



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 323**

51 Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07858561 .9**

96 Fecha de presentación : **12.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2077723**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2009**

54 Título: **Nuevo procedimiento de lucha biológica contra la proliferación de *Legionella pneumophila*, y nuevo agente desinfectante que contiene protozoos amebianos del género *Willaertia*.**

30 Prioridad: **12.10.2006 FR 06 54222**

73 Titular/es: **University Claude Bernard Lyon I
43, boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cédex, FR**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.01.2011

72 Inventor/es: **Bodennec, Jacques;
Pernin, Pierre y
Dey, Rafik**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.01.2011

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 350 323 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

Nuevo procedimiento de lucha biológica contra la proliferación de *Legionella pneumophila*, y nuevo agente desinfectante que contiene protozoos amebianos del género *Willaertia*.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de lucha biológica contra la proliferación de *Legionella pneumophila*, y constituye así un procedimiento original para luchar contra la proliferación de la bacteria patógena.

Legionella pneumophila, responsable en el hombre de la legionelosis, es una bacteria gram-negativa, que se caracteriza por una replicación intracelular facultativa en el interior de los macrófagos pulmonares. La legionelosis es una enfermedad que ha afectado a 1.200 personas en Francia en 2004, causando la muerte de 130 enfermos. Además, la vigilancia y la prevención de la legionelosis constituyen una preocupación cada vez más importante. Más allá del problema de salud pública, la presencia de la bacteria en las aguas de instalaciones industriales impone una vigilancia restrictiva e importantes pérdidas de explotaciones en caso de parada de estas instalaciones impuesta en el marco reglamentario.

En el medio ambiente, *L. pneumophila* presenta una distribución hídrica ubicua asociada a una relativa termofilia, características que comparte con las amebas libres. ROWBOTHAM en 1980 (ROWBOTHAM, T.J. J. Clin. Pathol. (1980) 33: 1179-1183), por analogía con lo que se observa en el hombre, ha sido el primero en suponer y demostrar la existencia de una multiplicación intracelular de *Legionella pneumophila* en el interior de células de protozoos como las amebas libres. Posteriormente, numerosos ensayos de cocultivos realizados en medio líquido han demostrado una proliferación muy importante de legionelas en presencia de amebas. Otros argumentos de tipo indirecto acuden asimismo a reforzar la existencia de interacciones entre amebas libres y legionelas. Así, durante las epidemias de legionelosis, han podido aislarse legionelas y amebas libres simultáneamente a partir de las aguas implicadas (BARBAREE y col. Appl. Environ. Microbiol. (1986) 51: 422-424; BREIMAN y col. JAMA (1990) 263: 2924-2926). SANDEN y col. en Environ. Microbiol. (1992) 58: 2001-2004 indican que el aislamiento de las legionelas a partir del agua se mejora acusadamente mediante una simple incubación de las muestras de agua en presencia de amebas. Finalmente, STEINERT y col. (STEINERT y col. Appl. Environ. Microbiol. (1997) 63: 2047-2053) muestran que la adición de amebas es capaz incluso de provocar la reviviscencia de cepas de legionelas no detectables en las condiciones habituales ya que se vuelven no cultivables, aunque siempre viables (VBNC), debido a una estancia demasiado prolongada en un medio empobrecido como agua destilada.

FIELDS (Trends Microbiol. (1996) 4: 286-290) ha enumerado 13 especies de amebas libres y 2 especies de ciliados susceptibles de asegurar la multiplicación de *L. pneumophila*. Pero en la práctica, los estudios realizados *in vitro* han llevado, en la inmensa mayoría de los casos, a sólo tres géneros amebianos: *Acanthamoeba* (ANAND y col. J. Hyg. Camb. (1983) 91: 167-178; HOLDEN y col. Neff. Infect. Immun. (1984) 45: 18-24; VANDENESCH y col. Zbl. Bakt. (1990) 272: 265-275; MOFFAT y TOMPKINS Infect. Immun. (1992) 60: 296-301; BOZUE y JOHNSON, Infect. Immun. (1996) 64: 668-673; GAO y col. Infect. Immun. (1997) 65: 4738-4746; NEUMEISTER y col. Appl. Environ. Microbiol. (1997) 63: 1219-1224), *Hartmannella* (KING y col. Infect. Immun. (1991) 59: 758-763; ABU KWAIK, Appl. Environ. Microbiol. (1996) 62: 2022-2028; ABU KWAIK y col. Infect. Immun. (1994) 62: 1860-1866 y Appl. Environ. Microbiol. (1998) 64: 3134-3139) y *Naegleria* (NEWSOME, Infect. Immun. (1985) 50: 449-452). Con estos géneros, las legionelas se multiplican en gran número en el interior de las amebas en el que se observan en el interior de vacuolas fagocitarias.

Además, mientras se sospecha que las amebas libres favorecen el mantenimiento y la multiplicación de legionelas en medio hídrico, sobre todo en las biopelículas, ningún estudio ha abordado hasta la actualidad las repercusiones en la multiplicación de las legionelas, de las interrelaciones complejas que pueden existir (fenómenos de competencia, de fagocitosis inter-amebiana) entre los diferentes géneros amebianos que cohabitan en el seno de la microfauna amebiana.

Hoy se reconoce que las amebas libres desempeñan el papel de vectores gracias a los cuales las legionelas se desarrollan y se propagan en el medio ambiente. Actualmente, las técnicas usadas para luchar contra las legionelas hacen uso de tratamientos térmicos, de tratamientos físicos (rayos UV) o incluso de tratamientos químicos. No obstante, estos tratamientos no dan entera satisfacción ya que permiten sólo eliminar provisionalmente las bacterias planctónicas de *L. pneumophila* presentes en estado libre en el medio tratado, pero se revelan ineficaces frente a las bacterias presentes y protegidas en el interior de los protozoos.

En este contexto, los autores de la invención han puesto de relieve, de forma totalmente original, que ciertas cepas del género amebiano *Willaertia* detienen la proliferación de las bacterias *L. pneumophila* y que estas cepas presentan igualmente un poder fagocitario frente a otras especies amebianas susceptibles de estar, ellas mismas, infestadas por la bacteria.

La presente invención tiene así por objeto cualquier procedimiento de lucha biológica que usa amebas del género *Willaertia* contra la proliferación de *Legionella pneumophila*. Los procedimientos según la invención no incluyen los procedimientos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o al animal. En el procedimiento según la invención, lo más frecuente es un flujo gaseoso o líquido que se trata con protozoos del género *Willaertia*, y en particular con la especie *Willaertia magna*.

ES 2 350 323 T3

El procedimiento según la invención encuentra, en particular, aplicaciones, en la desinfección de las redes de distribución de agua potable o de aguas industriales, de circuitos de refrigeración de instalaciones industriales, o de redes de climatización. En particular, el procedimiento según la invención podrá implementarse, mediante el añadido de amebas *Willaertia*, para luchar en el seno de biopelículas contra la proliferación de *L. pneumophila* en las canalizaciones de aguas, siendo estas biopelículas un lugar de desarrollo de diferentes especies de amebas. Las amebas *Willaertia* podrán añadirse directamente, en forma de una suspensión de formas vegetativas o de quistes, a las aguas o líquidos que circulan en las canalizaciones o redes para tratar. Igualmente es posible plantear pulverizarlas en aerosol, por ejemplo en forma de una suspensión de quistes, en las torres aerorefrigerantes y en las instalaciones industriales para desinfectar.

En particular, el agente biológico usado corresponde a una de las dos cepas amebianas que pertenecen a la especie *Willaertia magna* depositadas en la ATCC (American Type Culture Collection - Depositario de Patente - 10801 University Boulevard - Manassas, VA 20110 - Estados Unidos) y registradas con los números n° PTA-7824 y n° PTA-7825, el 21 de agosto de 2006. Estas cepas n° PTA-7824 y n° PTA-7825 forman parte integrante de la invención. Estas cepas son de la familia de las Vahlkampfiidae. Se caracterizan por la expresión de seudópodos lobulados, redondeados y emitidos de forma brusca durante el desplazamiento de los individuos. Los individuos en forma vegetativa tienen un tamaño comprendido entre 45 y 100 μm y entre 18 y 25 μm para la forma de quiste. Estos quistes son redondeados, de forma ovoide o a veces muy deformados y poseen de 7 a una decena de poros en su pared. El modo de división es la promitosis.

Dichas amebas, que presentan una actividad especialmente interesante, podrán ser así usadas en agentes desinfectantes, en particular destinados a la eliminación de las bacterias *Legionella pneumophila* y a luchar contra la proliferación y la contaminación por legionelosis.

Según otro de sus aspectos, la invención tiene por objeto un agente desinfectante que contiene amebas que corresponden como preferidas 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 según la invención se presenta en la forma de una solución o de una suspensión acuosa, por ejemplo en agua destilada. El agente desinfectante podrá presentarse en una forma pulverizable, por ejemplo en aerosol.

La actividad inhibidora de estos protozoos amebianos del género *Willaertia*, y en particular de la especie *Willaertia magna*, frente a *L. pneumophila* ha sido puesta de relieve por los autores de la invención comparando la replicación de la bacteria en los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* usados como modelos amebianos de referencia con la observada en el género amebiano *Willaertia*. Además, se ha demostrado igualmente la existencia de un proceso fagocitario de los protozoos del género *Willaertia* frente a otros géneros amebianos.

Dado el papel esencial desempeñado por las amebas libres en la proliferación y el mantenimiento de *L. pneumophila* en el medio exterior, elementos que condicionan la epidemiología de la legionelosis ya que no existe transmisión interhumana, el procedimiento y el agente desinfectante planteado según la invención presentan numerosas ventajas, en términos de coste, de eficacia y de respeto del medio ambiente.

Los ejemplos dados a continuación permiten ilustrar la invención pero no tienen ningún carácter limitativo.

La Figura 1 muestra las cinéticas comparadas del desarrollo de *L. pneumophila* obtenido en cocultivo con diferentes géneros amebianos, entre ellos el género *Willaertia*.

La Figura 2 muestra el efecto de *L. pneumophilla* en las diferentes especies de amebas y la resistencia particular de *Willaertia* con respecto a *Hartmannella* y a *Acanthamoeba*.

La Figura 3 muestra la resistencia de *Willaertia* frente a la citotoxicidad inducida por *L. pneumophilla*. Por el contrario, debe notarse el efecto citotóxico pronunciado que se observa en *Acanthamoeba*.

La Figura 4 muestra la fagocitosis de las amebas *Hartmannella* por las amebas *Willaertia* observada en microscopía de contraste de fase en vivo (x1200).

La Figura 5 muestra la evolución espontánea de las poblaciones respectivas de amebas *Hartmannella* (H) y *Willaertia* (W) después de la aparición según una proporción inicial H/W de aproximadamente 15.

La Figura 6 representa las evoluciones respectivas de las poblaciones de amebas *Hartmannella* (serie "testigo" y "ensayo") y *Willaertia* en los cocultivos encajados de *L. pneumophila*.

La Figura 7 representa las cinéticas comparadas del desarrollo de *L. pneumophila* en cocultivo monoamebiano (sólo *Hartmannella*) y en cocultivo tripartito (*Hartmannella* + *Willaertia*).

ES 2 350 323 T3

1. Material y procedimiento

1.1. Cepas usadas

5 - *Legionelas*: la cepa usada es la cepa de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 depositada con el número 107 629T en el Instituto Pasteur de París (CNCM). Se mantiene en gelosa en pendiente BCYE con un trasplante cada tres semanas. La cepa se siembra en estrías grandes en caja de gelosa BCYE (AES®) y se incuba de 3 a 4 días a 37°C antes de la realización de los cocultivos de manera que se disponga de bacterias en fase postexponencial.

10 - *Amebas*: las cepas usadas pertenecen a tres géneros amebianos diferentes:

Hartmannella vermiformis,

Acanthamoeba castellanii,

15 *Williaertia magna* (n° PTA-7824).

20 Estas tres cepas se cultivan axénicamente, en presencia del 10% de suero de ternera fetal, en medio SCGYEM (véase composición en anexo), distribuido en tubos FALCON® (3033) a razón de 3 ml por tubo. En mantenimiento, las formas vegetativas se trasplantan cada 8-9 días. Para los cocultivos, se usan trasplantes de 3 a 4 días de manera que se disponga de trofozoítos en fase de crecimiento exponencial.

- Medio SCGYEM

25 Composición:

Caseína (MERCK 1.02244.010) 10 g

30 Na₂HPO₄ 1,325 g

KH₂PO₄ 0,8 g

35 Glucosa 2,5 g

Extracto de levadura (DIFCO 0127-17-9) 5 g

Agua destilada 900 ml

40 Suero de ternera fetal 100 ml

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

Después de disolución completa, se filtra sucesivamente en fibra de vidrio (SARTORIUS SM 6513400), y después en membrana de 1 µm (WHATMAN 7190 004). A continuación se añade el medio en partes alícuotas en frascos de vidrio. Los frascos se esterilizan en el autoclave 20 minutos a 120°C. Antes del uso definitivo y la distribución del medio, se añade de forma estéril bajo campana de flujo laminar el suero de ternera fetal a razón del 10% del volumen final.

1.2. Cocultivo monoamebiano de *L. pneumophila*

55 1.2.1. Preparación del inóculo bacteriano

A partir de un cultivo de 3 a 4 días en gelosa BCYE, se prepara una suspensión de *L. pneumophila* en agua destilada estéril de forma que se obtenga 1 unidad de Densidad Óptica a 550 nm, o bien una concentración de 10⁹ UFC/ml.

1.2.2. Realización de cocultivos monoamebianos

65 Los cocultivos se realizan en tubos para cultivos celulares (FALCON® 3033) que contienen 3 ml de medio SCGYEM. La siembra de los tubos se hace a razón de aproximadamente 7·10⁴ amebas/ml, a partir de una suspensión amebiana axénica previamente sometida a recuento en cámara THOMA. La infestación de las amebas por *L. pneumophila* se realiza fijando una proporción *L. pneumophila*/ameba de 50, aproximadamente 3,5·10⁶ bacterias/ml. In-

ES 2 350 323 T3

mediatamente después de la infestación, se centrifugan los tubos de cocultivos a baja velocidad (760 g durante 5 min) para favorecer el contacto entre amebas y bacterias. Al cabo de 10 min, se vuelven a poner los tubos en suspensión manualmente y se incuban, en posición inclinada, en estufa a 37°C.

5

1.2.2.1 Estudio cinético de los cocultivos

Los cocultivos se continúan durante al menos 5 días (D0 a D+4) después de la infestación bacteriana. En cada intervalo de tiempo, se toma un tubo y se examina a la vez desde el punto de vista amebiano y bacteriano después de agitación vigorosa en vórtice con el fin de despegar las amebas de las paredes. Para cada tubo examinado:

- La numeración de las amebas se efectúa directamente en la cámara THOMA o MALASSEZ.

- A la vista de los resultados obtenidos a continuación de los ensayos preliminares de lisis amebiana, el recuento de legionelas totales se efectúa por exposición directa del medio de cultivo en gelosa BCYE (AES®) después de dilución de 10 en 10 en agua destilada estéril, en microtubos Eppendorf. Cada dilución se expone en triplicado en gelosa BCYE a razón de 100 µl por caja. Las cajas se ponen entonces en incubación a 37°C durante 6 días como mínimo. Se efectúa una primera lectura de las exposiciones a partir del 4º día mediante recuento de las colonias; se sigue de una segunda lectura al 6º día para confirmación. El número de *L. pneumophila* se expresa en UFC/ml 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 amebiano, las curvas de crecimiento de *L. pneumophila* se representan en función del tiempo y corresponden a la media de al menos tres ensayos independientes con las desviaciones típicas correspondientes.

A la vista de la lentitud del desarrollo de las colonias de *L. pneumophila* en cultivo en BCYE, la obtención del conjunto de los resultados para una manipulación de este tipo requiere un plazo de al menos 11 días.

1.2.2.2 Citotoxicidad de *L. pneumophila* frente a diferentes géneros amebianos

Se han realizado igualmente cocultivos de tres géneros amebianos en microplacas de 24 pocillos que contienen 5·10⁴ amebas/pocillo, infestadas con una proporción *L. pneumophila*/ameba de 50, con el fin de observar microscópicamente las monocapas celulares y de suministrar una evaluación cualitativa del efecto citopatógeno de la bacteria frente a la ameba.

Se ha determinado igualmente la citotoxicidad al cabo de 48 y de 72 h de cocultivo mediante una prueba de exclusión con azul de triptano en los géneros *Acanthamoeba* y *Willaertia*. Las amebas son recuperadas por centrifugado suave del contenido de los tubos de cocultivos, y después se vuelven a suspender en 200 µl de medio SCGYEM antes de la mezcla con el azul de triptano según una proporción de 4/1. Las células se examinan en el hematímetro y para cada género amebiano se determina el porcentaje de células muertas que aparecen coloreadas de azul.

1.3. Cocultivos tripartitos de *L. pneumophila*

Se han estudiado las repercusiones posibles de las interacciones entre diferentes géneros amebianos, y sobre todo de la fagocitosis interamebiana, en la replicación y la transmisión de legionelas. En un primer momento, se ha estudiado la cinética del proceso de fagocitosis interamebiana entre *Hartmannella* y *Willaertia*, y después se han realizado cocultivos tripartitos de *L. pneumophila* que hacen participar dos hospedadores amebianos sucesivos.

1.3.1. Estudio cinético de la fagocitosis interamebiana *Hartmannella*-*Willaertia*

A partir de los cultivos axénicos respectivos, se prepara una serie de tubos de medio SCGYEM que contienen a la vez amebas *Hartmannella* y amebas *Willaertia* según una proporción fijada aproximadamente en 20 *Hartmannella* por 1 *Willaertia*. El proceso fagocitario se observa microscópicamente *in vivo* en contraste de fase, y, gracias a las diferencias pronunciadas de tamaño y de aspecto entre los dos géneros amebianos, su evolución puede seguirse por numeración de las dos poblaciones amebianas que aparecen en diferentes intervalos de tiempo.

1.3.2. Realización de cocultivos tripartitos de *L. pneumophila*

Para este fin se ha usado un protocolo experimental en dos tiempos:

- la primera etapa corresponde, como en los cocultivos monoamebianos, a la infestación en cocultivo del primer hospedador amebiano por *L. pneumophila*;

- la segunda etapa consiste, después de la eliminación de las legionelas extracelulares, en introducir en el cocultivo un segundo género amebiano.

ES 2 350 323 T3

1.3.2.1. Infestación del primer hospedador amebiano en D-1

Esta etapa corresponde a la infestación de la ameba *H. vermiformis* por *L. pneumophila*. Se realiza en tubos FALCON en condiciones análogas a las indicadas anteriormente en el apartado 1.2.2. Las únicas diferencias se dan en la concentración amebiana de partida que es del orden de $2 \cdot 10^5$ *Hartmannella*/ml y en la proporción de infestación *L. pneumophila*/*Hartmannella* que es de 20. Los tubos se incuban en posición inclinada durante 24 H a 37°C.

1.3.2.2. Adición del segundo hospedador amebiano en D0

Eliminación de las legionelas extracelulares

Transcurrido el tiempo de incubación destinado a asegurar la infestación del primer hospedador amebiano, las legionelas extracelulares se eliminan por tratamiento de los cocultivos con gentamicina a razón de 50 µg/ml durante 1 H a 37°C (Moffat, J.F, and Tompkins, L.S. Immun. (1992) 60: 296-301). Después de centrifugado a 2000 g durante 10 min, se elimina el antibiótico por decantación del medio de cultivo y se lava el residuo celular de *Hartmannella* en dos extractos con 2 ml de medio SCGYEM sin suero para eliminar todo rastro de antibiótico. Después del último lavado, se vuelve a poner en suspensión el residuo amebiano de cada tubo, por paso en vórtice, en su volumen inicial de medio SCGYEM (3 ml). Se procede a una numeración (D0), a la vez de *Hartmannella* y de legionelas.

Inoculación del segundo hospedador amebiano (*Willaertia*)

En paralelo, se prepara una suspensión amebiana del segundo hospedador *Willaertia* a partir de un cultivo axénico. Después de recuento en la cámara THOMA, se calcula el volumen necesario de suspensión que se introducirá en los tubos de cocultivos que constituyen la serie “ensayo” de forma que se obtenga una relación celular entre 1^{er} hospedador amebiano/2^o hospedador amebiano (*Hartmannella*/*Willaertia*) cercana a 20. Los tubos que corresponden a la serie “testigo” se tratan exactamente de la misma manera, aunque sin recibir amebas *Willaertia* después del tratamiento con gentamicina.

Seguimiento de los cocultivos de D0 a D+5

Cada día, se examina un tubo de cocultivo de la serie “ensayo” y “testigo”, después de agitación en vórtice, a la vez desde el punto de vista amebiano y bacteriano:

- La numeración de los trofozoítos para cada género amebiano se efectúa en cámara THOMA o MALASSEZ.

- El recuento de las legionelas totales se efectúa como en el caso de los monocultivos por exposición en gelosa BCYE de las diluciones del medio de cultivo en agua destilada estéril. Una única manipulación exige así un plazo de una docena de días para ser interpretada.

2. Resultados

2.1. Resultados de los cocultivos monoamebianos de *L. pneumophila*. Ausencia de crecimiento de *L. pneumophila* en presencia de amebas *Willaertia*

La Figura 1 muestra el crecimiento comparado de *L. pneumophila* en cocultivo con los tres géneros amebianos, realizándose los cocultivos según se describe anteriormente en la sección material y procedimiento, es decir: las amebas axenizadas en medio SCGYEM son cocultivadas en presencia de *L. pneumophila* a partir de D0 según una proporción de infestación *L. pneumophila*/ameba de 50. Los resultados corresponden a la media ± desviación típica de 6 (*Hartmannella*) a 8 (*Acanthamoeba* y *Willaertia*) ensayos independientes.

Los cocultivos de *L. pneumophila* realizados en presencia de amebas que pertenecen a los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba* confirman una clara multiplicación de la bacteria en presencia de estos dos géneros amebianos ya que se observa un aumento que alcanza respectivamente 1,3 y 1,4 log en D+3 (Figura 1). Por el contrario, mientras las condiciones experimentales son estrictamente idénticas, los cocultivos de *L. pneumophila* en presencia de amebas *Willaertia sp.*, no sólo no conducen a un desarrollo significativo de la bacteria, sino que conducen incluso a una disminución de 1 log de la población bacteriana y finalmente la diferencia de desarrollo de *L. pneumophila* entre los cocultivos en presencia de *Hartmannella sp.* o de *Acanthamoeba sp.* y los cocultivos en presencia de amebas *Willaertia sp.* alcanzó 2,3 log en D+2 (Figura 1).

Simultáneamente, la observación microscópica de los cocultivos muestra importantes modificaciones morfológicas que afectan exclusivamente a las amebas de los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba*: sus trofozoítos se redondean progresivamente, se encogen y pierden su capacidad de adherencia de D2 a D4. En estas condiciones, el recuento exacto de las amebas para estos dos géneros se hace difícil e incierto debido a que una mayoría de las células sometidas a recuento está ya, en realidad, necrótica y en el punto de experimentar una lisis; no obstante, el recuento muestra que

ES 2 350 323 T3

el crecimiento de estos dos géneros se ralentiza a partir de D+1 con una clara disminución en D+2 (Tabla 1). Los cocultivos en presencia de *Willaertia sp.* no presentan esta involución y se caracterizan, por el contrario, por una proliferación de amebas (Tabla 1).

5 Los resultados presentados en la Tabla 1 se obtienen del modo siguiente:

Las diferentes especies amebianas son cocultivadas en presencia de *L. pneumophila* según una proporción de infestación de 50 (*L. pneumophila*/ameba) y las amebas se recuentan cotidianamente con un hematímetro. Los resultados en número de amebas/ml de medio corresponden a la media de 6 (*Hartmannella*) a 8 (*Acanthamoeba* y *Willaertia*) experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre el número de *Willaertia* y las otras dos especies amebianas (*: P < 0,05; **: P < 0,001).

TABLA 1

15 *Efecto de la infección bacteriana en el crecimiento amebiano. Ausencia de citotoxicidad de L. pneumophila frente a amebas Willaertia*

| Especie amebiana | Tiempo (día de cocultivo) | | | |
|---------------------------------|---|---|--|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| <i>Acanthamoeba castellanii</i> | 5,38 x 10 ⁴ ± 3,86 x 10 ³ | 1,35 x 10 ⁵ ± 5,91 x 10 ⁴ | 1,13 x 10 ⁵ ± 5,67 x 10 ⁴ ** | 3,64 x 10 ⁴ ± 3,05 x 10 ⁴ ** |
| <i>Hartmannella vermiformis</i> | 5,50 x 10 ⁴ ± 4,60 x 10 ³ | 1,97 x 10 ⁵ ± 4,63 x 10 ⁴ | 2,32 x 10 ⁵ ± 3,76 x 10 ⁴ * | 1,26 x 10 ⁵ ± 2,96 x 10 ⁴ ** |
| <i>Willaertia magna</i> | 5,41 x 10 ⁴ ± 2,52 x 10 ³ | 1,7 x 10 ⁵ ± 3,93 x 10 ⁴ | 2,92 x 10 ⁵ ± 5,26 x 10 ⁴ | 2,42 x 10 ⁵ ± 4,71 x 10 ⁴ |

El efecto citotóxico inducido por *L. pneumophila* en las amebas ha sido examinado por la observación en microscopía de contraste de fase de los cocultivos en microplacas. La Fig. 2 muestra las imágenes obtenidas en microscopía de contraste de fase de las diferentes especies amebianas cultivadas en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de *L. pneumophila* durante 72 H según una proporción de infestación de 50. En estas condiciones, se constata que *L. pneumophila* destruye completamente las monocapas de las cepas de *Hartmannella sp.* y de *Acanthamoeba sp.* al cabo de 72 H de infección con aparición de células sueltas y redondeadas (Figura 2), mientras que, para la misma proporción de infestación y en el mismo lapso de tiempo, las monocapas de *Willaertia sp.* permanecen intactas y proliferan de igual modo que en el pocillo testigo desprovisto de legionelas (Figura 2). Estas observaciones han sido confirmadas por la realización de una prueba de exclusión con azul de triptano en los cocultivos de *Acanthamoeba* y de *Willaertia*. La Fig. 3 ilustra la citotoxicidad comparada de *L. pneumophila* frente a *Acanthamoeba* y a *Willaertia*. Las amebas son cultivadas en presencia de *L. pneumophila* y el porcentaje de células positivas al azul de triptano después de 2 y 3 días de cocultivo se determina microscópicamente. Los datos presentados Fig. 3 corresponden a los resultados obtenidos después de 5 ensayos independientes.

Los resultados muestran que el 28,4 ± 8% de las raras células de *Acanthamoeba sp.* todavía presentes al cabo de 72 H es destruido. En cambio, el efecto citopatógeno de *L. pneumophila* para las *Willaertia sp.* es de menos del 4% después del mismo tiempo de infección (Figura 3). Así pues, morfológicamente, los trofozoítos de *Willaertia* en cocultivo parecen resistir mucho mejor la infección por *L. pneumophila* que los de *Hartmannella* o de *Acanthamoeba*.

2.2. Cinética del proceso de fagocitosis interamebiana

La fagocitosis de las amebas *Hartmannella* por las amebas del género *Willaertia* comienza en los minutos que siguen al inicio de la presencia de los dos géneros amebianos. El fenómeno se desencadena por los encuentros aleatorios que se producen entre los dos géneros amebianos; su evolución depende así de las proporciones respectivas de los dos géneros que empiezan a presentarse.

Microscópicamente, es perfectamente posible seguir *in vivo* la ingestión de las *Hartmannella* por las *Willaertia* y no es raro observar una célula de *Willaertia* que encierra varios de *Hartmannella* en estadios más o menos avanzados de digestión según se ilustra en la Figura 4. La Figura 4 que representa vistas en microscopía de contraste de fase (x1200) pone de relieve la fagocitosis de las amebas *Hartmannella* por las amebas *Willaertia* observada *in vivo*. Las flechas negras indican la presencia de trofozoítos de *Hartmannella* fagocitados en el interior del citoplasma de las amebas *Willaertia*. La punta de flecha blanca indica una ameba *Hartmannella* presa simultánea de dos *Willaertia*.

El estudio cinético del fenómeno muestra que después de este proceso fagocitario, se asiste a un decrecimiento muy rápido de la población de *Hartmannella* que cae al 14% de su valor inicial en 3 días, mientras que paralelamente, la población de *Willaertia* aumenta 1 log en dos días. Sigue una inversión total de la relación H/W que pasa de 14,4 a 0,24 de D0 a D+3 (Figura 5 que muestra la evolución respectiva de las poblaciones de *Hartmannella* (H) y de *Willaertia* (W) mezcladas en cultivo axénico según una proporción H/W de 15).

2.3. Resultados de los cocultivos tripartitos (biamebianos) de *L. pneumophila*

La introducción de la ameba *Willaertia* en los cocultivos tripartitos a partir de D0, es decir, 24 H después de la infestación del primer hospedador amebiano *Hartmannella* por *L. pneumophila*, se acompaña de dos fenómenos concomitantes y confirma el efecto observado anteriormente durante la realización de los cocultivos monoamebianos:

1. La Figura 6 muestra los crecimientos respectivos de especies amebianas en presencia de *L. pneumophila* según las condiciones de cocultivo descritas anteriormente en la sección material y procedimiento, es decir: las amebas del género *Hartmannella* han sido infectadas previamente en D-1 durante 24 H por *L. pneumophila* según una proporción de infestación de 20. En D0, después de la eliminación de las legionelas extracelulares por un tratamiento con gentamicina (1H) y un lavado cuidadoso, las amebas *Hartmannella* (H) preinfectadas se vuelven a poner en suspensión en su volumen inicial de medio SCGYEM y reciben amebas del género *Willaertia* (W), en la serie “ensayo”, según una proporción H/W = 20 (cocultivo tripartito). La serie “testigo” evoluciona en ausencia de *Willaertia* y corresponde a un cocultivo monoamebiano. Las poblaciones amebianas se cuentan cada día en cada una de las series “testigo” y “ensayo”. Se asiste, de manera lógica, a una disminución más rápida de las amebas *Hartmannella* en la serie “ensayo”, que alcanza el 86% en el curso de las primeras 24 H, a continuación del desencadenamiento del proceso fagocitario interamebiano, que en la serie “testigo” en la que la desaparición de las *Hartmannella* se debe a la única lisis necrótica inducida por *L. pneumophila* (Figura 6). Paralelamente, se constata un aumento regular de las *Willaertia* que ven su número multiplicado por 6,5 en la duración del experimento y como anteriormente la relación H/W se invierte completamente pasando de 19,8 a 0,08. Como ya se ha constatado durante los cocultivos monoamebianos, la presencia de las legionelas no parece así afectar a la apariencia morfológica y al desarrollo de las *Willaertia*.

2. La Figura 7 muestra el crecimiento comparado de *L. pneumophila* en cocultivo monoamebiano con *Hartmannella* sola y en cocultivo tripartito en presencia de *Hartmannella* y de *Willaertia* añadida a partir de D0. Las modalidades operatorias son las indicadas anteriormente para la Figura 6. Se observa una parada del desarrollo de *L. pneumophila* con respecto al que se obtiene en los cocultivos “testigos” en presencia de las amebas *Hartmannella* en solitario (Figura 7). La inhibición del desarrollo de *L. pneumophila* a continuación de la introducción de *Willaertia* alcanza 2 log al cabo de 48 H de cocultivo tripartito. Visiblemente, el proceso de fagocitosis de las *Hartmannella* por las *Willaertia* no permite así tomar el relevo y amplificar la replicación de la bacteria en el seno del nuevo hospedador.

En conclusión, la tendencia observada durante la realización de los cocultivos monoamebianos de *L. pneumophila* con *Willaertia* se confirma plenamente por los resultados de los cocultivos tripartitos. Se constata que la fagocitosis por *Willaertia* del primer hospedador amebiano, infestada previamente durante 24 H, tiene como efecto el bloqueo total del desarrollo de legionelas con respecto a la evolución constatada en los cocultivos testigos de *Hartmannella* que no contienen *Willaertia*. Visiblemente, el aumento de la población de *Willaertia* y el proceso fagocitario que lo acompaña no permiten la transmisión de la infestación del primer hospedador celular al segundo hospedador potencial. La estabilidad relativa de la tasa de legionelas de valores cercanos a los del inicio puede mantenerse mediante *Hartmannella* todavía no fagocitadas. El conjunto de estos resultados muestra una ausencia de desarrollo de *L. pneumophila* en presencia de amebas del género *Willaertia*.

Se obtienen igualmente resultados conformes con el conjunto de los resultados presentados anteriormente, obtenidos con la cepa n° PTA-7824, con la cepa n° PTA-7825.

ES 2 350 323 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de lucha biológica contra la proliferación de *Legionella pneumophila*, con la excepción de los procedimientos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o animal, **caracterizado** porque usa protozoos amebianos de la especie *Willaertia magna*, que corresponde 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.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por que implementa el tratamiento de un flujo líquido o gaseoso con los protozoos amebianos.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizado** por que se implementa para la desinfección de redes de distribución de agua potable o de aguas industriales, circuitos de refrigeración y torres aerorrefrigerantes de las instalaciones industriales, o redes de climatización.

15 4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizado** por que se implementa para luchar contra la proliferación de *Legionella pneumophila* en el seno de biopelículas en las canalizaciones de aguas.

20 5. Agente desinfectante que contiene protozoos amebianos de la especie *Willaertia magna*, que corresponde 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.

6. Agente desinfectante según la reivindicación 5 **caracterizado** por que se presenta en la forma de una solución o de una suspensión acuosa.

25 7. Protozoos amebianos que pertenecen a la especie *Willaertia magna* que corresponde 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.

30

35

40

45

50

55

60

65

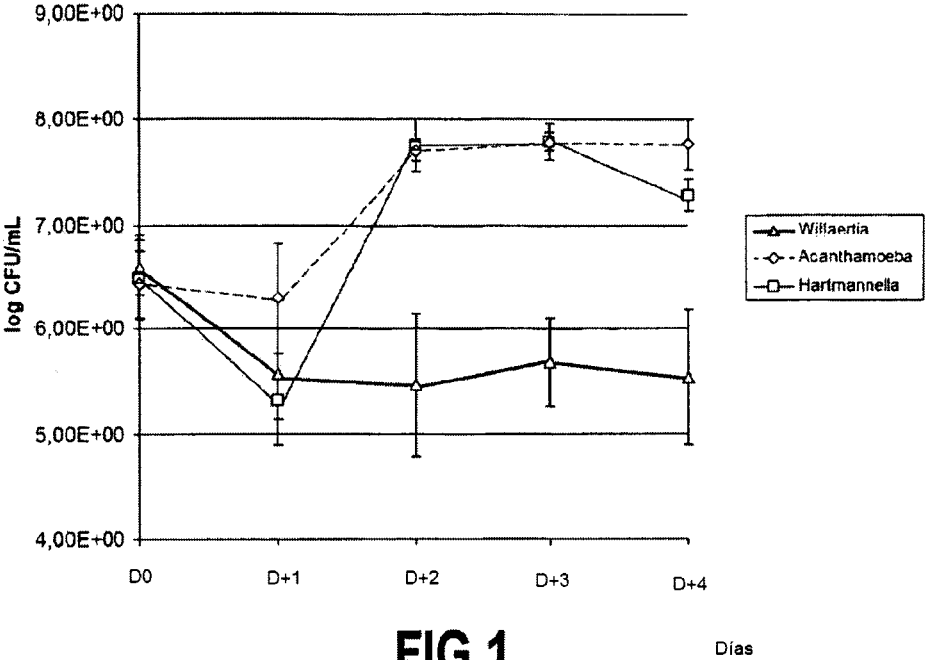


FIG.1

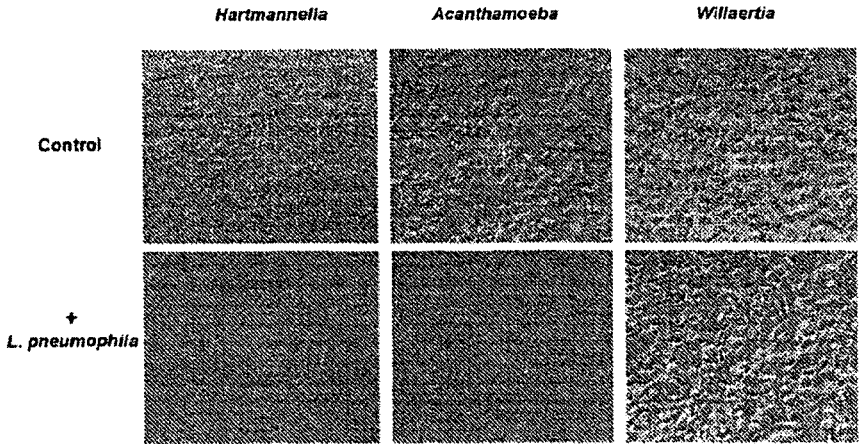


FIG.2

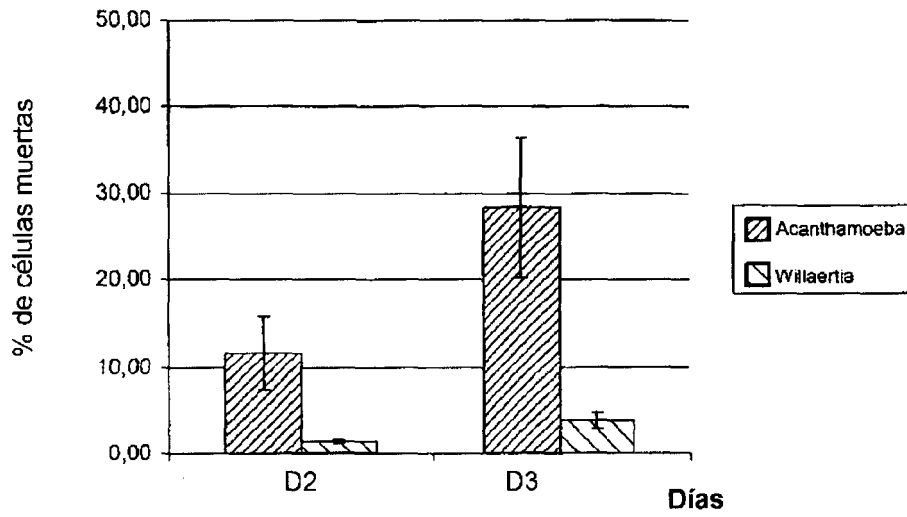


FIG.3

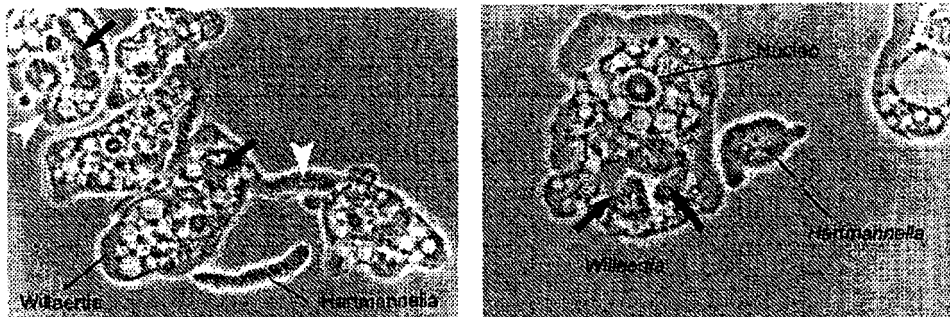


FIG.4

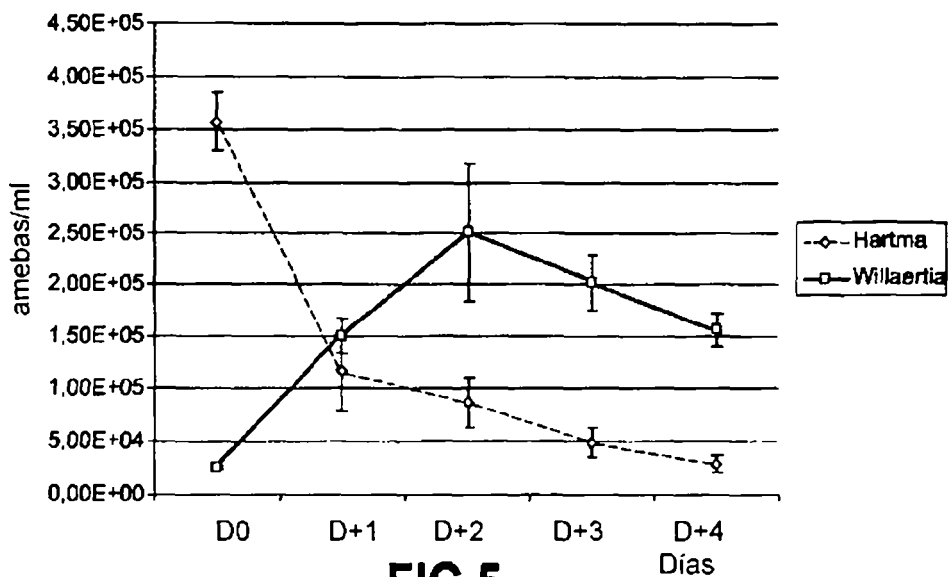


FIG.5

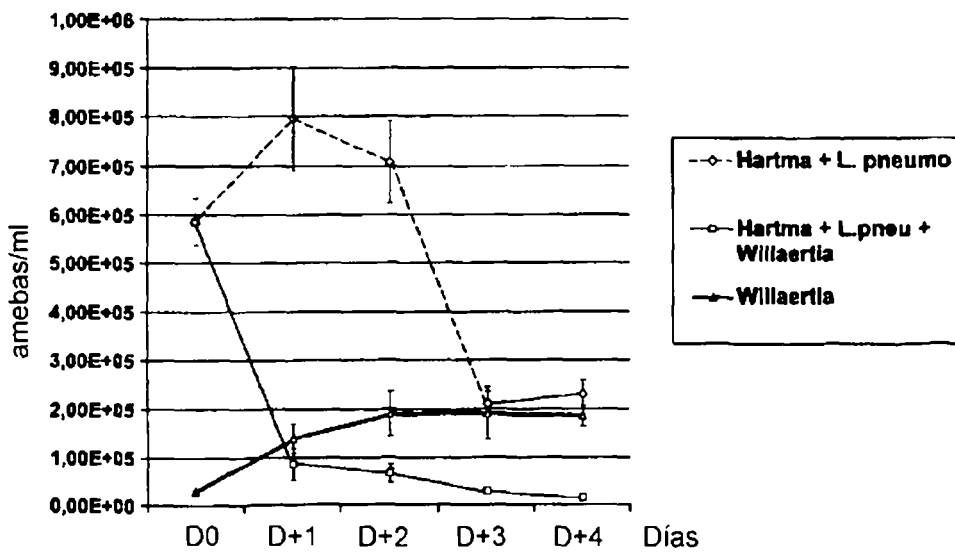


FIG.6

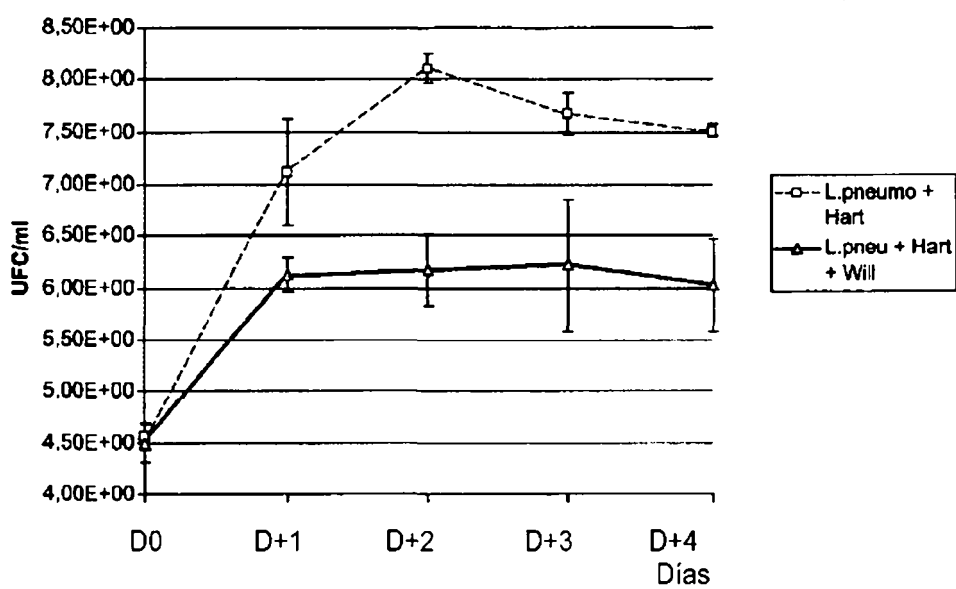


FIG.7