura 3** muestra el efecto biocida de las *Willaertia magna* sobre una biopelícula formada por *Listeria monocytogenes*. Esta figura muestra también la ausencia de efecto de las amebas libres *Acanthamoeba castellanii* y *Hartmannella vermiformis*.

10 Las *Listeria monocytogenes* se inocularon sobre agar TSA, que se incubó a 30 °C durante 48 horas a fin de asegurar la formación de una biopelícula densa de bacterias sobre el agar. Después, 1×10^5 amebas (*Acanthamoeba castellanii*, **panel A**; *Hartmannella vermiformis*, **panel B**; *Willaertia magna*, **paneles C y D**) resuspendidas en 100 µl de agua desionizada estéril se inoculan en el centro del agar. Al cabo de 24 horas a 30 °C se examinan los agares bajo el microscopio a fin de determinar el aspecto de las amebas y la influencia de estas sobre la biopelícula. **A**: las flechas blancas indican el aspecto de los grupos de quistes formados por *Acanthamoeba castellanii* en presencia de *Listeria monocytogenes* (**L. m.**). Nótese la ausencia de placas de lisis en la capa bacteriana alrededor de los grupos de quistes amebianos. **B**: Nótese la presencia de numerosas formas quísticas de *Hartmannella vermiformis*, algunos ejemplos de las cuales se indican mediante las flechas blancas. Nótese también la muy alta densidad de *Listeria monocytogenes* que rodea a los quistes de *Hartmannella vermiformis* y la ausencia total de placas de lisis de la biopelícula bacteriana. **C**: Efecto de las *Willaertia magna* sobre la biopelícula formada por *Listeria monocytogenes*. Las flechas blancas indican grupos de trofozoítos de *Willaertia magna* situados delante de una placa de lisis de la biopelícula. Nótese la ausencia de película bacteriana (zona delimitada por el círculo blanco en la esquina izquierda inferior de la fotomicrografía) más arriba de los grupos de *Willaertia magna* y la película densa bacteriana (indicada mediante las iniciales **L. m.**) más abajo de los grupos de amebas (esquina derecha superior de la fotomicrografía). **D**: otra fotomicrografía que muestra la formación de placas de lisis de la biopelícula formada por *Listeria monocytogenes*. Nótese los grupos de *Willaertia magna* y los frentes de las placas de lisis (indicados mediante las puntas blancas) de la biopelícula bacteriana.

Descripción detallada de la invención

30 1. Material y métodos

1.1. Cepas usadas:

35 ***Listeria monocytogenes***: la cepa usada es la cepa CL 3970 (Oxoid, Francia).

- Se mantiene sobre agar TSA (agar tripticasa de soja) (ref. PO 5012, Oxoid, Francia) a razón de un subcultivo por semana. La cepa se inocula en líneas anchas sobre la caja de agar TSA y se incubó durante 2 días a 30 °C.
- **Amebas**: las cepas usadas pertenecen a tres especies amebianas diferentes:

- 40 ○ *Hartmannella vermiformis*,
- *Acanthamoeba castellanii*, cepas depositadas en la ATCC con el n.º 30010
- *Willaertia magna* (cepas depositadas en la ATCC con los n.ºs PTA 7824 y PTA 7825),

45 Estas tres cepas se cultivan axénicamente, en presencia de un 10 % de suero fetal bovino, sobre medio SCGYEM (Medio de Suero, Caseína, Glucosa, Extracto de levadura), distribuido en tubos FALCON® (3033) en una proporción de 3 ml por tubo. Durante el mantenimiento, las formas vegetativas se subcultivan cada 8-9 días. Para los co-cultivos, se usan subcultivos de 3 a 4 días de modo que se disponga de trofozoítos en plena fase de crecimiento exponencial.

50 El medio SCGYEM se obtiene tal como sigue:

Caseína (MERCK 1.02244.010)	10 g
Na ₂ HPO ₄	1,325 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
Glucosa	2,5 g
Extracto de levadura (DIFCO 0127-17-9)	5 g
Agua destilada	900 ml
Suero fetal bovino	100 ml

A 900 ml de agua destilada se añaden 2,5 ml de NaOH (1 N) y después Na₂HPO₄ y KH₂PO₄. Se calienta ligeramente sobre una placa calefactora y después se añade progresivamente la caseína con agitación magnética. Después de 55 la disolución de la caseína, se incorpora la glucosa y el extracto de levadura.

Tras disolver por completo, se filtra sucesivamente sobre fibra de vidrio (SARTORIUS SM 6513400), y después sobre una membrana de 1 µm (WHATMAN 7190 004). A continuación, se transfieren alícuotas del medio a frascos de vidrio. Los frascos se esterilizan en la autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Antes del uso definitivo y de la

distribución del medio, se añade el suero fetal bovino en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar, en una proporción del 10 % del volumen final.

5 **1.2 Co-cultivo monoamebiano de *Listeria monocytogenes*.**

1.2.1 Preparación del inóculo bacteriano:

A partir de un cultivo de 2 días sobre agar TSA, se prepara una suspensión de *Listeria monocytogenes* en agua destilada de manera que se obtenga 1 unidad de densidad óptica a 550 nm, es decir, una concentración de 10^9 UFC (unidades formadoras de colonias) / ml.

1.2.2. Preparación de los co-cultivos monoamebianos

Los co-cultivos se llevan a cabo en tubos para cultivos celulares (FALCON® 3033) que contienen 3 ml de agua esterilizada mediante autoclave. La inoculación de los tubos se efectúa en una proporción de 1×10^5 amebas/ml, a partir de una suspensión amebiana axénica contada previamente sobre un hematímetro de Malassez. La infestación de las amebas con *Listeria monocytogenes* se efectúa fijando una proporción de *Listeria monocytogenes* / ameba de 10, es decir, de 1×10^6 bacterias / ml de medio de incubación. Inmediatamente después de la infestación, se centrifugan los tubos de co-cultivo a baja velocidad (760 g durante 10 min) para favorecer el contacto entre amebas y bacterias. Al cabo de 10 min, los tubos se vuelven a poner en suspensión de forma manual y se incuban, en posición inclinada, en una estufa a 30 °C.

Los destinos de las amebas y de la *Listeria monocytogenes* puestas en co-cultivo se determinan del siguiente modo:

Se continúan los co-cultivos durante 9 horas tras la infestación bacteriana. A cada intervalo de tiempo (cada 3 horas), los tubos de co-cultivo se retiran y se examinan tanto desde el punto de vista amebiano como del bacteriano tras agitación vigorosa en un agitador vorticial a fin de despegar las amebas de las paredes. Para cada tubo examinado:

- El recuento de las amebas se efectúa directamente sobre la célula de Malassez.
- La determinación de las concentraciones de *Listeria monocytogenes* se efectúa mediante extensión directa en placa del medio de cultivo sobre agar TSA tras dilución en serie con un factor de dilución de 10 en agua destilada estéril, en microtubos Eppendorf. Cada dilución se extiende por triplicado sobre agar TSA en una proporción de 100 µl por caja. Las cajas se incuban después a 30 °C durante 48 horas como mínimo. Se efectúa una primera lectura de los agares TSA 24 horas después de la extensión en placa mediante recuento de las colonias; a esta le sigue una segunda lectura el 2º día para confirmación. Las concentraciones de *Listeria monocytogenes* se expresan en UFC / ml de medio de incubación teniendo en cuenta el factor de dilución y suponiendo que cada colonia corresponde a 1 bacteria inicialmente presente en la suspensión diluida.

Para cada género de ameba, se representan las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en función del tiempo.

Asimismo, el posible efecto citotóxico de *Listeria monocytogenes* sobre las diferentes especies de amebas se determina del modo siguiente:

- contando la proporción de amebas que dan positivo en el ensayo de exclusión con azul de tripano. Este ensayo se realiza bajo el microscopio mediante recuento, en la célula de Malassez, del número de células positivas al azul de tripano / número de células totales.
- determinando la propensión de las amebas a enquistarse en presencia de *Listeria monocytogenes*.

1.3 Efecto de *Willaertia magna* sobre la biopelícula de *Listeria monocytogenes*.

Las biopelículas de *Listeria monocytogenes* se forman del modo siguiente: se deposita una cantidad determinada de *Listeria monocytogenes* en 100 µl de agua estéril y se extiende sobre un agar TSA. Los agares se colocan a 30 °C durante 48 horas de modo que permitan el desarrollo de una película bacteriana densa y uniforme sobre el conjunto de la superficie del agar. A continuación se depositan 1×10^5 amebas (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmarzella vermiformis* o *Willaertia magna*) en el centro del agar que se ha colocado durante 24 horas a 30 °C. Los agares se observan seguidamente bajo el microscopio óptico (aumento x 400) a fin de detectar la formación de posibles placas de lisis de la capa bacteriana.

2. Resultados

2.1. *Willaertia magna* presenta una resistencia frente a *Listeria monocytogenes*.

El efecto de la *Listeria monocytogenes* sobre la supervivencia de distintas especies de amebas ensayadas se ha determinado mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano. Muy rápidamente tras la colocación en el co-

cultivo de la *Acanthamoeba castellanii* con la bacteria, aparece un efecto citotóxico considerable en esta especie amebiana, con una disminución de ~ un 50 % de la viabilidad después de 3 horas de co-cultivo (véase la Figura 1). Por el contrario, este efecto nunca se ha observado cuando se pone la *Willaertia magna* en co-cultivo con la *Listeria monocytogenes*, que incluye hasta 9 horas de incubación con una viabilidad que se mantiene cerca del 100 % (Figura 1). Al igual que la *Willaertia magna*, la ameba libre *Hartmanella vermiformis* no presenta reducción en términos de viabilidad determinada mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano (Figura 1). Sin embargo, el examen microscópico de los co-cultivos ameba-*Listeria monocytogenes* muestran una gran propensión al enquistamiento en la *Hartmanella vermiformis* y en las formas viables de *Acanthamoeba castellanii* (véase la Figura 1). Este fenómeno del enquistamiento nunca se ha observado en la *Willaertia magna* cuando se pone en co-cultivo con la bacteria patógena (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la *Listeria monocytogenes* sobre la inducción de formas quísticas en las diferentes especies de amebas libres.

	Tiempo en co-cultivo (horas)			
	0	3	6	9
<i>Harmanella vermiformis</i>	ND	+	++	++
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	ND	ND	+	+++
<i>Willaertia magna</i>	ND	ND	ND	ND

Las amebas libres se ponen en co-cultivos (tiempo 0 horas) con *Listeria monocytogenes* en una proporción de 10 (10 bacterias / 1 ameba) tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Se toman después alícuotas de las suspensiones celulares cada 3 horas tras la colocación en el co-cultivo tal y como se indica en la tabla anterior. La densidad de los quistes amebianos se expresa del modo siguiente: ND: quistes no detectados; +: presencia de quistes (proporción inferior al 10 % de las formas viables); ++: presencia de quistes (proporción comprendida entre el 10 % y el 30 % de las formas viables); +++: presencia de quistes (proporción superior al 30 % de las formas viables).

El conjunto de estas observaciones (no enquistamiento y no toxicidad inducida por *Listeria monocytogenes*) demuestran claramente que la *Willaertia magna*, al contrario que las otras especies amebianas, presenta la facultad original de resistir frente a la *Listeria monocytogenes*.

2.2. Depredación de la *Listeria monocytogenes* por la *Willaertia magna*

Los resultados de los co-cultivos de *Listeria monocytogenes* realizados en presencia de amebas que pertenecen a los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba* demuestran una importante multiplicación de la bacteria en presencia de estos dos géneros de amebas ya que se observa un aumento que alcanza ~ 3 log de las concentraciones bacterianas en 9 horas (véase la Figura 2). Por el contrario, si bien los co-cultivos se realizan en condiciones estrictamente idénticas, se constata en presencia de la ameba *Willaertia magna* la desaparición total de las *Listeria monocytogenes* detectables (véase la Figura 2). La disminución medida de las concentraciones de *Listeria monocytogenes* es de ~ 6 log en 3 horas, demostrando un efecto masivo de depredación de las *Willaertia magna* frente a *Listeria monocytogenes*.

Este efecto de las *Willaertia magna* sobre las *Listeria monocytogenes* se ilustra adicionalmente en la Figura 3. Así, al cabo de 24 h en presencia de las *Willaertia magna*, aparecen muy claramente superficies del agar en las que la capa bacteriana ha desaparecido (estas zonas se denominan en el presente documento placas de lisis de la capa/biopelícula bacteriana). El examen microscópico muestra también que las *Willaertia magna* se concentran en el límite de esta placa de lisis; este efecto se ilustra en la Figura 3, panel C. La destrucción de la capa bacteriana por las *Willaertia magna* se ilustra también en el panel D de la Figura 3 en el que se distinguen claramente grupos de amebas rodeados de una capa bacteriana destruida o que está en proceso de destrucción. Por el contrario, en presencia de *Acanthamoeba castellanii* o de *Hartmanella vermiformis*, este fenómeno nunca se ha podido observar. El examen microscópico de los agares muestra que las amebas *Acanthamoeba castellanii* y *Hartmanella vermiformis* se enquistan rápidamente cuando se depositan sobre la película de *Listeria monocytogenes*. Este fenómeno se ilustra en los paneles A y B de la Figura 3. Se observa también la ausencia total de placas de lisis de la capa bacteriana alrededor de los quistes de *Acanthamoeba castellanii* y de *Hartmanella vermiformis*, al contrario del fenómeno observado con la *Willaertia magna*. El conjunto de estos datos y observaciones muestran claramente el efecto de depredación de la *Willaertia magna* frente a la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*.

Referencias bibliográficas

1. Aky A, Pointon A, y Thomas C. "Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp". *FEMS Microbiol Ecol* 70: 20-29, 2009.
2. Belessi CE, Gounadaki AS, Psomas AN, y Skandamis PN. "Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions". *Int J Food Microbiol* 145 Suppl

- 1: S46-52, 2011.
3. Bodennec J, Dey R, y Pernin P. "Novel method for biologically combating the prolifération of Legionella pneumophila, and novel disinfecting agent containing amoebic protozoa of the Willaertia genus". Editado por University CBL. Francia: 2010.
- 5 4. Dijkstra RG. "The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant". *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg[B]* 176: 202-205, 1982.
5. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, y de Valk H. "Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries". *Emerg Infect Dis* 14: 734-740, 2008.
- 10 6. Greub G, y Raoult D. "Microorganisms resistant to free-living amoebae". *Clin Microbiol Rev* 17: 413-433, 2004.
7. Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, y Russell AD. "*Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility". *J Infect* 36: 43-48, 1998.
8. Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR, y Russell AD. "Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance". *J Eukaryot Microbiol* 48: 11-16, 2001.
- 15 9. Ly TMC, y Müller HE. "Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa". *J Med Microbiol* 33: 51-54, 1990.
10. Mailles A, Lecuit M, Goulet V, Leclercq A, y Stahl JP. "*Listeria monocytogenes* encephalitis in France". *Med Mal Infect*. En prensa.
- 20 11. Pushkareva VI, y Ermolaeva SA. "*Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts". *BMC Microbiol* 10: 26, 2010.
12. Rajkovic A, Smigic N, Uyttendaele M, Medic H, de Zutter L, y Devlieghere F. "Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7 and *Campylobacter jejuni* after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments". *Food Microbiol* 26: 889-895, 2009.
- 25 13. Rakic-Martinez M, Drevets DA, Dutta V, Katic V, y Kathariou S. "*Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride and other toxic compounds". *Appl Environ Microbiol*. En prensa, 2011.
14. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, y Levi Y. "Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence". *J. Appl Microbiol* 97: 950-963, 2004.
- 30 15. Weis J, y Seeliger HP. "Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature". *Appl Microbiol* 30: 29-32, 1975.
16. Zhou X, Elmore J, y Call DR. "Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*)". *Environ Microbiol* 9: 913-922, 2007.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de control de la proliferación de *Listeria monocytogenes*, a excepción de los métodos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o animal, **caracterizado por que** utiliza protozoos de la especie *Willaertia magna*.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** se trata una corriente líquida o gaseosa, o una superficie sólida, con protozoos de la especie *Willaertia magna*.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** estos protozoos corresponden a la cepa depositada con el número PTA 7824 en la ATCC, o a la cepa depositada con el número PTA 7825 en la ATCC.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** se aplica para la desinfección de redes de distribución de aguas sanitarias o de aguas industriales, de circuitos de refrigeración de instalaciones industriales, o de redes de aire acondicionado, o de cualquier superficie industrial.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** se aplica para el control de la formación de biopelículas en las tuberías de agua, en las superficies que están en contacto o no con productos de alimentación humana o animal.
6. Utilización de un agente desinfectante que contiene protozoos de la especie *Willaertia magna*, como biocida sobre las *Listeria* a excepción de una utilización para el tratamiento aplicado al cuerpo humano o animal.
- 25 7. Utilización de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** los protozoos corresponden a la cepa depositada con el número **PTA 7824** en la ATCC, o a la cepa depositada con el número **PTA 7825** en la ATCC.
8. Utilización de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, **caracterizada por que** se presenta en forma de una solución o de una suspensión acuosa.

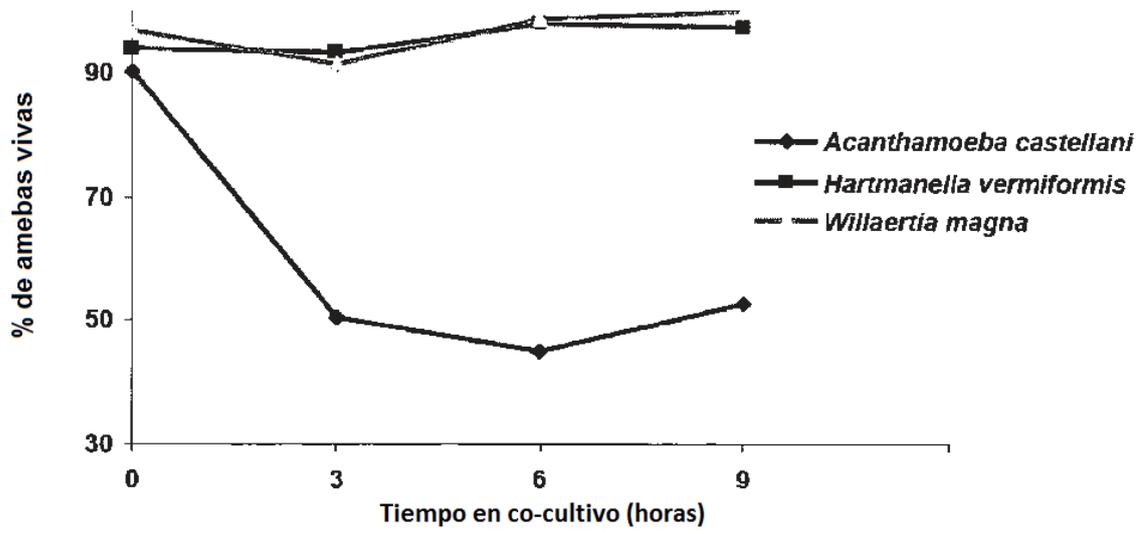


Figura 1

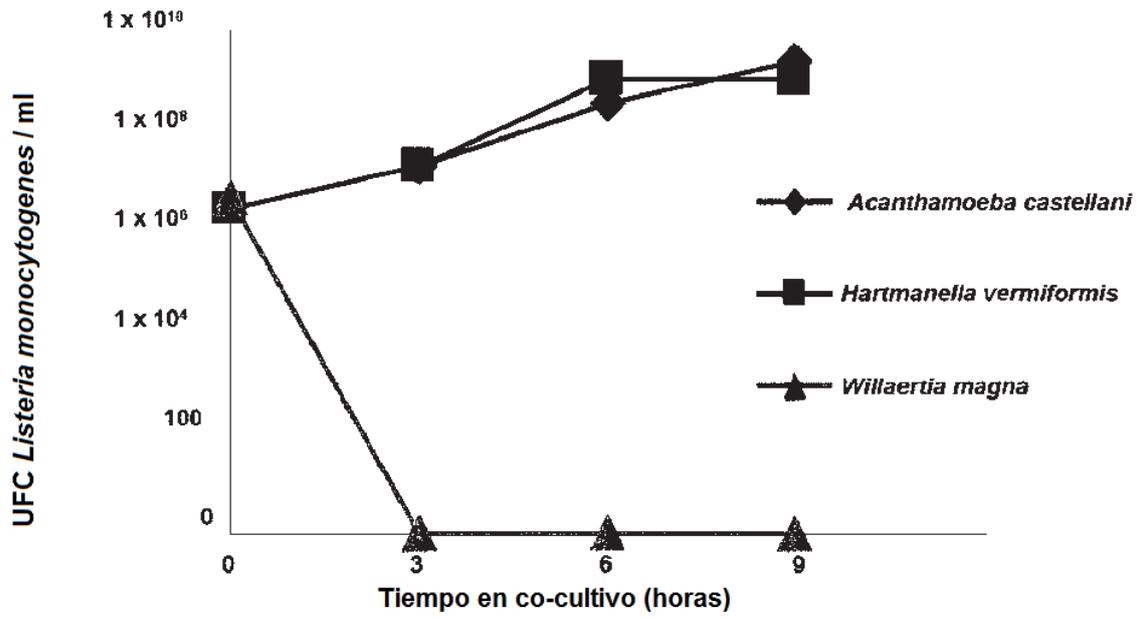


Figura 2

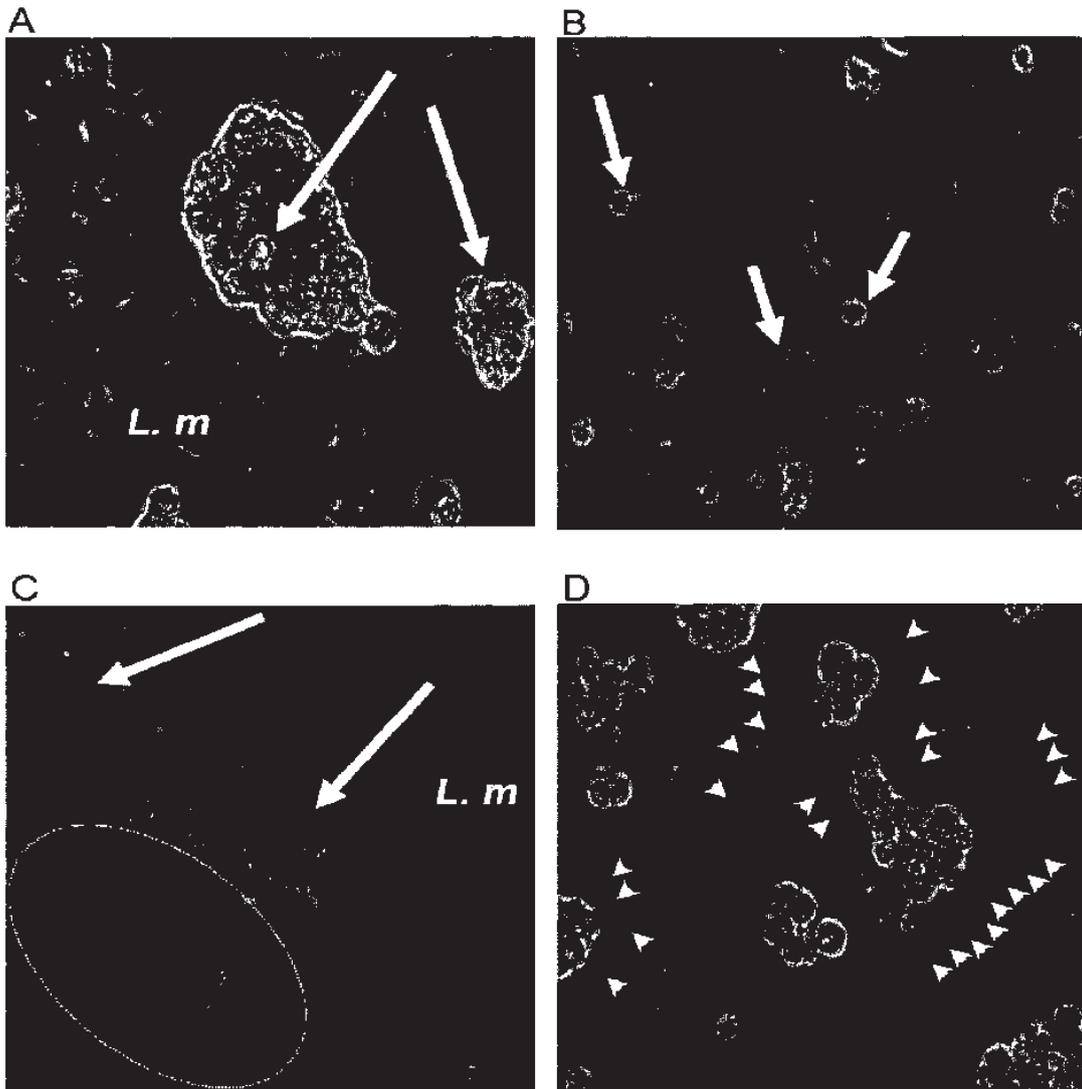


Figura 3