



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 289 076**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02700453 .0**

(86) Fecha de presentación : **21.02.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1366365**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

(54) Título: **Detección de microorganismos en un combustible de hidrocarburos líquido.**

(30) Prioridad: **23.02.2001 GB 0104566**

(73) Titular/es: **Conidia Bioscience Limited
Bakeham Lane
Egham, Surrey TW20 9TY, GB**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

(72) Inventor/es: **Kelley, Joan**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 289 076 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

Detección de microorganismos en un combustible de hidrocarburos líquido.

5 La presente invención se refiere a un método para el análisis de combustible de hidrocarburos.

Se sabe que el combustible de hidrocarburos puede llegar a contaminarse con microorganismos, lo que es inde-
seable. Por ejemplo, *Hormoconis resinae* (el “hongo del combustible de los reactores”) puede crecer en el queroseno
10 de aviación produciendo problemas de corrosión y bloqueo en los tanques de las alas de los aviones. Se exige que
las líneas aéreas envíen muestras a laboratorios para someterlas a prueba si se sospecha que hay contaminación. La
mayoría de los laboratorios utilizan técnicas de cultivo habituales que pueden tardar hasta diez días en confirmarlo.
Existen en el mercado las denominadas pruebas “rápidas”. Sin embargo, todas se basan en técnicas de cultivo que
tardan 72 horas en obtener un resultado.

15 La mayor parte de las líneas aéreas no pueden aceptar ni siquiera este retraso, y automáticamente usan un biocida:
por tanto, las pruebas son meramente una confirmación retrospectiva de un problema. Un método de prueba genuina-
mente rápido eliminaría el gasto de tiempo de inactividad y los tratamientos biocidas que son realmente innecesarios.

20 En la actualidad, no hay todavía una prueba rápida disponible para determinar la presencia de microorganismos en
el combustible de hidrocarburos. La presente invención expone cómo tratar este problema.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de análisis de un combustible de hidrocarbu-
ros líquido para determinar la presencia de un microorganismo, comprendiendo el método mezclar una muestra de
25 combustible con un diluyente acuoso que contiene un emulsionante y poner en contacto la mezcla o una fase de la
misma con un anticuerpo policlonal producido contra el microorganismo que se ha hecho crecer en contacto con el
combustible de hidrocarburos, para detectar la presencia o ausencia del microorganismo.

El método comprende de manera adecuada las etapas de mezclar una muestra del combustible de hidrocarburos y
30 un anticuerpo reactivo con el microorganismo de interés, seguido por la detección de la unión del anticuerpo con el
microorganismo.

Se ha encontrado que el tratamiento del combustible con un anticuerpo producido contra un microorganismo
proporciona un ensayo muy rápido para determinar la presencia de ese microorganismo en el combustible. A modo
35 de ejemplo, se han desarrollado pruebas para detectar *Hormoconis resinae* en combustible de aviación que producen
resultados en 90 minutos. De esta manera, la presente invención permite que se usen biocidas sólo cuando se necesitan,
lo que es deseable ya que los biocidas son compuestos potencialmente peligrosos de usar y manejar. Por el contrario,
Campos Lopes y Gaylarde, Int. Biodeterioration & Biodegradation 8(1996) 37-40 dan a conocer un método en el que
40 se filtra la muestra de combustible y luego se bloquea la almohadilla filtrante, se seca, se fija con formaldehído, se lava
tres veces, se incuba con el anticuerpo específico y se lava de nuevo tres veces. Entonces se añade el conjugado del
anticuerpo y se incuba adicionalmente. Despues de tres lavados, se seca el filtro y se observa, llevando el procedimiento
completo más de cuatro horas.

Puede analizarse cualquier combustible de hidrocarburos líquido para determinar la contaminación por microor-
ganismos usando la presente invención, aunque de manera adecuada se lleva a cabo el análisis con combustible de
45 destilado ligero-medio. Se prefieren combustibles y componentes de combustible líquidos que tienen un punto de
ebullición inferior a 390°C, tales como combustible de aviación y diésel, y combustibles de hidrocarburos con una
composición equivalente o similar. Se conocen bien en la técnica otros combustibles de hidrocarburos adecuados. La
gasolina es otro combustible preferido en la presente invención.

50 La invención se refiere a la detección de cualquier microorganismo que puede estar presente en un combustible de
hidrocarburos. Por ejemplo, las especies de bacterias, levaduras y hongos pueden analizarse todas usando el método de
la invención. Ejemplos de bacterias que pueden vivir en un combustible de hidrocarburos, y para las que se prefiere el
análisis, incluyen especies de *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, incluyendo los ejemplos preferidos de levaduras especies
55 de *Candida*, *Yarrowia* y *Rhodotorula*, aunque la invención no se limita al análisis de estas especies solamente. Se
prefiere particularmente la especie fúngica *Hormoconis resinae*, también conocida como *Cladosporium resinae*, y
denominada *Amorphotheca resinae* durante su fase sexual. Otros hongos incluyen *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*,
Alternaria alternata, *Paecilomyces viriotii* y *Penicillium* sp.

60 El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier anticuerpo polyclonal
adequado que es reactivo con un microorganismo particular. El término “anticuerpo” no se limita así simplemente
a anticuerpos que se producen de manera natural, e incluye fragmentos de anticuerpos completos y derivados de
anticuerpos, por ejemplo. Si se usan fragmentos o derivados de anticuerpos, se prefiere que la reactividad del agente
con respecto al antígeno del microorganismo se mantenga sustancialmente en comparación con el anticuerpo nativo
completo, de tal manera que puede usarse el anticuerpo para detectar el microorganismo. La preparación de tales
65 anticuerpos es convencional en la técnica.

A nivel molecular, se apreciará que la reactividad o especificidad del anticuerpo está determinada generalmente por
antígenos expresados o asociados con un microorganismo. En consecuencia, cualquier referencia a la reactividad de

ES 2 289 076 T3

un anticuerpo para un microorganismo en el presente documento se refiere generalmente a esta interacción antígeno-anticuerpo, que define la diana y especificidad del anticuerpo.

Preferiblemente, el anticuerpo es específico para el microorganismo de interés. De esta manera, puede identificarse 5 una especie particular de microorganismos usando la invención. Sin embargo, también es posible usar un anticuerpo en la presente invención que es reactivo con un antígeno o derivado común para varias especies. En este caso, el anticuerpo no es específico de la especie, pero todavía permite la detección de una clase de microorganismo presente en el combustible de hidrocarburos. En consecuencia, la presente invención se refiere también a un método para la detección de una clase de microorganismo en el combustible de hidrocarburos, estando definida la clase por un 10 antígeno común.

Dependiendo de los métodos de ensayo y detección usados, pueden conjugarse opcionalmente los anticuerpos para su uso en la presente invención con otras proteínas o marcadores químicos, para facilitar la detección del anticuerpo que se une al antígeno. Se prefieren los anticuerpos conjugados con elementos enzimáticos tales como fosfatasa alcalina, 15 o grupos fácilmente detectables tales como oro coloidal, biotina y estreptavidina. Se conocen bien en la técnica otros agentes de conjugación adecuados.

Puede usarse cualquier método de detección adecuado en la presente invención para el análisis de la unión al anticuerpo. Se prefieren los métodos en los que se detecta el resultado óptica o visualmente, tal como los ensayos 20 colorimétricos. De manera adecuada, puede usarse un ensayo ELISA, tal como un ensayo intercalado ("sándwich") o de doble capa, para los que son convencionales los métodos en la técnica. Se prefiere un ensayo de competencia en el que el antígeno unido a un sustrato, tal como una placa de microtitulación, y el antígeno en la muestra de prueba compiten por la unión al anticuerpo.

25 También puede llevarse a cabo la detección de la unión al anticuerpo usando dispositivos de flujo lateral, tales como varillas de inmersión, que son de nuevo convencionales en la técnica. Los kits de embarazo disponibles en el mercado ilustran una realización sencilla de tal tecnología. A modo de ejemplo, puede aplicarse una muestra de antígeno de prueba a una varilla de inmersión, comprendiendo la varilla de inmersión una mecha adecuada y un anticuerpo inmovilizado reactivo con el antígeno. El movimiento por efecto mecha de la muestra a lo largo de la 30 varilla de inmersión pone a cualquier antígeno en contacto con el anticuerpo inmovilizado. Entonces puede detectarse el antígeno unido, por ejemplo, mediante reacción adicional con un anticuerpo marcado. Otras realizaciones de la tecnología de varilla de inmersión y métodos de análisis que usan tal tecnología son convencionales en la técnica.

Aunque los sistemas de detección radiomarcados son menos preferidos, no obstante, los métodos que implican 35 radiomarcaje (tales como radioinmunoanálisis y las pruebas radioalergosorbentes) también son eficaces en la detección de la unión antígeno-anticuerpo de la presente invención.

En la presente invención, la presencia de un emulsionante facilita la interacción entre el anticuerpo y el antígeno 40 en la muestra de combustible.

Puede usarse cualquier emulsionante adecuado en la invención. Se prefieren emulsionantes fuertes y emulsionantes que minimizan cualquier efecto desnaturalizante en la muestra de combustible sobre el anticuerpo. Puede evaluarse fácilmente la idoneidad del emulsionante, por ejemplo, comparando la unión del anticuerpo al antígeno en una muestra 45 de combustible contaminada en presencia de diferentes emulsionantes.

Generalmente, se prefieren tensioactivos no iónicos en la presente invención, prefiriéndose particularmente tensioactivos de etoxilato de alquilo tales como los Triton y monoésteres de sorbitano-polioxietileno tales como monolaurato de sorbitano-polioxietileno (20) (también conocido como Tween 20) como emulsionantes. De manera adecuada, 50 puede prepararse un emulsionante tal como Tween 20 en agua desionizada y usarse a una concentración del 0,01 - 10%, preferiblemente del 1-5%, lo más preferiblemente del 2,5% en volumen. Sin embargo, es probable que las concentraciones óptimas de los emulsionantes varíen con el combustible que se esté analizando, y pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica.

El método de la presente invención no requiere el cultivo del microorganismo, y por tanto, pueden obtenerse 55 resultados muy rápidamente. Normalmente, el método proporciona un resultado en menos de 2 horas desde el inicio del análisis del combustible, es decir, el punto en el que se trató en primer lugar la muestra de combustible de alguna manera.

En la presente invención, el microorganismo se incuba en combustible de hidrocarburos líquido durante al menos 60 una etapa del proceso de crecimiento. El microorganismo y/o el antígeno se recuperan entonces de manera adecuada de los medios de crecimiento usando técnicas convencionales. De esta manera, es probable que la configuración de los antígenos presentes en y sobre un microorganismo refleje aquellos presentes en las muestras derivadas del combustible de hidrocarburos. De esta manera, puede optimizarse la reacción del anticuerpo frente a los antígenos en las muestras de prueba del combustible.

65 Ahora se ilustra la invención mediante, pero no se limita a, el siguiente ejemplo.

ES 2 289 076 T3

Ejemplo 1

Análisis de *H. resinae* en combustible de hidrocarburos usando ELISA

5 Materiales

Preparación de antígeno/Hormoconis resinae

Se usa la preparación de antígeno tanto en el recubrimiento de las microplacas como en la producción de los 10 patrones usados en la prueba ELISA.

- 1 Se hace crecer *H. resinae* sobre agar extracto de malta (20 g de extracto de malta de cebada caramelizada (toffee barley), 20 g de agar oxido nº 3, 1 litro de agua del grifo, pH 6,5, esterilizada en autoclave a 121°C durante 15 minutos) durante 7-10 días a 25°C.
- 15 2 Se prepara una suspensión de esporas en caldo líquido “Bushnell Haas” (Difco). Se usan aproximadamente 3 ml de suspensión por 100 ml de preparación de combustible como inoculante, tal como se describe a continuación.
- 20 3 Se inocula *H. resinae* en un medio de combustible preparado haciendo flotar combustible susceptible estéril sobre caldo Bushnell Haas estéril en la razón aproximada de 1:3.
- 4 Se incuba el medio a 25°C hasta que se obtiene un manto fúngico confluente en el recipiente.
- 25 5 Se recoge con filtro el manto del medio y se lava con agua destilada estéril.
- 6 Entonces se homogeneiza el manto en agua destilada estéril sobre hielo en un agitador de perlas Mickle durante 4 minutos.
- 30 7 Se centrifuga la suspensión resultante en una centrífuga (5 min. a 5000 rpm) y se lava tres veces con agua destilada estéril.
- 8 Se liofiliza el sedimento de homogeneizado final y se usa este producto como el antígeno.

35 Antígeno para el recubrimiento de placas

- 1 Se preparó una disolución 2 mg/ml de antígeno homogeneizado en tampón PBS, pH 7,4 y se agitó vigorosamente durante la noche a 4°C.
- 40 2 Entonces se preparan 20 µg/ml de la suspensión de antígeno en tampón TRIS (Tris 50 mM) a pH 8,5 y se recubre sobre los pocillos de placas de microtitulación a 100 µl/pocillo.
- 3 Entonces se incuban las placas durante la noche a 4°C.
- 45 4 Se lavan las placas con un tampón de bloqueo/abrillantado que contiene el 5% en peso de lactosa, el 0,2% en peso de gelatina de pescado y el 0,1% de azida de sodio preparado en agua desionizada (el bloqueo se debe a la presencia de la proteína de gelatina de pescado y el abrillantado a la presencia de lactosa).
- 50 5 Se incuban las placas durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que se aspire el líquido y se dejan secar las placas a temperatura ambiente durante la noche.

Antígeno para los patrones de las placas

Se añade tampón PBS con un 20% de etanol a un volumen (de concentración conocida, por ejemplo, 2 mg/ml) de 55 la suspensión de antígeno para producir patrones de concentración apropiada, por ejemplo, de manera adecuada 100 µg/ml, 30 µg/ml, 5 µg/ml.

Anticuerpo

60 Se usó el antígeno preparado a partir de *H. resinae* (anteriormente) para generar un anticuerpo polyclonal en ovejas usando técnicas convencionales.

Reactivos de conjugado (indicador)

65 Se usó un conjugado de anticuerpo de asno anti-oveja conjugado con fosfatasa alcalina como indicador en el ensayo, para identificar el anticuerpo anti-*H. resinae* de oveja. También es posible conjugar la proteína fosfatasa alcalina con el antisero polyclonal anti-*H. resinae* de oveja, y luego usarlo directamente como indicador en el ensayo.

ES 2 289 076 T3

Diluyente de muestras

El diluyente de muestras comprende un 2,5% en volumen de Tween 20, preparado en agua desionizada.

5 *Reactivos de ensayo para un método ELISA (puede proporcionarse como un kit)*

- 1 Microplaca recubierta previamente con *Hormoconis resinae* de 12 x 8 tiras (proporcionado de manera adecuada en una bolsa cerrada herméticamente).
- 10 2 Patrones de *Hormoconis resinae*: Las concentraciones patrón oscilan entre 0-100 µg/ml. Cada vial marcado con la concentración.
- 15 3 Anticuerpo contra *Hormoconis resinae* en tampón Tris con colorante azul inerte (azul de cresilo a 15 mg/litro), estabilizador de proteínas (BSA al 1% p/v) y azida de sodio al 0,1% p/v.
- 20 4 Reactivo de segundo anticuerpo marcado de asno anti-oveja: en tampón Tris con colorante azul inerte y estabilizador de proteínas (como anteriormente) y azida de sodio al 0,1% p/v.
- 25 5 Reactivo de sustrato para ELISA: consiste en monofosfato de fenoftaleína (PMP, preparado a 22,5 g/2,5 litros) y un cofactor enzimático ($MgCl_2$ 1 M/2,5 litros) en tampón dietanolamina (262,5 g/2,5 litros, preparado en agua desionizada).
- 30 6 Disolución de detención de ELISA: consiste en hidróxido de sodio (70 g/litro) y un agente quelante (EDTA, 74,4 g/litro) en un tampón dietanolamina como anteriormente.
- 35 7 Concentrado de tampón de lavado para ELISA (conc. x 10). Consiste en tampón fosfato (PBS, pH 7,4) con azida de sodio, concentración final del 0,1% p/v y Tween (concentración final del 0,5% v/v).

Materiales y equipo requerido

- 30 Pipetas automáticas de precisión y puntas desechables.
Lector de placas de microtitulación con filtro de 550 nm.
35 Lavador de placas de microtitulación.
Agua destilada o desionizada.
40 Agitador de placas de microtitulación.

Método

Preparación de muestras

- 45 1 Mezclar rigurosamente la muestra de combustible.
- 2 Tomar una alícuota de la(s) muestra(s) de combustible del recipiente y añadir una cantidad igual de diluyente de muestras. Puede usarse la prueba para evaluar las fases de agua y/o combustible.
- 50 3 Mezclar vigorosamente durante unos cuantos segundos para emulsionar.
- 4 Tomar 100 µl de la mezcla y añadirla según se instruye en el protocolo del ensayo (a continuación).

Protocolo del ensayo

- 55 1. Retirar la placa recubierta previamente de la bolsa cerrada herméticamente y registrar las ubicaciones de la muestra y el control en una hoja plantilla de 12 x 8.
- 60 2. Pipetear 100 µl de los patrones y las muestras en los pocillos apropiados. Los patrones deben someterse a prueba por duplicado. Cada muestra debe someterse a prueba por duplicado para obtener resultados óptimos.
3. Dispensar 50 µl de anticuerpo contra *Hormoconis resinae* a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos usando el agitador de placas.
- 65 4. Lavar la placa 4 veces con tampón de lavado para ELISA como anteriormente (300 µl/pocillo), invertir y dar pequeños golpes con firmeza sobre papel absorbente. Asegurarse de que los pocillos están bastante secos.

ES 2 289 076 T3

5. Dispensar 100 μl de anticuerpo de conjugado con fosfatasa alcalina de asno anti-oveja a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos usando un agitador de placas.
6. Lavar la placa 4 veces con tampón de lavado como anteriormente (300 μl /pocillo), invertir y dar pequeños golpes con firmeza sobre papel absorbente. Asegurarse de que los pocillos están bastante secos.
10. 7. Dispensar 100 μl de reactivo de sustrato para ELISA a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos usando el agitador de placas.
15. 8. Dispensar 50 μl de disolución de detención de ELISA como anteriormente a cada pocillo. Mezclar dando pequeños golpes suaves al lateral de la placa.
9. Limpiar la superficie inferior de la placa para que esté libre de condensación con un pañuelo de papel suave. Leer la placa usando un lector de placas de microtitulación a 550 nm.

15 Ejemplo 2

Análisis de la muestra de combustible

20 Se suministraron muestras de combustible por una línea aérea para someterlas a prueba. Se sabía que 2 muestras tenían contaminación fúngica al haberse sometido a prueba mediante ensayos de cultivo convencionales. Se trataron las muestras según se expone en el ejemplo 1. Se emulsionaron las muestras y se sometieron a prueba el día del ensayo. Los resultados se muestran a continuación. Los resultados del ensayo ELISA confirman el ensayo de cultivo, teniendo las muestras 2082/32 y /36 un alto contenido fúngico.

	<u>Identidad de las muestras</u>	<u>Conc. $\mu\text{g}/\text{ml}$</u>	<u>Conc. $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$</u>
25	2082/32	> 200	> 20.000
30	2082/33	1	100
	2082/34	0,30	30
35	2082/35	0,34	34
	2082/36	134	13.400
	2082/37	1,8	180
40	2082/38	0,4	40
	2082/39	0	0

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de análisis de un combustible de hidrocarburos líquido para determinar la presencia de un microorganismo, comprendiendo el método mezclar una muestra de combustible con un diluyente acuoso que contiene un emulsionante y poner en contacto la mezcla o una fase de la misma con un anticuerpo policlonal producido contra el microorganismo que se ha hecho crecer en contacto con el combustible de hidrocarburos, para detectar la presencia o ausencia del microorganismo.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende mezclar vigorosamente el combustible y el diluyente acuoso antes del contacto con el anticuerpo.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el emulsionante es un detergente no iónico.
- 20 4. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el emulsionante es monolaurato de sorbitano-polioxietileno (20).
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que el emulsionante se usa a una concentración del 0,01-10% en volumen.
- 30 6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el combustible de hidrocarburos es un combustible de destilado ligero-medio que tiene un punto de ebullición inferior a 390°C.
- 35 7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el microorganismo es *Hormoconis resinae*.

30

35

40

45

50

55

60

65