

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 888**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013** **E 13184238 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2708604**

54 Título: **Procedimiento de determinación de un riesgo de contaminación por aspergillus basado en la detección de compuestos orgánicos volátiles microbianos**

30 Prioridad:

14.09.2012 FR 1258646

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

25.09.2017

73 Titular/es:

**CENTRE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DU
BATIMENT (CSTB) (100.0%)
84 avenue Jean Jaurès
77420 Champs sur Marne, FR**

72 Inventor/es:

**MOULARAT, STÉPHANE y
ROBINE, ENRIC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 633 888 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 determinación de un riesgo de contaminación por *Aspergillus* basado en la detección de compuestos orgánicos volátiles microbianos

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de una huella química específica de contaminación por *Aspergillus* en ambientes interiores.

Por ambiente interior se entiende un espacio confinado al interior de un edificio que se ventila de manera no continua. Pueden encontrarse ejemplos de ambientes interiores en habitaciones, museos, iglesias, bodegas, monumentos históricos, edificios administrativos, colegios y hospitales.

- 10 El desarrollo fúngico va acompañado de emisión de COVm (Compuestos Orgánicos Volátiles de origen microbiano) desde el comienzo de su desarrollo y durante el conjunto de fases de crecimiento de micromicetos.

Técnica anterior

- 15 En este campo, se conoce la solicitud de Patente Internacional WO 2004/051226 que trata sobre procedimientos de vigilancia de entornos en riesgo con respecto a la presencia o ausencia de microbios. Esta invención se caracteriza por la búsqueda de un marcador cnp60.

Sin embargo, este documento se limita a la búsqueda de una chaperonina (cnp60) lo que implica extracciones celulares que deben ser selectivas para esta chaperonina.

- 20 Este tipo de procedimiento implica un crecimiento significativo de micromicetos, entonces colección y extracción de la chaperonina. Por supuesto, es preferible evitar la generación de micromicetos potencialmente peligrosos para el ser humano. Además, la detección de chaperonina resulta muy difícil en comparación con una detección de COV.

- 25 Para paliar estos inconvenientes, la solicitante ha puesto a punto un procedimiento de detección de contaminación fúngica de un ambiente interior, con la ayuda del cálculo de un índice químico de contaminación fúngica. Este procedimiento se describe en la solicitud de patente internacional WO 2008/125770. Esta herramienta ha permitido pronunciarse sobre la presencia de micromicetos en 37 a 42% de las viviendas francesas con ocasión de la campaña nacional del Observatorio de la Calidad del Aire Interior (Moularat et al., 2008a).

Sin embargo, este procedimiento no permite concluir de manera específica si hay o no riesgo de contaminación por *Aspergillus*.

- 30 Polizzi et al., (Fungal Biology, 116, 941-953, 2012) han descrito la detección de diferentes COVm en locales contaminados por micromicetos y la comparación de los COVm detectados con los perfiles de COVm producidos por micromicetos aislados de estos mismos locales, varias especies de *Aspergillus* de los mismos, cuando son cultivados in vitro en medio MEA (del inglés, Malt extract agar). Estos autores indican que 4 COVm (α -copaeno, geranil acetona, trans-calameneno y α -calacoreno), detectados en locales donde la presencia de *Aspergillus* es predominante, son producidos igualmente in vitro por ciertas cepas de la especie *Aspergillus ustus*.

Exposición de la invención

- 35 En este contexto, el índice de contaminación fúngica puesto a punto por la solicitante y descrito en la solicitud de Patente Internacional WO 2008/125770 podría completarse y afinarse por una detección precoz de desarrollo de *Aspergillus*.

Para paliar los inconvenientes de la técnica anterior, la solicitante propone un procedimiento para la determinación de riesgo de contaminación por *Aspergillus* en un ambiente interior, que comprende las etapas de:

- 40 (a) extracción de una muestra de aire en el ambiente interior, después
- (b) detección de COVm en la muestra, comprendiendo esta etapa la búsqueda de una huella química que comprenda al menos una molécula objetivo que sea un COVm, asociado al metabolismo de *Aspergillus*, siendo seleccionada dicha molécula objetivo entre los COVm siguientes: 1,4-pentadieno, 4-heptanona, disulfuro de dimetilo, metoxibenceno, 1,3-butanodiol, 1,4-hexadieno, 1-metoxi-2-metil-benceno, 1-octen-3-ona, 1-penteno, 2(5H)-furanona, 2-metil-isoborneol, 3,3-dicloro-1-propeno, 3-butin-1-ol, 3-heptanol, 3-heptanona, 3-metil-2-butanol, 3-metilhexano, 4-heptanol, 4-metil-2-hexanona, cariofileno, trisulfuro de dimetilo, eremofileno, germacreno D, isoleveno, longifoleno, 2-etilhexanoato de metilo, muurulano, terpinoleno..
- 45

Por "riesgo de contaminación por *Aspergillus*" se entiende desarrollo de micromicetos del género *aspergillus* sobre un sustrato determinado.

- 50 De manera particularmente ventajosa, la detección de dichas moléculas objetivo es más fácil y más rápida que la

detección de cepas de aspergillus o metabolitos de Aspergillus solubles.

Según un modo de realización preferido, la etapa (b) comprende las subetapas siguientes antes de la búsqueda de una huella química que comprenda al menos una molécula objetivo que sea un COVm, asociado al metabolismo de Aspergillus:

5 - detección de COV en la muestra, que comprende la detección de la presencia o ausencia de ciertos COV predeterminados resultantes del metabolismo fúngico, comprendiendo estos COV predeterminados al menos un COV de cada una de las tres categorías de COV siguientes:

(1) los COV que son emitidos independientemente de la especie fúngica y su sustrato y que sólo son emitidos por especies fúngicas;

10 (2) los COV que son emitidos independientemente de la especie fúngica y su sustrato y que son emitidos por especies biológicas no fúngicas;

(3) los COV que son emitidos en función de la especie fúngica y/o su soporte;

- cálculo de un índice químico de contaminación fúngica en función respectivamente de la presencia y ausencia de COV predefinidos resultantes del metabolismo fúngico.

15 Por "sustrato" de una especie fúngica, se entiende el material sobre el que se desarrolla la especie fúngica, preferiblemente un material de construcción tal como papel pintado, tela de vidrio u otro.

Ventajosamente, la huella química es específica de al menos una especie de aspergillus elegida entre: *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger*.

20 Como alternativa, dicha molécula objetivo se selecciona del grupo que comprende: 1,4-pentadieno, 4-heptanona, disulfuro de dimetilo, metoxibenceno. Estas moléculas objetivo son específicas de una pluralidad de cepas de Aspergillus.

25 Según otra alternativa, dicha molécula objetivo se selecciona del grupo que comprende: 1,3-butanodiol, 1,4-hexadieno, 1-metoxi-2-metilbenceno, 1-octen-3-ona, 1-penteno, 2(5H)-furanona, 2-metil-isoborneol, 3,3-dicloro-1-propeno, 3-butin-1-ol, 3-heptanol, 3-heptanona, 3-metil-2-butanol, 3-metilhexano, 4-heptanol, 4-metil-2-hexanona, cariofileno, trisulfuro de dimetilo, eremofileno, germacreno D, isoleveno, longifoleno, 2-etilhexanoato de metilo, muuroilano, terpinoleno. Estas moléculas objetivo son específicas de una o dos cepas de Aspergillus.

30 Así, el procedimiento según la invención puede realizarse con dichas moléculas objetivo, que es específico de una o dos cepas de Aspergillus. Como alternativa, esta molécula objetivo es específica de más de dos cepas de Aspergillus.

30 Según una alternativa preferida, la huella química comprende al menos dos moléculas objetivo.

Según otra alternativa, la huella química comprende todas esas moléculas objetivo.

Ventajosamente, el procedimiento comprende una etapa de búsqueda de zonas de contaminación fúngica realizada antes de la etapa (a). Así, el procedimiento según esta alternativa comienza por esta etapa.

35 El procedimiento según el segundo modo de realización de la invención es útil, en particular, para la detección precoz de riesgo de contaminación por Aspergillus, es decir, antes de la aparición de cantidades significativas para detección microbiológica. Esta posibilidad de detección precoz es tanto más interesante cuanto no requiera detección directa de especies de aspergillus. Así se puede concluir contaminación por Aspergillus en un estadio precoz de desarrollo de hongos. Por "estadio precoz" de desarrollo, se entiende un estadio en el que son invisibles los micromicetos en la superficie del sustrato y preferiblemente indetectables para el análisis microbiológico del aire, pero producen sin embargo metabolitos y productos de degradación inhalables y responsables en ciertos casos de enfermedades.

40 **Descripción detallada de un modo de realización.**

La presente invención se basa en el estudio en laboratorio de las emisiones de COV de 4 especies del género Aspergillus:

- Aspergillus restrictus,

45 - A. versicolor,

- A. sydowii,

- A. niger.

Estas especies han sido cultivadas al abrigo de la luz y a 25°C sobre diferentes materiales esterilizados que

frecuentemente se encuentran contaminados en ambientes interiores. Un sustrato de referencia no emisor, constituido por fibra de vidrio con una disolución nutritiva embebida, ha sido utilizado igualmente para el conjunto de las cepas ensayadas. La disolución nutritiva utilizada es, por ejemplo, una disolución acuosa que comprende especialmente K₂HPO₄, KCl, MgSO₄, FeSO₄, glucosa y NaNO₃. Esta disolución está tamponada a un pH de 7,4.

5 Por supuesto, puede utilizarse otra disolución nutritiva conocida sin apartarse del alcance de la invención.

El plan de manipulación se resume en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Cepas fúngicas ensayadas en función del sustrato de crecimiento

	Sustrato de referencia	Tela de vidrio	Corcho	Placa de techo	Papel pintado "vinilo"	Placa de yeso	Papel encolado de gelatina	Papel sin lignina	Papel con lignina	Papel permanente	Lino
<i>A. restrictus</i>	X						X	X	X	X	
<i>A. versicolor</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>A. sydowii</i>	X										X
<i>A. niger</i>	X	X	X	X	X	X					

10 En la tabla 1, una cruz indica la identificación de la cepa de aspergillus (en línea) que se desarrolla sobre el sustrato de crecimiento (en columna).

El sustrato de referencia sirve aquí de testigo positivo para validar la capacidad de las cepas de aspergillus para desarrollarse. El sustrato utilizado aquí es fibra de vidrio con disolución nutritiva embebida descrito a continuación. Por supuesto, puede utilizarse otro sustrato de referencia conocido.

15 Las cepas estudiadas se desarrollan todas sobre el sustrato de referencia y sobre al menos otro sustrato de crecimiento entre los ensayados. La cepa *A. sydowii* solo crece sobre lino. Las otras cepas *A. restrictus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. niger* crecen sobre más de dos sustratos de crecimiento entre los ensayados.

Durante este estudio, se identificaron 28 COV únicamente a partir de cepas de Aspergillus (Tabla 2):

Tabla 2: Compuestos emitidos en presencia de desarrollo de Aspergillus.

COV	N° CAS	Aspergillus restrictus	Aspergillus versicolor	Aspergillus sydowii	Aspergillus niger
1,4-pentadieno	591-93-5	X	X	X	X
4-heptanona	123-19-3	X	X	X	X
Disulfuro de dimetilo	624-92-0	X	X	X	X
Metoxibenceno	100-66-3	X	X	X	X
1,3-butanodiol	107-88-0		X		
1,4-hexadieno	592-45-0	X			
1-metoxi-2-metilbenceno	578-58-5		X		
1-octen-3-ona	4312-99-6			X	X

COV	N° CAS	Aspergillus restrictus	Aspergillus versicolor	Aspergillus sydowii	Aspergillus niger
1-penteno	109-67-1	X	X		
2(5H)-furanona	497-23-4		X		
2-metil-isoborneol	2371-42-8				X
3,3-dicloro-1-propeno	563-57-5	X			
3-butin-1-ol	927-74-2			X	
3-heptanol	589-82-2				X
3-heptanona	106-35-4	X	X		
3-metil-2-butanol	598-75-4		X		
3-metilhexano	589-34-4		X		
4-heptanol	589-55-9	X			
4-metil-2-hexanona	105-42-0			X	X
Cariofileno	87-44-5				X
Trisulfuro de dimetilo	3658-80-8	X			
Eremofileno	10219-75-7				X
Germacreno D	23986-74-5				X
Isoledeno	156108				X
Longifoleno	475-20-7				X
2-Etilhexanoato de metilo	816-19-3		X		X
Murolano	29788-41-8				X
Terpinoleno	586-62-9				X

La tabla 2 enumera los COV emitidos en presencia de diferentes cepas de Aspergillus. Las extracciones y el análisis de estos COV se realizan después de 7 días de incubación de las cepas a 25°C. Las cruces indican identificación del COV a partir del crecimiento de la especie sobre al menos un sustrato de crecimiento.

- 5 Como se puede ver en la tabla 2, los cuatro primeros COV son marcadores de cuatro especies de aspergillus, mientras que los otros COV son marcadores de una o dos especies de aspergillus.

Así, esta lista de compuestos puede dividirse en 2 grupos:

Los compuestos emitidos por el conjunto de especies de Aspergillus ensayadas (grupo 1 resaltado en gris en la tabla).

- 10 Los compuestos emitidos por al menos una y a lo sumo tres de cuatro especies de Aspergillus ensayadas (grupo 2).

Desde el punto de vista práctico, después de la determinación de la presencia de desarrollo fúngico, por ejemplo, por el índice de contaminación fúngica, la búsqueda de objetivos específicos enumerados en la Tabla 2 permite alertar sobre un probable desarrollo de especies de Aspergillus. En efecto, la presencia de al menos uno de estos objetivos indica la presencia probable de desarrollo de especies de Aspergillus.

- 15 El número de trazadores identificados se correlaciona con la probabilidad de presencia de desarrollo de Aspergillus. La ausencia de compuestos del grupo 1 disminuye esta probabilidad.

Pueden identificarse otras moléculas objetivo. De manera general, las moléculas objetivo de este tipo pueden consistir en cualquier COV relacionado con los esquemas metabólicos de *Aspergillus*, es decir, un COV producido por una cepa de *Aspergillus* por el metabolismo de *Aspergillus*.

5 Así, la determinación de una huella de contaminación por *Aspergillus* basada en la detección de COV_m químicos específicos que permitan completar los índices de contaminación fúngica ya desarrollados en la solicitud de Patente Internacional WO 2008/125770, proporcionando criterios claros y fiables para las decisiones relativas, por ejemplo, a la ocupación y la renovación de edificios contaminados.

En la aplicación del procedimiento según una variante preferida, se realizan sucesivamente las etapas de:

10 a) extracción de una muestra de aire en un ambiente interior, por ejemplo, en la proximidad de zonas que se sospecha que están contaminadas;

b) detección de COV en la muestra, que comprende detección de la presencia o ausencia de ciertos COV predeterminados resultantes del metabolismo fúngico, comprendiendo estos COV predeterminados al menos un COV de cada una de las tres categorías de COV siguientes:

15 (1) los COV que son emitidos independientemente de la especie fúngica y su sustrato y que sólo son emitidos por especies fúngicas;

(2) los COV que son emitidos independientemente de la especie fúngica y el sustrato, pero que pueden tener igualmente otros orígenes biológicos por COV que tengan "otros orígenes biológicos", se entiende especialmente COV emitidos por especies biológicas no fúngicas;

(3) los COV que son emitidos en función de la especie fúngica y/o su soporte;

20 c) cálculo de un índice químico de contaminación fúngica en función, respectivamente, de la presencia y ausencia de COV predefinidos, resultantes del metabolismo fúngico, según el procedimiento descrito en la solicitud de Patente Internacional WO 2008/125770, para determinar si hay contaminación fúngica;

Después, para determinar si hay contaminación por *Aspergillus*, se realizan además las etapas:

25 d) búsqueda de al menos una molécula objetivo, que sea un COV resultante de metabolismo de *Aspergillus*, en particular al menos una molécula objetivo seleccionada del grupo que comprende: 1,4-pentadieno, 4-heptanona, disulfuro de dimetilo, metoxibenceno, 1,3-butanodiol, 1,4-hexadieno, 1-metoxi-2-metilbenceno, 1-octen-3-ona, 1-penteno, 2(5H)-furanona, 2-metilisoborneol, 3,3-dicloro-1-propeno, 3-butin-1-ol, 3-heptanol, 3-heptanona, 3-metil-2-butanol, 3-metilhexano, 4-heptanol, 4-metil-2-hexanona, cariofileno, trisulfuro de dimetilo, eremofileno, germacreno D, isoledeno, longifoleno, 2-etilhexanoato de metilo, muurolano, terpinoleno y preferiblemente,

30

e) búsqueda de una huella química que comprenda al menos dos de dichas moléculas objetivo.

De manera interesante, novedosa e inventiva, los resultados procedentes de las etapas d) y e) permiten determinar con precisión, claridad y fiabilidad si hay o no riesgo de contaminación por *Aspergillus*.

35 Este modo de realización conduce, por supuesto, a resultados más completos que los de la técnica anterior, de manera que se llega no solamente a concluir una contaminación fúngica sin ningún signo visible de desarrollo fúngico, sino además se llega a determinar desarrollo de *Aspergillus* de manera precisa y fiable.

En otra variante de la invención, también se pueden buscar zonas de contaminación fúngica, extraer después una muestra de aire en la proximidad de estas zonas de contaminación fúngica antes de buscar dicha o dichas moléculas objetivo, mencionadas anteriormente.

40 Dicha búsqueda de zonas de contaminación fúngica puede hacerse, por ejemplo, a simple vista, por análisis en microscopio o por ensayos microbiológicos o bioquímicos.

La extracción de la muestra de aire se realiza, por ejemplo, por muestreo difusivo sobre un adsorbente sólido del tipo carbógrafo 4. La detección se realiza, por ejemplo, por cromatografía en fase gaseosa seguido por espectrometría de masas (GC/EM). Pueden utilizarse otros métodos de detección.

45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de determinación de riesgo de contaminación por *Aspergillus* en un ambiente interior que comprende las etapas de:
- (a) extracción de una muestra de aire en el ambiente interior, después
- 5 (b) detección de Compuestos Orgánicos Volátiles microbianos (COVm) en la muestra, caracterizado por que la etapa (b) comprende la búsqueda de una huella química comprendiendo al menos una molécula objetivo que es un COVm, asociado al metabolismo por *aspergillus*, seleccionándose dicha molécula objetivo entre los COVm siguientes: 1,4-pentadieno, 4-heptanona, disulfuro de dimetilo, metoxibenceno, 1,3-butanodiol, 1,4-hexadieno, 1-metoxi-2-metilbenceno, 1-octen-3-ona, 1-penteno, 2(5H)-furanona, 2-metilisoborneol, 3,3-dicloro-1-propeno, 3-butin-1-ol, 3-heptanol, 3-heptanona, 3-metil-2-butanol, 3-metilhexano, 4-heptanol, 4-metil-2-hexanona, cariofileno, trisulfuro de dimetilo, eremofileno, germacreno D, isoledeno, longifoleno, 2-etilhexanoato de metilo, muurolano, terpinoleno.
- 10
2. Procedimiento de determinación de riesgo de contaminación por *aspergillus* en un ambiente interior según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa (b) comprende las siguientes subetapas antes de la búsqueda de una huella química que comprende al menos una molécula objetivo que es un COVm, asociado al metabolismo por *aspergillus*:
- 15 - detección de la presencia o ausencia de ciertos Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) predeterminados resultantes del metabolismo fúngico, comprendiendo estos COV predeterminados al menos un COV de cada una de las tres categorías de COV siguientes:
- (1) los COV que son emitidos independientemente de la especie fúngica y su sustrato y que sólo son emitidos por especies fúngicas;
- (2) los COV que son emitidos independientemente de la especie fúngica y el sustrato y que son emitidos por especies biológicas no fúngicas;
- (3) los COV que son emitidos en función de la especie fúngica y/o su soporte;
- 20 - cálculo de un índice químico de contaminación fúngica en función, respectivamente, de la presencia y ausencia de COV predefinidos resultantes del metabolismo fúngico.
- 25
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la huella química es específica de al menos una especie de *aspergillus* elegida entre: *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger*.
- 30
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la huella química comprende al menos dos de dichas moléculas objetivo.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la huella química comprende todas esas moléculas objetivo mencionadas.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicha molécula objetivo es específica de una o dos cepas de *Aspergillus*.
- 35
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que dicha molécula objetivo se selecciona del grupo que comprende: 1,3-butanodiol, 1,4-hexadieno, 1-metoxi-2-metilbenceno, 1-octen-3-ona, 1-penteno, 2(5H)-furanona, 2-metilisoborneol, 3,3-dicloro-1-propeno, 3-butin-1-ol, 3-heptanol, 3-heptanona, 3-metil-2-butanol, 3-metilhexano, 4-heptanol, 4-metil-2-hexanona, cariofileno, trisulfuro de dimetilo, eremofileno, germacreno D, isoledeno, longifoleno, 2-etilhexanoato de metilo, muurolano, terpinoleno.
- 40
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicha molécula objetivo es específica de más de dos cepas de *Aspergillus* y se selecciona preferiblemente del grupo que comprende: 1,4-pentadieno, 4-heptanona, disulfuro de dimetilo, metoxibenceno.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una etapa de búsqueda de zonas de contaminación fúngica realizada antes de la etapa (a).
- 45