SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PREKLAD EURÓPSKEHO PATENTOVÉHO SPISU

(97) **EP 2 785 879 B1**

(11) Číslo dokumentu:

E 22404

(96) Číslo a dátum podania európskej patentovej prihlášky: **EP12795802.3, 3. 12. 2012**

(97) Dátum vydania európskeho patentového spisu: **27. 7. 2016**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **1161111**

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **2. 12. 2011**

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FR**

(45) Dátum sprístupnenia prekladu patentového spisu verejnosti: **2. 2. 2017**

Vestník ÚPV SR č.: **02/2017**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP2012/074248**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO 2013/079722**

(13) Druh dokumentu: **T3**

(51) Int. Cl. (2017.01):

C12R 1/00
A01N 63/00
C02F 3/00
C02F 103/00

(73) Majiteľ: **Amoeba, 38 Avenue des Frères Montgolfier, 69680 Chassieu, FR;**

(72) Pôvodca: **PLASSON Fabrice, 5bis rue Saint Isidore, F-69003 Lyon, FR;**
BODENNEC Séléna, 1326 route des Nappes, F-38630 Les Avenières, FR;

(74) Zástupca: **KOREJZOVÁ & SPOL., v. o. s., Krasovského 13, 851 01 Bratislava 5, SK;**

(54) Názov: **Spôsob biologickej ochrany proti listeria**

(10) SK E 22404 T3

Poznámka: V lehote deviatich mesiacov odo dňa zverejnenia oznámenia o udelení európskeho patentu môže každý podať na Európsky patentový úrad námietky proti udelenému európskemu patentu. Námietky sa podávajú písomne a musia byť odôvodnené. Námietky sa považujú za podané až po zaplatení poplatku za námietky (Čl. 99(1) Európskeho patentového dohovoru).

Preklad európskeho patentového spisu bol predložený podľa § 63 ods. 2 patentového zákona. Za správnosť prekladu Úrad priemyselného vlastníctva Slovenskej republiky nezodpovedá.

OPIS

[0001] Tento vynález sa týka nového spôsobu biologickej ochrany proti *Listeria*, a osobitne *Listeria monocytogenes,* ako aj novej kompozície určenej na zabránenie množeniu sa *Listeria monocytogenes.*

[0002] *Listeria monocytogenes* je gram-pozitívna baktéria z rodu *Listeriaceae.* Táto baktéria zodpovedná za vznik ochorenia „listerióza" u ľudí, ktoré má často fatálnu prognózu (10). U ľudí, ktorí prežili, často možno pozorovať vážne následky. Patogénna baktéria môže preniknúť cez črevnú bariéru a bariéru placenty, čím môže vyvolať infekciu plodu, novorodenca alebo predčasný pôrod. *Listeria monocytogenes* je tiež hlavnou príčinou neuroinvazívnej infekcie, ktorej výskyt sa v posledných rokoch prejavuje vzostupným trendom (5) (10). Kontrola nákaz listerióziou a jej prevencia sa stáva čoraz väčšou prioritou.

[0003] *Listeria monocytogenes* je baktéria, ktorá sa môže deliť/rozmnožovať kdekoľvek: vyskytuje v zemi, vode, epifyte na povrchu rastlín atď. Vykazuje veľkú rezistenciu na dezinfekčné čistiace prostriedky, takže môže prežívať napríklad v prevádzkach agropotravinárskych podnikov alebo vo vodovodných či klimatizačných sieťach.

[0004] Všeobecne, a to i napriek medicínskemu významu tejto baktérie, poznatky o ekológii baktérií *Listeria* (1) sú ešte obmedzené. Vie sa však, že v životnom prostredí sa *Listeria monocytogenes* môže deliť v akomkoľvek prostredí (15), pretože táto baktéria bola odizolovaná z pôdy, zo splaškovej vody a tekutého priemyselného odpadu (4) a vyznačuje sa tým, že sa viaže na voľne žijúce améby. Okrem toho schopnosť *Listeria monocytogenes* odolávať snahám o zničenie ľudskými makrofágmi priviedla niektorých vedcov k hypotéze, že táto patogénna baktéria môže byť rezistentná voči amébam voľne žijúcim v životnom prostredí, pričom vychádzajú z analogických poznatkov o vzťahoch medzi parazitujúcimi baktériami a amébovými hostiteľmi (6). Vedci Ly a Müller prišli s teóriou, že *Listeria* môže byť rezistentná voči voľne žijúcim amébam (6, 9). Tieto hypotézy sa mohli overiť vtedy, keď títo teoretici dokázali, že *Listeria monocytogenes* je schopná sa rozmnožovať v prítomnosti voľne žijúcich améb z rodu *Acanthamoeba* (9) (6). Okrem toho bol dokázaný cytotoxický účinok *Listeria monocytogenes* na hostiteľské améby, pretože bolo možné pozorovať zapuzdrenie *Acanthamoeba* v prípade ich nasadia do spoločného kultivačného média s patogénnou baktériou (6, 9). Zhou a kol. sa tiež podarilo dokázať, že *Listeria monocytogenes* má schopnosť rezistencie voči voľne žijúcim amébam *Acanthamoeba castellanii*: (16). Takisto sa dokázalo, že *Listeria monocytogenes* je schopná rásť v prítomnosti biologického materiálu vzniknutého ako produkt vysolenia amébami pri ich zapuzdrovaní alebo lýzy (1). Výskumníci, ktorí dospeli k tomuto zisteniu, prišli s teóriou, že tieto faktory môžu tvoriť vhodné prostredie pre *Listeria* a podporovať ich prežitie, resp. ich rozmnožovanie v životnom prostredí (1). Ďalšie pozorovania, ktoré uskutočnili Pushkareva a Ermolaeva, umožnili dokázať, že voľne žijúci prvok (*Tetrahymena pyriformis*) umožňuje baktérii *Listeria monocytogenes* účinne sa dostať do jeho vnútra (11). Preniknutie parazitu *Listeria monocytogenes* do *Tetrahymena pyriformis* vyvolá zapuzdrenie prvoka (11). Údaje získané týmito výskumníkmi tiež viedli k záverom, že baktérie *Listeria monocytogenes*, ktoré sa dostali do vnútra týchto zapuzdrených prvokov, sú životaschopné, zachovávajú si svoju nákazlivosť a sú schopné spôsobovať infekciu u modelových zvierat (11).

[0005] Jednoznačne sa teda ukazuje, že prvoky a voľne žijúce améby sú významným prvkom ekológie baktérií *Listeria monocytogenes* tým, že podporujú ich prežitie, rast v životnom prostredí a tiež zachovanie ich bakteriálnej nákazlivosti. Okrem toho schopnosť baktérií Listeria nainfikovať prvoky a prežívať v zapuzdrených prvokoch (11) sú významným ukazovateľom toho, že prvoky sú faktory, ktoré podporujú rezistenciu baktérií *Listeria* voči biocídnemu ošetreniu, ktoré sa v súčasnosti používa. Zapuzdrené améby sú totiž veľmi odolné voči chemickému biocídnemu a/alebo fyzikálnemu ošetreniu, ktoré sa v súčasnosti používajú (7, 8, 14). Biocídne ošetrenia, ktoré sa v súčasnosti používajú na predchádzanie riziku nakazenia baktériami *Listeria*, neprinášajú uspokojivý účinok, pretože okrem toho, že sa zvyšuje samotná odolnosť baktérie (12, 13), baktérie prítomné vo vnútri prvokov a v biofilmoch (2) sú pomerne dobre chránené, takže sa budú ďalej rozmnožovať/kolonizovať prostredie.

[0006] V tomto kontexte vynálezcovia celkom nečakane dokázali, že améby z rodu *Willaertia magna* hubia baktérie *Listeria monocytogenes.* Tento biocídny účinok ešte zdvojnásobuje predátorská schopnosť *Willaertia magna*, ktorá sa u týchto améb už preukázala vo vzťahu k iným amébovým nositeľom, ktoré môžu prenášať *Listeria monocytogenes* (3).

[0007] Predmetom predloženého vynálezu je preto v prvom rade spôsob, ako zabrániť množeniu sa baktérií *Listeria,* a obzvlášť *Listeria monocytogenes,* a to na základe využitia prvokov z rodu *Willaertia magna.* Postupy podľa vynálezu nezahŕňajú spôsoby liečenia aplikovaného na telo človeka lebo zvieraťa. V spôsobe podľa vynálezu sa najčastejšie ošetrujú prvokmi z rodu *Willaertia magna,* a obvlášť druhu *Willaertia magna,* prúdy kvapalín a plynov.

[0008] V zmysle predloženého vynálezu *Listeria* znamená všetky druhy baktérií *Listeria*, a najmä *Listeria monocytogenes.*

[0009] Spôsob podľa predloženého vynálezu nachádza svoje využitie najmä v oblasti dezinfekcie rozvodných sietí úžitkovej vody, rozvodných sietí vody na priemyselné použitie, chladiacich okruhov priemyselných zariadení alebo klimatizačných sietí, alebo na povrchovú dezinfekciu. Prvoky možno priamo pridať do vody alebo kvapalín prúdiacich v potrubiach alebo sieťach, ktoré musia prejsť úpravou. Takisto ich možno rozstrekovať vo forme vodného roztoku aerosólovým rozprašovačom do sietí, komínov, priemyselných zariadení a na priemyselné povrchy, ktoré treba vydezinfikovať.

[0010] Prvoky použité v rámci predloženého vynálezu výhodne zodpovedajú kmeňu uloženému 26. augusta 2006 v ATCC (verejná zbierka typov kultúr) pod číslom **PTA 7824**, alebo kmeňu uloženému 26. augusta 2006 v ATCC pod číslom **PTA 7825**, pričom oba tieto kmene boli prihlásené v mene výskumného ústavu CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), 3 rue Michel Ange, 75794 PARIS CEDEX 16/FRANCE (Paríž, Francúzsko) a univerzity UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE Cedex / FRANCE (Villeurbanne, Francúzsko).

[0011] Prvoky z rodu *Willaertia* zodpovedajúce kmeňu uloženému v ATCC pod číslom **PTA 7824** alebo kmeňu uloženému v ATCC pod číslom **PTA 7825** sú neoddeliteľnou súčasťou predloženého vynálezu. Uvedené kmene **PTA 7824** a **PTA 7825** uložené v ATCC sú opísané aj vo zverejnenej medzinárodnej prihláške PCT WO2008/043969.

[0012] Takéto prvoky sa teda budú môcť používať v dezinfekčných prostriedkoch, osobitne v tých, ktoré sú určené na hubenie baktérií *Listeria,* a najmä *Listeria monocytogenes*, a takisto na zabránenie šíreniu sa listeriózy a nakazeniu sa listeriózou.

[0013] Dezinfekčný prostriedok podľa vynálezu existuje vo forme roztoku alebo vodnej suspenzie, napríklad v destilovanej vode. Dezinfekčný prostriedok bude možné vyrábať v rozprašovacej forme, napr. ako aerosól alebo akýkoľvek iný prostriedok na aplikáciu.

[0014] Aktivitu prvokov rodu *Willaertia,* a najmä druhu *Willaertia magna,* ktoré bránia množeniu sa baktérií *Listeria monocytogenes,* objavili vynálezcovia, keď porovnali replikáciu *Listeria monocytogenes* u rodov *Acanthamoeba* a *Hartmannella*, použitých ako modelové améby, s replikáciou u rodu améb *Willaertia.*

[0015] Keďže hlavnou úlohou améb je rozmnožovanie a prežitie baktérií *Listeria*, a najmä *Listeria monocytogenes* vo vonkajšom prostredí, prvky, ktoré ovplyvňujú epidemiológiu listeriózy, pretože nedochádza k prenosu medzi ľuďmi, čiže spôsob dezinfekcie a dezinfekčný prostriedok podľa vynálezu, poskytujú mnohé výhody, najmä z hľadiska nákladov a šetrnosti voči životnému prostrediu.

[0016] Nižšie uvedené príklady umožňujú objasniť vynález, ale v žiadnom prípade nie sú obmedzujúce.

[0017] **Obrázok 1** znázorňuje spontánny vývoj príslušných populácií améb *Hartmannella, Acanthamoeba* a *Willaertia* po tom, ako boli nasadené do spoločného kultivačného média s *Listeria monocytogenes* v počiatočnom pomere 1 améba/10 baktérií.

[0018] Jednotlivé voľne žijúce améby sú vložené do spoločného kultivačného média (čas 0 hodín) s *Listeria monocytogenes* v pomere 10 (10 baktérií/1 améba), ako je opísané v časti týkajúcej sa

materiálov a metód. Po nasadení do spoločného kultivačného média sa následne každé 3 hodiny odoberú alikvotné množstvá bunkových suspenzií a vylučovacím MTT testom, teda farbením trypánovou modrou a mikroskopickým pozorovaním použitím Malassezovej počítacej komôrky, sa zistí percentuálny podiel žijúcich améb. Údaje sú vyjadrené v % žijúcich buniek, negatívnych pri vylučovacom teste farbením trypánovou modrou.

[0019] Obrázok 2 znázorňuje porovnané kinetiky množenia sa *Listeria monocytogenes* vypestovanej v kultivačnom médiu, obsahujúcom rôzne druhy améb vrátane améb z rodu *Willaertia.*

[0020] Jednotlivé voľne žijúce améby sa samostatne nasadia do spoločných kultivačných roztokov (čas 0 hodín) spolu s *Listeria monocytogenes* v pomere 10 (10 baktérií /1 améba). Po nasadení do spoločného kultivačného média sa následne každé 3 hodiny odoberú alikvotné množstvá bunkových suspenzií a koncentrácie *Listeria monocytogenes* sa zisťujú tak, ako je opísané v časti týkajúcej sa materiálov a metód.

[0021] Obrázok 3 znázorňuje biocídny účinok *Willaertia magna* na biofilm tvorený baktériami *Listeria monocytogenes.* Tento obrázok naznačuje aj absenciu účinku voľne žijúcich améb *Acantlvameoba castellanii* a *Hartmanella vermiformis.*

[0022] Baktérie *Listeria monocytogenes* boli naočkované na agar TSA, inkubovali sa 48 hodín pri teplote 30 °C, aby sa zaistilo vytvorenie hustého biofilmu baktérií na agare. Potom sa 1 × 10^5 améb (*Acanthamoeba castellanii,* **panel A;** *Hartmarzella vermiformis,* **panel B;** *Willaertia magna,* **panely C a D)** opätovne suspendovaných v 100 µl sterilnej deionizovanej vody naočkovali do stredu agaru. Po 24 hodinách pri teplote 30 °C sa agary skúmali pod mikroskopom, aby sa určil vzhľad améb a ich vplyv na biofilm. **A:** biele šípky ukazujú vzhľad zhlukov zapuzdrených améb *Acanthamoeba castellanii* v prítomnosti *Listeria monocytogenes* **(L. m.)**. Treba si všimnúť absenciu rozsahu lýzy bakteriálneho biofilmu okolo zhlukov zapuzdrených améb. **B:** Treba si všimnúť výskyt množstva zapuzdrených foriem *Hartmanella vermiformis,* z ktorých sú niektoré vyznačené bielymi šípkami. Treba si tiež všimnúť veľkú hustotu *Listeria monocytogenes* okolo zapuzdrených *Hartmarzella vermiformis* a úplnú absenciu rozsahu lýzy bakteriálneho biofilmu. C: Účinok *Willaertia magna* na biofilm tvorený *Listeria monocytogenes.* Biele šípky označujú zhluky trofozoidov *Willaertia magna*, nachádzajúce sa v okrajovej časti lýzy biofilmu. Treba si všimnúť bakteriálneho filmu (oblasť ohraničená bielym kruhom v ľavom dolnom rohu mikrografie) pred zhlukmi *Willaertia magna* a hustý bakteriálny film (vyznačený písmenami **L.m.)** za zhlukmi améb (pravý horný roh mikrografie). **D:** ďalšia mikrografia znázorňuje rozsah lýzy biofilmu tvoreného *Listeria monocytogenes.* Treba si všimnúť zhluky *Willaertia magna* a okrajovej časti lýzy (vyznačené bielymi klinmi) bakteriálneho biofilmu.

1. MATERIÁLY A SPÔSOBY

1. 1. Použité bakteriálne kmene:

[0023] ***Listeria monocytogenes:*** použil sa bakteriálny kmeň CL 3970 (Oxoid, Francúzsko).

- Tento kmeň sa kultivuje na agare TSA (agar tryptónový sójový) (ref. označenie PO 5012, Oxoid, Francúzsko), pričom sa očkuje vpichmi v týždňových intervaloch. Kmeň sa očkuje vo forme širokých prúžkov na agarovú platňu TSA a inkubuje sa 2 dni pri teplote 30 °C.
- ***Améby:*** použité kmene patria k trom rôznym druhom:
  - ***Hartmannella vermiformis,***
  - *Acanthamoeba castellanii* – kmene uložené v ATCC pod číslom 30010
  - *Willaertia magna* (kmene uložené v ATCC pod číslami PTA 7824 a PTA 7825),

[0024] Tieto tri kmene sa kultivujú ako axenická kultúra za prítomnosti 10 % plodového teľacieho séra v kultivačnom médiu SCGYEM (Serum Casein Glucose Yeast Extract Medium), rozdeleného do baniek FALCON® (3033) po 3 ml. Na účely udržiavania vegetatívnych foriem sa preočkujú vpichom

každých 8 – 9 dní. V prípade spoločných kultivačných médií dochádza k preočkovaniu vpichom každé 3 až 4 dni tak, aby boli k dispozícii tifozoidy v plnej fáze exponenciálneho rastu.

Na vytvorenie média SCGYEM sa použijú:

➢ Kazeín (MERCK 1.02244.010)	10 g
➢ Na_2HPO_4	1,325 g
➢ KH_2PO_4	0,8 g
➢ Glukóza	2,5 g
➢ Kvasnicový extrakt (DIFCO 0127-17-9)	5 g
➢ Destilovaná voda	900 ml
➢ Plodové teľacie sérum	100 ml

[0025] Do 900 ml destilovanej vody sa pridá 2,5 ml NaOH (1N), potom Na_2HPO_4 a KH_2PO_4. Mierne sa zahreje varná platňa, potom sa postupne pridáva kazeín, a to pri magnetickom premiešavaní. Po rozpustení kazeínu sa zapracuje glukóza a kvasnicový extrakt.

[0026] Po úplnom rozpustení sa roztok postupne prefiltruje cez sklenené vlákna (SARTORIUS SM 6513400), potom cez membránu 1µm (WHATMAN 7190 004). Médium sa následne rozdelí na rovnaké diely a rozdelí sa do sklenených baniek. Banky sa 20 minút sterilizujú v autokláve pri teplote 120 °C. Pred konečným použitím a rozdelením média sa za sterilných podmienok pod digestorom s laminárnym prúdením pridá plodové teľacie sérum v množstve 10 % konečného objemu.

1.2. Vypestovanie spoločnej monoamébovej kultúry Listeria monocytogenes

1. 2.1. Príprava inokula baktérií:

[0027] Z kultúry pestovanej 2 dni na agare TSA sa pripraví suspenzia *Listeria monocytogenes* v sterilnej destilovanej vode tak, aby vznikla 1 jednotka s optickou hustotou 550 nm, čiže s koncentráciou 10^9 UFC (jednotka tvoriaca kolóniu)/ml.

1.2.2. Vypestovanie spoločných monoamébových kultúr

[0028] Spoločné kultúry sa vypestujú v bankách pre bunkové kultúry (FALCON® 3033) použitím 3 ml vody vysterilizovanej v autokláve. Naočkovanie do baniek sa uskutoční v množstve 1 × 10^5 améb/1 ml z axenickej suspenzie améb, ktoré boli predtým spočítané pomocou Malassezovho meradla. Nainfikovanie améb baktériami *Listeria monocytogenes* sa uskutoční v pomere 10 *Listeria monocytogenes*/améby, čo predstavuje 1 × 10^6 baktérií *Listeria monocytogenes*/1 ml inkubačného média. Hneď po nainfikovaní sa banky so spoločnými kultúrami odstredia pomalou rýchlosťou (760g počas 10 min.), aby sa podporil kontakt medzi amébami a baktériami. Po 10 minútach sa obsah v bankách ručne suspenduje a banky sa inkubujú v naklonenej polohe v sušiacej peci pri teplote 30 °C.

[0029] Postup skúmania spoločných kultivačných médií s obsahom améb a *Listeria monocytogenes* je nasledovný:

Spoločne kultivované kultúry sa sledujú 9 hodín po nainfikovaní baktériou. V pravidelných časových intervaloch (každé 3 hodiny) sa vykonajú odbery zo spoločne kultivovaných kultúr a po prudkom rozvírení, pri ktorom sa améby oddelia od stien, sa skúmajú améby aj baktérie. Pri každej banke sa uskutočnia tieto úkony:

- Spočítanie améb: priamo použitím Malassezovej počítacej komôrky.
- Určenie koncentrácií *Listeria monocytogenes*: priamym rozložením živného média na agar TSA po rozpustení v pomere 10/10 v sterilnej destilovanej vode v eppendorfových skúmavkách. Tri diely každého roztoku sa rozložia na agar TSA v pomere 100 µl na misku. Misky sa potom inkubujú minimálne 48 hodín pri teplote 30 °C. Prvé skúmanie agarov TSA sa uskutoční 24 hodín po rozložení, pričom sa spočítajú kolónie; druhé skúmanie sa uskutoční na 2. deň s cieľom potvrdiť zistenia. Koncentrácie *Listeria monocytogenes* sa vyjadria v UFC/ml inkubačného média so zreteľom na faktor riedenia, pričom sa vychádza z toho, že každá kolónia zodpovedá 1 baktérii pôvodne prítomnej v zriedenej suspenzii.

[0030] Pri každom rode améb sú krivky rastu *Listeria monocytogenes* znázornené vzhľadom na čas.

[0031] Okrem toho sa určí prípadný cytotoxický účinok *Listeria monocytogenes* na rôzne druhy améb, a to takýmto spôsobom:

- spočítaním podielu améb s pozitívnym nálezom pri vylučovacom teste farbením trypánovou modrou. Tento test sa uskutoční pomocou mikroskopu tak, že sa použitím Malassezovej počítacej komôrky spočíta pomer pozitívnych buniek zafarbených trypánovou modrou k celkovému počtu buniek.
- Určí sa sklon améb zapuzdriť sa v prítomnosti *Listeria monocytogenes.*

1.3. Účinok Willaertia magna na biofilmy Listeria monocytogenes

[0032] Biofilmy *Listeria monocytogenes* sú tvorené nasledovne: konkrétne množstvo *Listeria monocytogenes* v 100 µl sterilnej vody sa nasadí na agar TSA, na ktorom sa rozloží. Agary sa počas 48 hodín udržiavajú pri teplote 30 °C, aby sa umožnil rast hrubej a rovnomernej vrstvy baktérií na celom povrchu agaru. Následne sa 1×10^5 améb (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmarzella vermiformis* alebo *Willaertia magna)* nasadí na stred agaru, ktorý sa počas 24 hodín udržiava pri teplote 30 °C. Agary sa potom preskúmajú optickým mikroskopom (zväčšenie × 400), aby sa zistilo prípadné vytvorenie rozsahov lýzy vo vrstve baktérií.

2. VÝSLEDKY

2.1. *Willaertia magna vykazuje rezistenciu voči Listeria monocytogenes*

[0033] Účinok *Listeria monocytogenes* na prežitie rôznych testovaných druhov améb sa určil pomocou vylučovacieho testu farbením trypánovou modrou. Veľmi rýchlo po začatí spoločnej kultivácie *Acanthamoeba castellanii* s baktériou sa u tohto druhu améby prejavuje výrazný cytotoxický účinok s poklesom životaschopnosti po 3 hodinách spoločnej kultivácie o ~ 50 % (pozri **Obrázok 1)**. Tento jav sa naopak nikdy nepozoroval vtedy, keď sa *Willaertia magna* spoločne kultivovala s *Listeria monocytogenes,* a to ani po 9 hodinách inkubácie pri životaschopnosti udržiavanej na úrovni 100 % **(Obrázok 1)**. Rovnako ako *Willaertia magna,* voľne žijúca améba *Hartmanella vermiformis* nevykazuje pokles životaschopnosti určenej vylučovacím testom farbením trypánovou modrou **(Obrázok 1).** Mikroskopickým skúmaním spoločne kultivovaných kultúr améb s *Listeria monocytogenes* sa preukázal výrazný sklon k zapuzdreniu v prípade *Hartmanella vermiformis* a životaschopných foriem *Acanthamoeba castellanii* (pozri **Tabuľku 1).** Tento jav zapuzdrenia nebol u *Willaertia magna* nikdy pozorovaný v prípade, ak sa spoločne kultivovala s patogénnou baktériou **(Tabuľka 1)**.

Tabuľka 1. Účinok *Listeria monocytogenes* na indukciu zapuzdrených foriem u rôznych druhov voľne žijúcich améb

	Čas spoločnej kultivácie (v hodinách)			
	0	3	6	9
Harmanella vermiformis	**NEZIS.**	+	++	++
Acanthamoeba castellanii	**NEZIS.**	**NEZIS.**	+	+++
Willaertia magna	**NEZIS.**	**NEZIS.**	**NEZIS.**	**NEZIS.**
Voľne žijúce améby sa spoločne kultivovali (čas 0 hodín) s *Listeria monocytogenes* v pomere 10 (10 baktérií/1 améba), ako je opísané v časti týkajúcej sa materiálov a spôsobov. Každé 3 hodiny po nasadení do spoločného rastového média sa odobrali rovnaké diely bunkových suspenzií tak, ako je vyznačené vo vyššie uvedenej tabuľke. Hustota zapuzdrených améb je vyjadrená nasledovne: **NEZIS:** nezistené zapuzdrené améby; +: výskyt zapuzdrených améb (množstvo pod 10 % životaschopných foriem); ++: zapuzdrených améb (množstvo v rozmedzí od 10 % do 30 % životaschopných foriem); +++: zapuzdrených améb (množstvo presahujúce 30 % životaschopných foriem).				

[0034] Všetky tieto pozorovania (nezapuzdrenie améb a nezistenie žiadnej toxicity vyvolávanej *Listeria monocytogenes*) jednoznačne dokazujú, že *Willaertia magna* na rozdiel od ostatných druhov améb má mimoriadnu schopnosť rezistencie voči *Listeria monocytogenes.*

2.2. Schopnosť hubenia baktérií *Listeria monocytogenes* amébami *Willaertia magna*

[0035] Výsledky spoločných kultivácií *Listeria monocytogenes* s amébami z rodu *Hartmannella* a *Acanthamoeba* preukázali, že v prítomnosti týchto rodov améb došlo k výraznému množeniu sa baktérie, pretože za 9 hodín bolo zaznamenané zvýšenie koncentrácie baktérií dosahujúce ~ 3 log (pozri **Obrázok 2).** Naproti tomu, keď sa spoločná kultivácia uskutoční v prísne rovnakých podmienkach, v prítomnosti améby *Willaertia magna* sa zisťuje úplné vyhubenie zistiteľných *Listeria monocytogenes* (pozri **Obrázok 2).** Zmeraný pokles koncentrácií *Listeria monocytogenes*est o ~ 6 Log za 3 hodiny dokazuje výraznú schopnosť *Willaertia magna* hubiť baktérie *Listeria monocytogenes.*

[0036] Tento účinok *Willaertia magna* na *Listeria monocytogenes* je tiež znázornený na **Obrázku 3.** Po 24 hodinách výskytu v prítomnosti *Willaertia magna* sa objavujú veľmi jasne ohraničené plochy agaru, kde došlo k vymiznutiu bakteriálneho filmu (tieto oblasti sa tu nazývajú rozsahy lýzy bakteriálnej vrstvy/biofilmu). Mikroskopickým skúmaním sa zistilo, že *Willaertia magna* sa skoncentrovala na hranici tohto rozsahu lýzy; tento účinok je znázornená na **Obrázku 3, panel C.** Zničenie bakteriálnej vrstvy amébami *Willaertia magna* je znázornené aj na **paneli D** na **Obrázku 3**, kde možno jasne rozlíšiť zhluky améb, obklopené zničenou alebo ničenou vrstvou baktérií. Tento jav naopak nebol nikdy pozorovaný v prítomnosti *Acanthamoeba castellanii* alebo *Hartmarzella vermiformis.* Mikroskopickým skúmaním agarov sa zistilo, že améby *Acanthamoeba castellanii* a *Hartmanella vermiformis* sa rýchlo zapuzdria v prípade, ak sa nasadia na film *Listeria monocytogenes.* Tento jav je znázornený na paneloch **A** a **B** na **Obrázku 3**. Takisto bola zaznamenaná úplná absencia rozsahu lýzy vrstvy baktérií *Acanthamoeba castellanii* a *Hartmanella vermiformis* na rozdiel od toho, čo sa pozorovalo pri *Willaertia magna.* Všetky tieto údaje a pozorovania jednoznačne dokazujú hubiaci účinok *Willaertia magna* na patogénne baktérie *Listeria monocytogenes.*

Zoznam literatúry

[0037]

1. Akya A, Pointon A, and 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, and 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, and Pernin P. Novel method for biologically combating the prolifération of Legionella pneumophila, and novel disinfecting agent containing amoebic protozoa of the Willaertia genus. edited by University CBL. France: 2010.

4. Dijkstra RG. The occurence 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, and de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis 14: 734-740, 2008.

6. Greub G, and Raoult D. Microorganisms résistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev 17: 413-433, 2004.

7. Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, and 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, and Russell AD. Encystation in Acanthamoeba castellanii: development of biocide résistance, J Eukaryot Microbiol 48: 11-16, 2001.

9. Ly TMC, and 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, and Stahl JP. Listeria monocytogenes encephalitis in France. Med Mal Infect In Press.

11. Pushkareva VI, and 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, and Devlieghere F. Résistance 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.

13. Rakic-Martinez M, Drevets DA, Dutta V, Katic V, and 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 In Press, 2011.

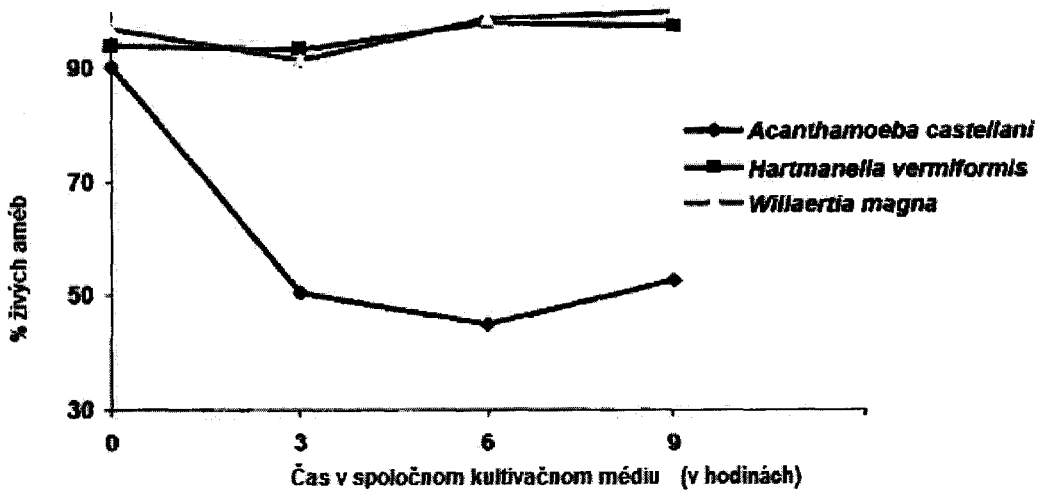
14. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, and Levi Y. Amoebae in domestic water systems: résistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. JAppl Microbiol 97: 950-963, 2004.

15. Weis J, and Seeliger HP. Incidence of Listeria monocytogenes in nature. Appl Microbiol 30: 29-32, 1975.

16. Zhou X, Elmose J, and Call DR. Interactions between the environmental pathogen Listeria monocytogenes and a free-living protozoan (Acanthamoeba castellanii). Environ Microbiol 9: 913-922, 2007.

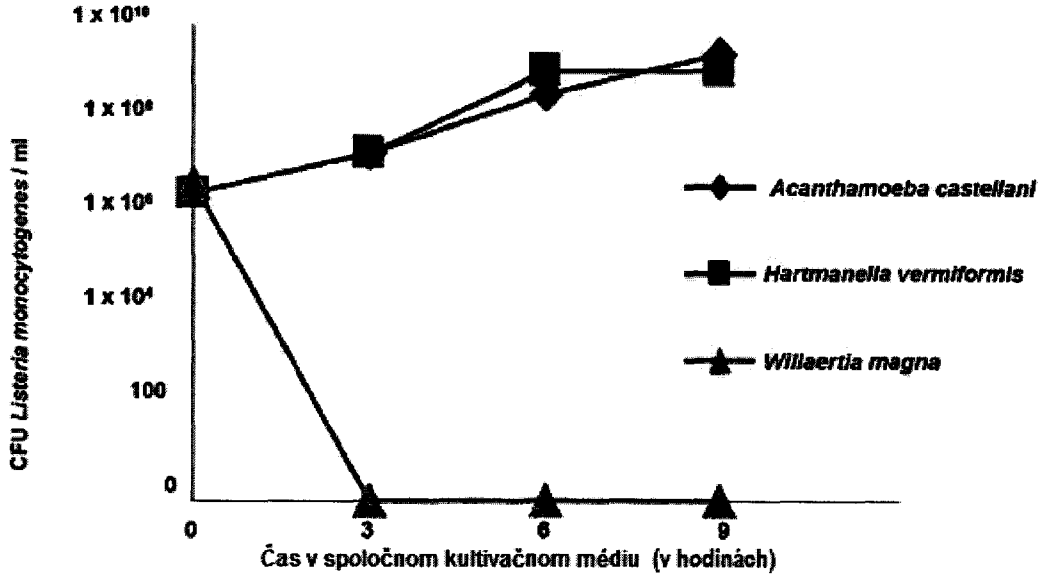
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob ochrany proti množeniu sa *Listeria monocytogenes*, s výnimkou spôsobov ošetrenia aplikovaného na ľudské alebo zvieracie telo, **vyznačujúci sa tým, že** využíva prvoky druhu *Willaertia magna.*
2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že** prúdy plynov alebo kvapalín alebo tuhý povrch sa ošetria prvokmi druhu *Willaertia magna.*
3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **vyznačujúci sa tým, že** tieto prvoky zodpovedajú kmeňu uloženému v ATCC pod číslom **PTA 7824** alebo kmeňu uloženému v ATCC pod číslom **PTA 7825**.
4. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým, že** sa používa na dezinfekciu rozvodných sietí úžitkovej vody alebo rozvodných sietí vody na priemyselné použitie, chladiacich okruhov pre priemyselné zariadenia alebo klimatizačných sietí, alebo akýchkoľvek priemyselných povrchov.
5. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým, že** sa používa na zamedzenie vytvárania biofilmov vo vodovodných potrubiach alebo na plochách, ktoré môžu byť v kontakte s potravinami alebo krmivami.
6. Použitie dezinfekčného prostriedku s obsahom prvokov druhu *Willaertia magna* ako biocídneho prostriedku na likvidáciu *Listeria*, s výnimkou použitia na ošetrenie aplikované na ľudské alebo zvieracie telo.
7. Použitie podľa nároku 6, **vyznačujúce sa tým, že** prvoky zodpovedajú kmeňu uloženému v ATCC pod číslom **PTA 7824** alebo kmeňu uloženému v ATCC pod číslom **PTA 7825**.
8. Použitie podľa nároku 6 alebo 7, **vyznačujúce sa tým, že** je vo forme vodného roztoku alebo suspenzie.

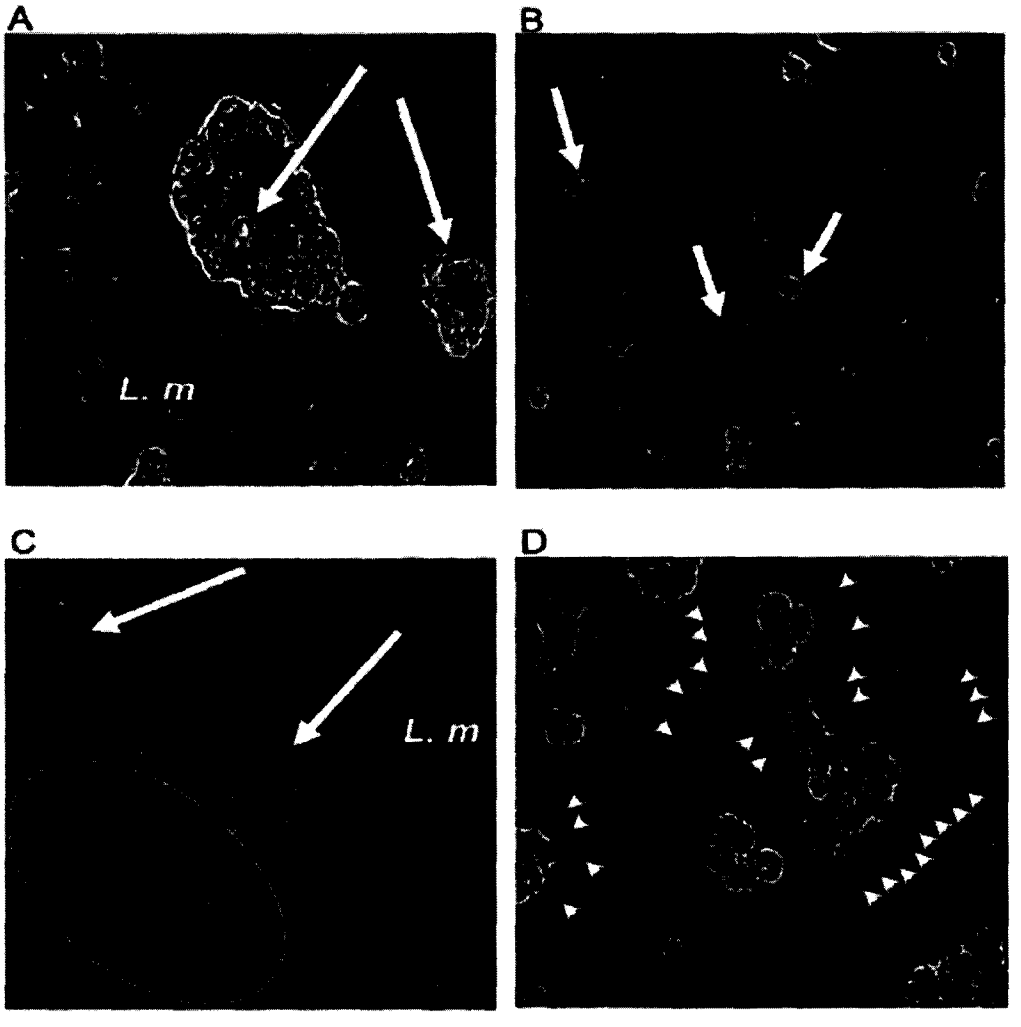

90
70
50
30
% živých améb
0
3
6
9
Čas v spoločnom kultivačnom médiu (v hodinách)
Acanthamoeba castellani
Hartmanella vermiformis
Willaertia magna

-

Obrázok 1


1 x 10¹⁰
1 x 10⁸
1 x 10⁶
1 x 10⁴
100
0
CFU Listeria monocytogenes / ml
0
3
6
9
Čas v spoločnom kultivačnom médiu (v hodinách)
Acanthamoeba castellani
Hartmanella vermiformis
Willaertia magna

Obrázok 2



Obrázok 3

Koniec dokumentu