

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 023**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/00** (2006.01)

**A01P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2014 PCT/FR2014/052691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014 E 14824878 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3060058**

54 Título: **Procedimiento de lucha contra Naegleria fowleri, y agente desinfectante que contiene protozoarios de la especie Willaertia magna**

30 Prioridad:

**23.10.2013 FR 1360347**

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

**23.12.2019**

73 Titular/es:

**AMOEBA (100.0%)  
38 Avenue des Frères Montgolfier  
69680 Chassieu, FR**

72 Inventor/es:

**PLASSON, FABRICE y  
MAMERI, MOUH OULHADJ**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 736 023 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 lucha contra *Naegleria fowleri*, y agente desinfectante que contiene protozoarios de la especie *Willaertia magna*

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un novedoso procedimiento de lucha biológica contra la presencia del género *Naegleria* y, especialmente, de la especie *Naegleria fowleri*, y su proliferación.

10 **Estado de la técnica**

*Naegleria fowleri* (N.f.) es una ameba libre que pertenece a la familia de las *Vahlkampfiidae*. Esta ameba es responsable de una patología muy grave en el ser humano, que afortunadamente es muy rara (235 casos detectados en 2007): la meningoencefalitis amebiana primitiva (MEAP) (Cervantes-Sandoval I, 2008; Kemble SK, 2012; TW, 2010; Su MY, 2013). La infección por estas amebas libres tiene un pronóstico letal en una semana aproximadamente, y de varias semanas con tratamiento antibiótico (Su MY, 2013). No existe ningún tratamiento verdaderamente eficaz contra esta infección, aunque afortunadamente, la enfermedad es rara y, para desarrollar la MEAP, deben cumplirse condiciones específicas. Estas condiciones especiales, así como el inóculo necesario, son aún poco conocidas en la actualidad. Sin embargo, algunos medicamentos y antibióticos parecen tener influencia sobre la evolución de la infección, tales como la anfotericina B, la rifampicina y el miconazol que, asociados, han demostrado su eficacia en 2 o 3 personas. En 1992, la bibliografía notificaba solamente siete casos de supervivencia después de MEAP (Gautam PL, 2012) y solamente en sujetos muy jóvenes de 2 a 14 años y en los que el tratamiento y la infección dejaron secuelas neurológicas más o menos importantes. La tasa de supervivencia, por tanto, es incluso más baja que para la infección por el virus del Ebola. También, la supervivencia y el control de esta ameba libre constituyen una preocupación cada vez mas importante.

De forma general, se sabe que, en el medio ambiente, *Naegleria fowleri* muestra una distribución ubicua (Martinez AJ, 1997), ya que esta ameba se ha aislado del suelo, en aguas de ríos y de lagos (Jamerson M, 2009) o en aguas de residuos industriales, y de biopelículas (Goudot S, 2012; S.A. Huws, 2005), características que comparte con otras amebas libres. Diferentes bacterias potencialmente patógenas como la *Legionella pneumophila*, han desarrollado mecanismos para sobrevivir y replicarse dentro de las amebas libres (Huang SW, 2010; De Jonckheere, 2011). Además, se ha demostrado que las centrales nucleares participan activamente en el desarrollo de la ameba *Naegleria fowleri* produciendo un recalentamiento de varios grados en aguas litorales. Efectivamente, la ameba *Naegleria fowleri* es termófila, con intervalos de temperaturas de desarrollo comprendidas de 25 °C a 45 °C (Visvesvara GS, 2007).

EDF, que explota más de 11 centrales nucleares en Francia, ha calificado el riesgo relativo según el índice de *Naegleria fowleri* detectado en las aguas.

40 Para aprehender mejor este riesgo, la Direction des Etudes et Recherches y el Service des Etudes Médicales de EDF han calculado el riesgo de fallecimiento por MEAP durante un baño, dependiendo de la concentración de *Naegleria fowleri* en el agua. Este riesgo se puede descomponer de la siguiente forma:

45 riesgo por 1 baño = probabilidad de inhalar "n" *Naegleria fowleri* mientras una persona se baña en una agua en la que *Naegleria fowleri* está presente a una concentración "c" (10 ml de agua inhalada por baño) multiplicado por probabilidad de fallecimiento cuando se han inhalado "n" *Naegleria fowleri* (modelización según datos en animales).

50 Cuando se selecciona el modelo log normal, que proporciona las estimaciones más bajas, y que se asemeja bastante a los datos reales (Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda), se obtienen los riesgos siguientes:

**Concentración Riesgo para una cantidad n de N.f. en el agua de baño**

1 *Naegleria fowleri*/litro, riesgo =  $10^{-8}$  es decir, un fallecimiento en 100 millones de baños  
 10 *Naegleria fowleri*/litro, riesgo =  $1,45 \times 10^{-7}$  es decir, un fallecimiento en 7 millones de baños  
 55 100 *Naegleria fowleri*/litro, riesgo =  $7,24 \times 10^{-6}$  es decir, un fallecimiento en 140.000 baños  
 1000 *Naegleria fowleri*/litro, riesgo =  $1,34 \times 10^{-3}$  es decir, un fallecimiento en 746 baños

De acuerdo con las recomendaciones del Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF), la superación del nivel límite de 100 *Naegleria fowleri* (N.f.) por litro debe llevar a la prohibición de la práctica del baño (cf. especialmente aviso del CSHPF del 4 de mayo de 2004 relativo al retorno de la experiencia de los tratamientos antiamebas mediante monoclóramina realizados en 2003 por EDF en centrales nucleares de producción de electricidad (CNPE) de Bugey, Chooz, Dampierre, Golfech y Nogent).

65 En este contexto, los inventores han puesto de manifiesto, de forma completamente inesperada, que los protozoarios de la especie *Willaertia magna* 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 erradica las amebas libres *Naegleria fowleri*. Este efecto biocida duplica la capacidad de predación ya mostrada de *Willaertia magna* respecto de otros agentes bacterianos como las

bacterias *legionella pneumophila*, *Pseudomonas* y *Listeria* (Bodennec Jacques 2006).

**Objeto de la invención**

5 La presente invención tiene por objeto, en primer lugar, un procedimiento de lucha contra la proliferación de *Naegleria*, especialmente *Naegleria fowleri*, que utiliza protozoarios de la especie *Willaertia magna* 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. Los procedimientos de acuerdo con la invención no incluyen métodos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o de un animal. En el procedimiento de acuerdo con la invención, lo más frecuente es que un fluido gaseoso o líquido se trate con los protozoarios de la especie *Willaertia magna* 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. Aunque también se puede tratar de una superficie sólida.

15 El procedimiento de acuerdo con la invención, en particular, es de aplicación en la desinfección de redes de distribución de aguas residuales o de aguas industriales, en los circuitos de refrigeración, por ejemplo, del tipo nuclear, de instalaciones industriales, o de redes de climatización. Se puede aplicar para luchar contra la formación de biopelículas en las canalizaciones de agua, de superficies en contacto o no con artículos alimentarios para seres humanos o animales.

20 Los protozoarios se pueden añadir directamente a las aguas o a los líquidos que circulan por las canalizaciones o en las redes a tratar. También es posible pulverizarlos, por ejemplo, en forma de una solución acuosa en aerosol, en las redes, chimeneas, instalaciones y superficies industriales a desinfectar.

25 Los protozoarios utilizados en el marco de la invención corresponden a la cepa depositada el 21 de agosto de 2006 con el número PTA 7824 en la ATCC o a la cepa depositada el 21 de agosto de 2006 con el número PTA 7825 en la ATCC, habiéndose depositado dichas cepas a nombre del CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) - 3 rue Michel Ange - 75794 PARÍS CEDEX 16 / Francia y de la UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD - 43 Boulevard du 11 Novembre 1918 - 69622 VILLEURBANNE Cedex / Francia.

30 Dichas cepas depositadas también se describen en la publicación de solicitud internacional PCT WO2008/043969.

Dichos protozoarios se podrán utilizar, por tanto, como agentes desinfectantes, especialmente destinados a la eliminación de las amebas *Naegleria fowleri* y a luchar contra la proliferación y la contaminación por *Naegleria fowleri*.

35 Por otra parte, la invención utiliza un agente desinfectante que contiene protozoarios de la especie *Willaertia magna* 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. De forma ventajosa, el agente desinfectante se presenta en forma de una solución o suspensión acuosa, por ejemplo, en agua destilada. El agente desinfectante se puede presentar en forma pulverizable, por ejemplo, en aerosol o cualquier otro medio de aerosol.

40 La actividad de los protozoarios de la especie *Willaertia magna* 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, que inhiben la proliferación de *Naegleria fowleri* se puso de manifiesto por los inventores comparando la replicación de *Naegleria fowleri* en presencia y ausencia de los protozoarios de la especie *Willaertia magna* correspondiente 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.

50 Los inventores también han demostrado el carácter único de esta inhibición del crecimiento de *Naegleria fowleri* mediante los protozoarios de la especie *Willaertia magna* correspondientes 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 utilizando otra especie de ameba libre, *Acanthamoeba*, como cepa de control que no produce ninguna inhibición del crecimiento de *Naegleria fowleri*.

Dada la ausencia de tratamiento curativo o profiláctico y del riesgo que supone *Naegleria fowleri* para el ser humano con una tasa de mortalidad superior al 95 % en menos de una semana, la presente invención supone un avance científico importante para luchar contra esta plaga amebiana con un impacto neutro sobre el medio ambiente y el ser humano. Efectivamente, se reconoce en la actualidad que la cepa *Willaertia magna* no tiene clase ni categoría de peligro, no tiene indicaciones de peligro o consejos de prudencia según el reglamento CE n.º 1271/2008 a diferencia de la monocloramina, actualmente utilizada.

60 Además, la presente invención se refiere al uso del agente desinfectante como biocida para las *Naegleria*.

**Descripción detallada de la invención**

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

65 1. MATERIAL Y MÉTODOS

**1.1. Cepas utilizadas:**

- **Amebas:** las cepas utilizadas pertenecen a tres especies amebianas diferentes:

- 5 ○ *Naegleria fowleri* (ATCC 30809)
- *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010)
- *Willaertia magna* (cepas depositadas en la ATCC con los n.º PTA 7824 y PTA 7825).

10 Estas tres cepas se cultivaron anéxicamente, en presencia de un 10 % de suero de feto de ternera, en medio SCGYEM (medio suero-caseína-glucosa-extracto de levadura), distribuido en tubos GREINER™ a razón de 3 ml por tubo. Entretanto, las formas vegetativas se repicaron cada 8-9 días. Para los cultivos simultáneos, se utilizaron repicados de 3 a 4 días para disponer de trofozoítos en la fase completa de crecimiento exponencial.

15 El SCGYEM se obtiene de la siguiente forma:

➤ Caseína (MERCK 1.02244.010)	10 g
➤ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,325 g
➤ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8 g
➤ Glucosa	2,5 g
➤ Extracto de levadura (DIFCO 0127-17-9)	5 g
➤ Agua destilada	900 ml
➤ Suero de feto de ternera	100 ml

A 900 ml de agua destilada, se añadieron 2,5 ml de NaOH (1 N), después Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Tras haberse calentado ligeramente en una placa calefactora, la caseína se añadió progresivamente con agitación magnética. Tras disolución de la caseína, se incorporaron la glucosa y el extracto de levadura.

20 Tras la disolución completa, el medio se filtró sucesivamente con fibra de vidrio (SARTORIUS SM 6513400), después sobre membrana de 1 µm (WHATMAN 7190 004). A continuación, el medio se distribuyó en alícuotas en frascos de vidrio. Los frascos se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Tras la utilización definitiva y reparto del medio, el suero de feto de ternera a razón del 10 % del volumen final se añadió de forma estéril en una campana de flujo laminar.

**1.2. Preparación de las suspensiones madre de amebas *Willaertia magna* y *Naegleria fowleri*:**

30 La preparación de cada suspensión de amebas inicial (suspensión madre) se realizó a partir de 4 frascos (T 175 ml) de cultivo anéxico de cada ameba cultivada en medio SCGYEM. Estas suspensiones de amebas madre de *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* y *Willaertia magna* se recogieron al finalizar la fase de crecimiento exponencial, que se obtiene generalmente a los 4 - 5 días después del inicio del cultivo.

35 Para aumentar la concentración amebiana recogida, los frascos se colocaron sobre un baño de hielo durante 5 a 10 minutos, después se agitaron manualmente para recoger tantas amebas como fuera posible.

El contenido de los 4 frascos se reunió para contar la suspensión amebiana obtenida en una celda de THOMA ([C]/ml).

40 Las suspensiones amebianas se transfirieron a un tubo de 50 ml de tipo FALCON® para eliminar el medio de cultivo SCGYEM por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. Los aglomerados amebianos procedentes de la primera centrifugación se enjuagaron dos veces por lavado con agua destilada estéril y se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos. A finalizar los 2 lavados, el aglomerado final se recogió en un volumen de agua estéril de 40 ml.

**1.3. Puesta de manifiesto del efecto biocida de *Willaertia magna* sobre *Naegleria fowleri* (cepa ATCC 30809):**

45 Los cultivos simultáneos amebianos se realizaron en frascos T 25 ml que contenían 10 ml de medio PAS (suero salino de ameba de Page) estéril. La siembra de los frascos de cultivos simultáneos amebianos se realizó a razón de  $1 \times 10^5$  *Willaertia magna*/ml y  $1 \times 10^5$  *Naegleria fowleri*/ml a partir de suspensiones amebianas anéxicas previamente contadas en un hematómetro Malassez. La infestación de las *Willaertia magna* por *Naegleria fowleri* se llevó a cabo fijando una proporción de *Naegleria fowleri* / *Willaertia magna* de 1. Los frascos T25 ml se incubaron en una estufa a 30 °C.

50 El medio PAS se obtiene de la siguiente forma:

Solución 1:	cantidad para 500 ml de H <sub>2</sub> O	Proveedor	[M]
NaCl (Peso molecular: 58,44)	12,0 g	Fisher S271-3	0,41
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Peso molecular del heptahidrato: 246,47)	0.40 g	Sigma 63138 (heptahidrato)	0,0032

(continuación)

Solución 1:	cantidad para 500 ml de H <sub>2</sub> O	Proveedor	[M]
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Peso molecular: 219,08)	0,60 g	Sigma 442909-1 kg	0,0055

Solución 2:			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Peso molecular anhidro: 141,96)	14,20 g	Fluka 71629-100 g	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Peso molecular anhidro: 136.09)	13,60 g	Sigma P5655	0,2

5 Esterilizar por filtración las soluciones 1 y 2 mediante un filtro de 0,22 µm. Para obtener 1 litro de medio PAS: añadir 5,0 ml de la solución 1 y 5,0 ml de la solución 2 después ajustar el volumen a 1 litro con agua destilada estéril.

10 Los monocultivos amebianos testigo *Willaertia magna* y *Naegleria fowleri* se cultivaron por separado en frascos T de 25 ml en 10 ml de medio PAS estéril. La siembra de los frascos se realizó a razón de 1 x 10<sup>5</sup> *Willaertia magna*/ml para el testigo *Willaertia magna* y 1 x 10<sup>5</sup> *Naegleria fowleri*/ml para el testigo *Naegleria fowleri* a partir de suspensiones amebianas anéxicas previamente contadas en un hematómetro de Malassez. Los frascos T25 ml testigo se incubaron en una estufa a 30 °C.

15 Cada condición se realizó por triplicado. Cada recuento en la celda de Mallassez se repitió 5 veces. El experimento se renovó tres (3) veces en un periodo de 3 meses.

La evolución de las amebas *Naegleria fowleri* y *Willaertia magna* en el cultivo simultáneo y en los frascos testigo se determinó de la siguiente forma:

20 Las concentraciones ambientales se siguieron durante 120 horas después de la infestación por *Naegleria fowleri*. En cada intervalo de tiempo (cada 3 horas y después cada 24 horas), los frascos de cultivo simultáneo y de testigo se recogieron y se examinaron a la vez desde el punto de vista del crecimiento celular de las dos amebas y de su estado morfológico y dinámico. Para cada frasco examinado:

- La cuantificación de las amebas se realizó directamente en la celda de Malassez.
- A 120 horas, el bajo índice de las amebas *Naegleria fowleri* no permitió ya un recuento fiable en la celda de Mallassez, ese es el motivo del uso conjunto del método NMP (número más probable). Este método, muy utilizado para el recuento de amebas, tiene la ventaja de ser más preciso, y también de discriminar entre las amebas íntegras y vivas de las amebas íntegras pero muertas.

## 2. RESULTADOS

30 Las **Figuras 1, 2 et 3** muestran los experimentos de cultivo simultáneo (*Willaertia magna* / *Naegleria fowleri*) y de monocultivos testigo de las amebas.

35 Muestran la evolución espontánea de las poblaciones respectivas de las amebas *Willaertia magna* y *Naegleria fowleri* tras disposición en cultivo simultáneo a una relación *Willaertia/Naegleria* inicial de 1 frente a la evolución de las respectivas poblaciones de amebas en monocultivo.

40 Las **Figuras 4a et 4b** muestran el estado fisiológico de las amebas *Naegleria fowleri* con el tiempo en presencia de las amebas *Willaertia magna*. La figura 4a corresponde a imágenes de la degradación fisiológica rápida de las *Naegleria fowleri* en cultivos simultáneos con *Willaertia magna*. La figura 4b corresponde a imágenes que muestran el fenómeno del "beso de la muerte" de una *Willaertia magna* sobre una *Naegleria fowleri*.

45 La **Figure 5** muestra unos experimentos de cultivo simultáneo (*Acanthamoeba castelanii* / *Naegleria fowleri*) y de monocultivos testigo de las amebas.

En las figuras 1, 2 y 3, la curva con puntos en forma de rombo (◈) denominada *Willaertia magna* describe la concentración medida de *Willaertia magna* cultivada en solitario en un medio PAS estéril.

50 La curva con puntos en forma de cuadrado (■) denominada *Naegleria fowleri* describe la concentración medida de *Naegleria fowleri* cultivada en solitario en un medio PAS estéril.

La curva con puntos en forma de triángulo (Δ) denominada *W +NF* describe la concentración medida de *Willaertia magna* en cultivo simultáneo con *Naegleria fowleri* en un medio PAS estéril.

La curva con puntos en forma de cruz (X) denominada *NF + W* describe la concentración medida de *Naegleria fowleri* en cultivo simultáneo con *Willaertia magna* en un medio PAS estéril.

Los datos se expresan como concentración de células íntegras por mililitro (ml), contadas en celdas de Mallassez.

5 En la figura 4a, las flechas negras indican la presencia de *Willaertia magna* y las flechas blancas la presencia de *Naegleria fowleri* enteras o en trozos.

10 En la figura 4b, la flecha negra indica la presencia de *Willaertia magna* y la flecha blanca de *Naegleria fowleri*. El círculo blanco materializa los contornos de la célula de *Naegleria fowleri*. Este fenómeno de "beso de la muerte" se ha descrito en la bibliografía (Berke G. Source Department of Cell Biology, 1995) como un contacto que permite el paso de granzima, que produce la apoptosis de la célula diana.

15 En la figura 5, la curva A compuesta por puntos en rombo (◆) representa un monocultivo de *Acanthamoeba castellanii*.

La curva A + NF compuesta por puntos en triángulo (Δ) representa la concentración de *Acanthamoeba castellanii* en cultivo simultáneo con *Naegleria fowleri*.

20 La curva NF compuesta por puntos en cuadrado (■) representa un monocultivo de *Naegleria fowleri*.

La curva NF +A compuesta por puntos en cruz (X) representa la concentración de *Naegleria fowleri* en cultivo simultáneo con *Acanthamoeba castellanii*.

25 **2. 1. Willaertia magna inhibe completamente el crecimiento de Naegleria fowleri.**

Como se indica por las curvas con cruces de las **figuras 1, 2 y 3** que representan la evolución de las *Naegleria fowleri* en cultivo simultáneo con des *Willaertia magna*, muy rápidamente hacia las 24 horas, se produce un descuelgue en la curva de población de *Naegleria fowleri*. Esta disminución en la población de *Naegleria fowleri* se observa solamente en presencia de *Willaertia magna*. Las curvas testigo (curvas con puntos en cruz) de *Naegleria fowleri* en monocultivo en los experimentos 1, 2 y 3 (**figuras 1, 2 et 3**) a 24 horas siguen en crecimiento. Además, la tasa de *Naegleria fowleri* en monocultivo prácticamente se duplica en 24 horas.

35 Hecho notable, la observación microscópica, confirma un cambio morfológico crucial de las *Naegleria fowleri* en cultivo simultáneo con las *Willaertia magna* a partir de 24 horas (figura 4). El estado fisiológico de la célula *Naegleria fowleri* pasa de una forma de protozoito extendido a una forma más redonda estresada, pero no pertenece aún a la forma de quiste. El interior de la célula de *Naegleria fowleri* se vuelve opaco, enmascarando las vacuolas internas, signo de crecimiento de las amebas. Las células de *Naegleria fowleri* en presencia de *Willaertia magna* tienen un tamaño inferior a la mitad a la del monocultivo de 3 horas de cultivo simultáneo (figura 4a). El modo de predación de las amebas *Willaertia magna* se basa en la fagocitosis. La figura 4b muestra en las primeras 24 horas un fenómeno de inhibición parecido al "beso de la muerte". La fagocitosis de *Naegleria fowleri* por *Willaertia magna* se produce bien, pero solamente después de 25 horas de cultivo simultáneo confirmado por la presencia de *Willaertia magna* que contiene los fagosomas de *Naegleria fowleri* (no se muestran los datos).

45 El conjunto de los experimentos realizados muestra un efecto de inhibición máximo con una eliminación completa de las *Naegleria fowleri* en 120 horas. La lectura en la celda de Mallassez a las 120 horas cuenta las células de *Naegleria fowleri* presentes e íntegras, pero no puede discriminar, mediante este recuento, entre células vivas y células muertas. Una doble lectura en gelosa NNA + E.coli permite el recuento de células de *Naegleria fowleri* vivas solamente procedentes de la forma de trofozoito y/o de formas de tipo quiste.

50 La tabla siguiente indica las concentraciones de amebas (*Naegleria fowleri*) obtenidas por lectura en las celdas de Mallassez y las obtenidas según el método NPP.

Una alícuota de cada frasco procedente de los experimentos 1, 2 y 3 (cf. figuras 1 a 3) del cultivo simultáneo *Willaertia magna* / *Naegleria fowleri* tomada 120 horas después de la infección realizadas sobre gelosas NNA revestida de un tapiz de E.coli.

La determinación de la concentración de cada especie se mide por el recuento del número de frentes marcados por placa, y llevados a la tabla de NMP para deducir de ella la concentración de amebas.

60 Nf = *Naegleria fowleri*  
W.m = *Willaertia magna*

	Medida a 120 horas por el método NMP (límite de cuantificación = 4 Nf/l)	Medida a 120 horas por recuento en celda de Malassez (límite de cuantificación = 0,2 10 <sup>4</sup> Nf/l)
--	---	--

Experimento de 1 cultivo simultáneo Nf y W.m (figura 1)	< 201 Nf/l	0 x 10 <sup>4</sup> Nf/ml
Experimento de 2 cultivo simultáneo Nf y W.m (figura 2)	< 201 Nf/l	0,53 x 10 <sup>4</sup> Nf/ml
(continuación)		
	Medida a 120 horas por el método NMP (límite de cuantificación = 4 Nf/l)	Medida a 120 horas por recuento en celda de Malassez (límite de cuantificación = 0,2 10 <sup>4</sup> Nf/l)
Experimento de 3 cultivo simultáneo Nf y W.m (figura 3)	< 201 Nf/l	3,3 x 10 <sup>4</sup> Nf/ml

Esta tabla confirma la ausencia de frentes de *Naegleria fowleri* en las gelosas NNA, lo que indica la ausencia de *Naegleria fowleri* en forma de quiste o de trofozoito vivas a las 120 horas.

5 Los inventores han puesto de manifiesto que el carácter inesperado de un efecto biocida de los protozoarios de la especie *Willaertia magna* 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 en género *Naegleria* y más especialmente sobre la especie *Naegleria fowleri* no se comparte por otras especies amebianas. Como se indica en la figura 5, un cultivo simultáneo de los géneros de amebas *Acanthamoeba castellanii* y *Naegleria fowleri* no indujo incidencia alguna sobre la concentración respectiva de ambas especies respecto de la concentración medida de estas especies en monocultivo. Esta figura muestra la ausencia de acción recíproca de otro género amebiano, de tipo *Acanthamoeba* sobre la evolución de la población de *Naegleria fowleri* durante una puesta en cultivo simultáneo de estas dos amebas.

15 *Willaertia magna* tiene exclusivamente esta característica de inhibición del crecimiento de las amebas *Naegleria* y más especialmente de la especie *Naegleria fowleri*.

#### Bibliografía

- 20 **Bodennec Jacques, Pernin Pierre, Dey Rafick.** Novel method for biologically combating the proliferation of Legionella pneumophila, and novel disinfecting agent containing amoebic protozoa of the Willaertia genus. Patente francesa 2906968. 12 10 2006.
- Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Garcia-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. "Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis". Parasitol Int, 57 (2008): 307 e13.
- 25 De Jonckheere. "Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoebic flagellate *Naegleria fowleri*". Infect Genet Evol. 11, n.º(7) (Oct; 2011): 1520-8.
- Gautam PL, Sharma S, Puri S, Kumar R, Midha V, Bansal R. "A rare case of survival from primary amoebic meningoencephalitis". Indian J Crit Care Med. 16, n.º(1) (Ene; 2012): 34-6.
- Goudot S, Herbelin P, Mathieu L, Soreau S, Banas s, Jorand F. "Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm". Water res. 46, n.º(13) (Sep; 2012): 3958-66.
- 30 Huang SW, Hsu BM. "Survey of *Naegleria* and its resisting bacteria-Legionella in hot spring water of Taiwan using molecular method". Parasitol Res. 106, n.º (6) (Mayo 2010): 1395-402.
- Jamerson M, Remmers K, Cabral G, Marciano-Cabral F. "Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amoebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant". Parasitol Res. 104, n.º(5) (Abr; 2009): 969-78.
- 35 Kemble SK, Lynfield R, DeVries AS et al. "Fatal *Naegleria fowleri* infection acquired in Minnesota: possible expanded range of a deadly thermophilic organism". Clin Infect Dis 54 (2012): 805-809.
- Martinez AJ, Visvesvara GS. "Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas". Brain Pathol. 7, n.º(1) (Ene; 1997): 583-98. Review.
- S.A. Huws, A.J. McBain y P. Gilbert. "Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities". Journal of Applied Microbiology 2005, 98, 238-244 98 (2005): 238-244.
- 40 Su MY, Lee Shyu LY, Lin WC, Hsiao PC, Wang CP, Ji DD, Chen KM, Lai SC. "A fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in Taiwan". Korean J parasitol. 51, n.º (2) (Abril 2013): 203-206.
- TW, Heggie. "Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters". Travel Med Infect Dis 8 (2010): 201-206.
- 45 Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. "Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*". FEMS Immunol Med Microbiol 50 (2007): 1-26.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de lucha contra la proliferación de amebas del género *Naegleria*, salvo métodos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o de un animal, **caracterizado por que** utiliza protozoarios de la especie *Willaertia magna* correspondientes 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.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, para luchar contra la proliferación de la especie *Naegleria fowleri*.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** se trata un flujo gaseoso o líquido, o una superficie sólida, con protozoarios de la especie *Willaertia magna*.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** se aplica en la desinfección de redes de distribución de aguas residuales o de aguas industriales, de circuitos de refrigeración de instalaciones industriales o nucleares, o de redes de climatización.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** se aplica para luchar contra la formación de biopelículas en las canalizaciones de agua, de superficies en contacto o no con artículos alimentarios para seres humanos o animales.
- 25 6. Utilización de un agente desinfectante que contiene protozoarios de la especie *Willaertia magna*, como biocida para las *Naegleria*, salvo un uso para el tratamiento aplicado al cuerpo humano o de un animal, **caracterizado por que** los protozoarios 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.
7. Uso según la reivindicación 6, **caracterizado por que** el agente desinfectante se presenta en forma de una solución o una suspensión acuosa.



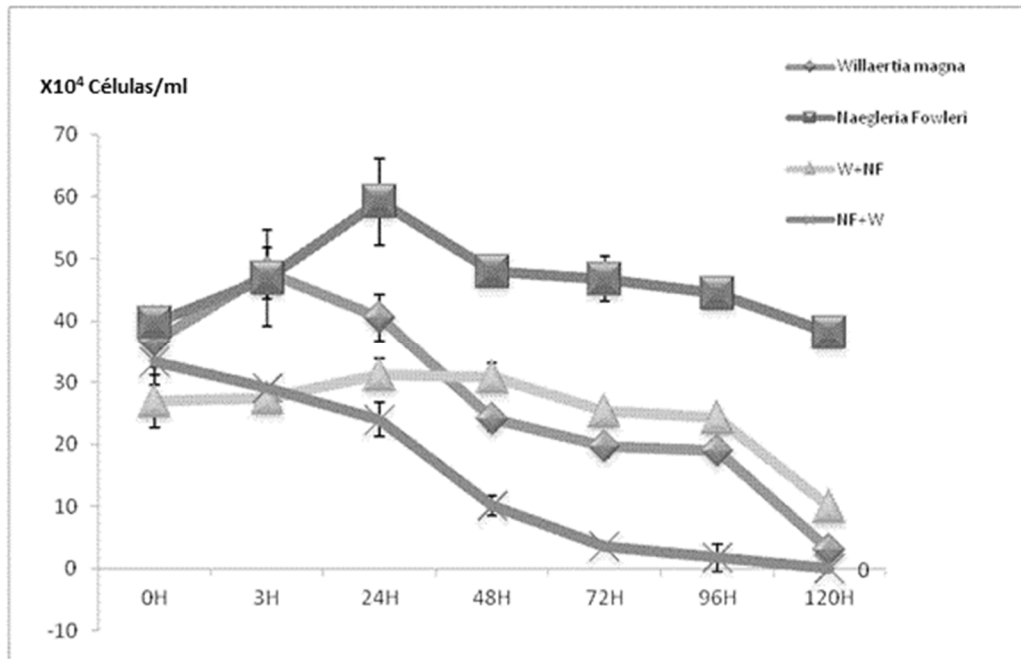


Figura 1

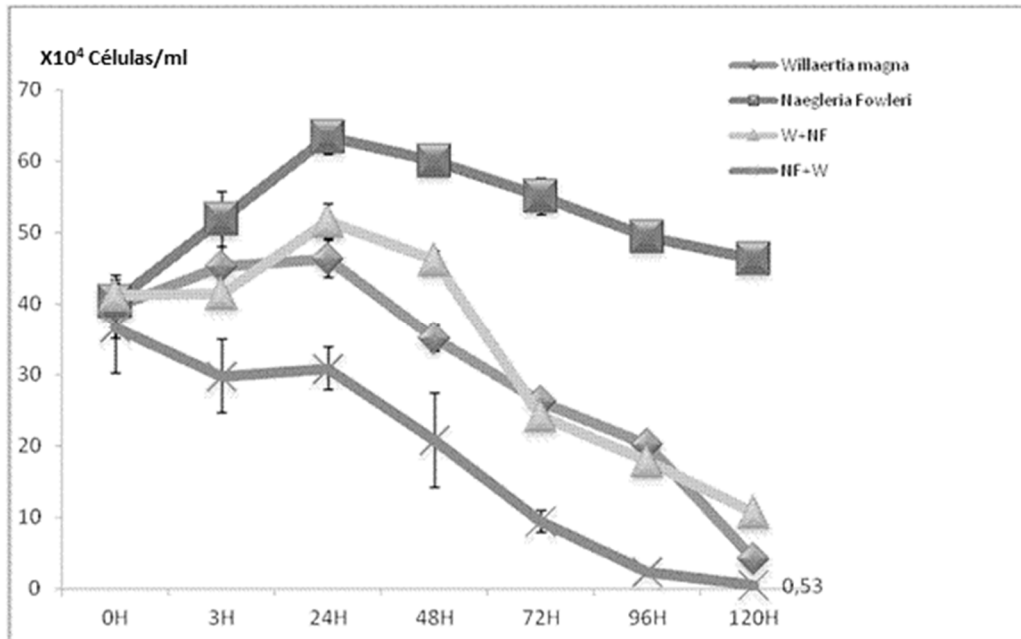


Figura 2

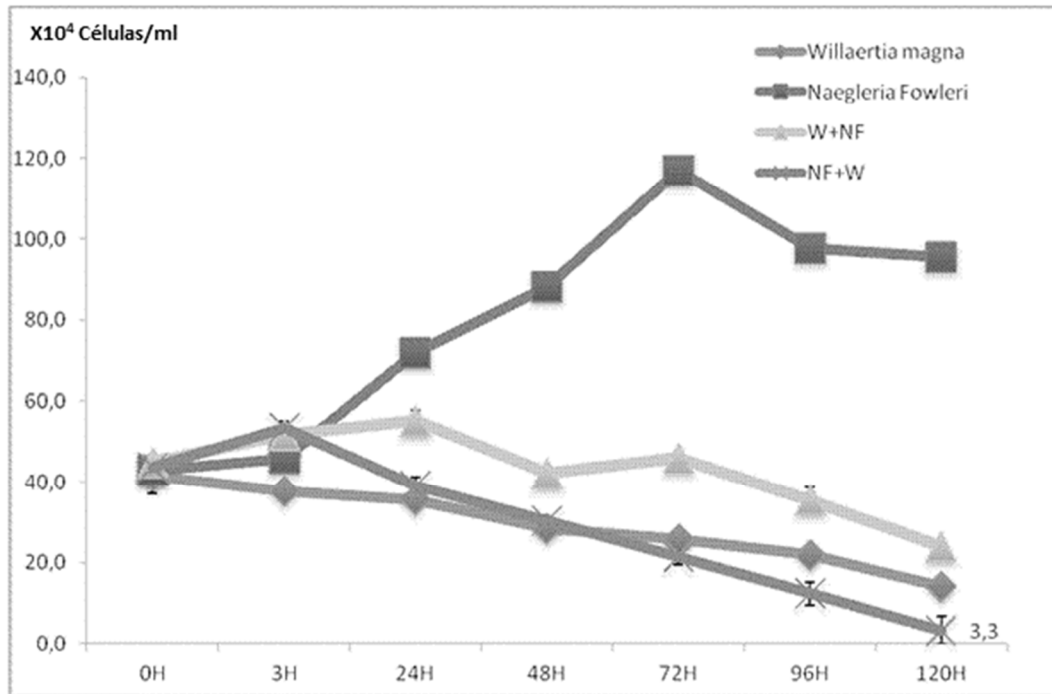
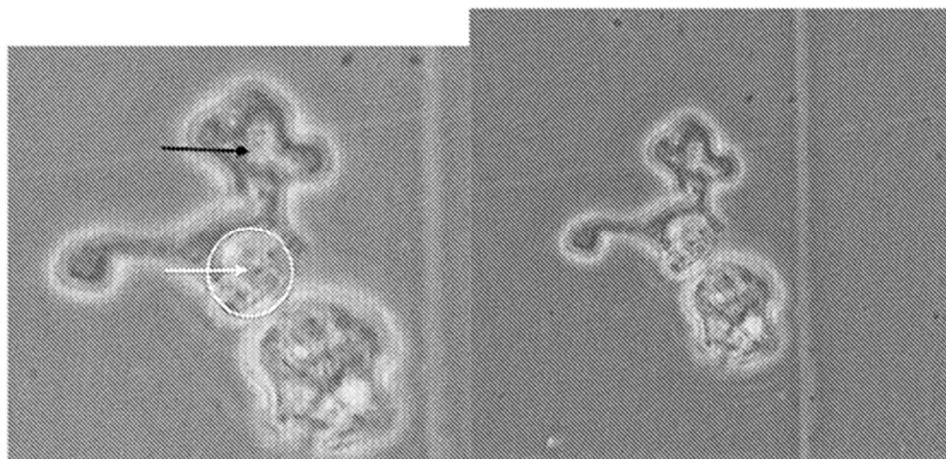
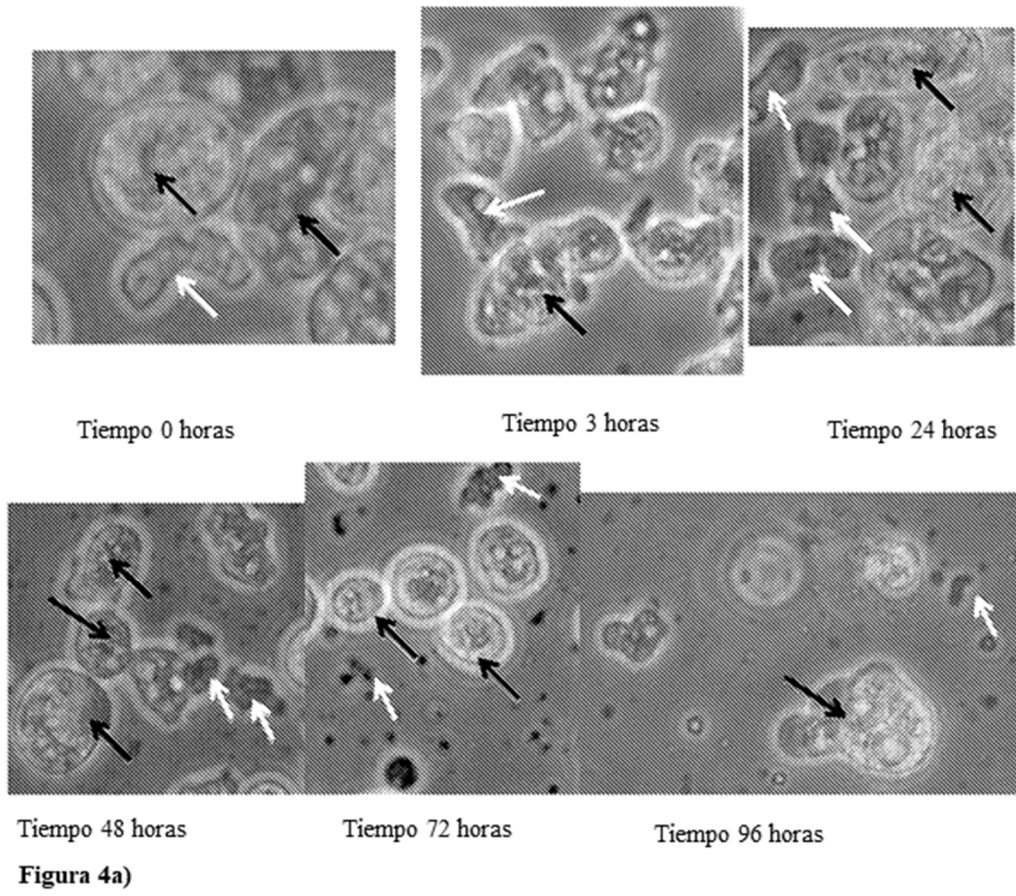


Figura 3



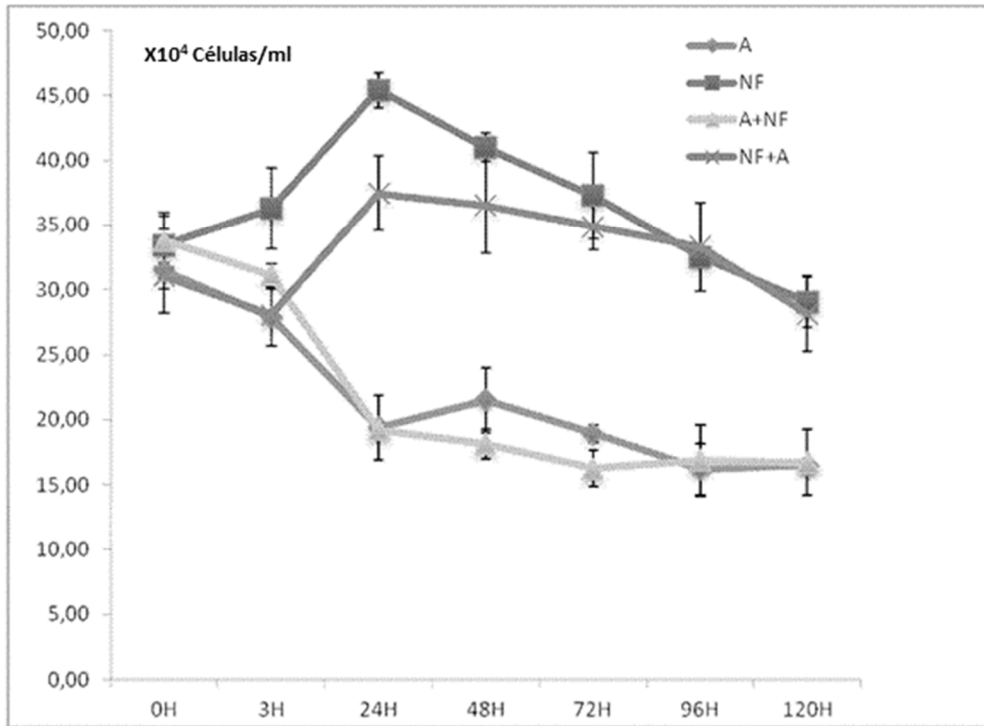


Figura 5