



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0819517-0 B1



(22) Data do Depósito: 18/12/2008

(45) Data de Concessão: 20/03/2018

(54) Título: MÉTODO PARA DETECTAR UM MICRO-ORGANISMO PRODUTOR DE GÁS

(51) Int.Cl.: C12Q 1/04

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2007 US 61/016,265

(73) Titular(es): 3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY

(72) Inventor(es): STEPHEN B. ROSCOE; CYNTHIA D. ZOOK; MANJIRI KSHIRSAGAR

“MÉTODO PARA DETECTAR UM MICRO-ORGANISMO PRODUTOR DE GÁS”

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS CORRELATOS

[001] Esta aplicação reivindica o benefício do pedido provisório US n° 61/016.265, depositado em 21 de dezembro de 2007.

ANTECEDENTES

[002] A presença de bactérias coliformes ou de outros indicadores é uma evidência importante da qualidade dos alimentos e da água. A quantidade permitida de bactérias coliformes encontradas em água potável ou em certos alimentos, como produtos lácteos, é regulamentada em muitos países e/ou municipalidades. Coliformes incluem bactérias oriundas da natureza, como as encontradas no solo. As bactérias coliformes incluem também coliformes fecais, como a *Escherichia coli*. A presença de coliformes fecais em uma amostra é uma indicação primária de contaminação fecal recente da amostra de alimento ou de água, bem como da possível presença de organismos patogênicos.

[003] Métodos para a enumeração de micróbios em amostras de água podem ser encontrados, por exemplo, no compêndio "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (SMEWW), 21^a Edição, que é uma publicação conjunta da American Public Health Association, da American Water Works Association, e da Water Environment Federation. O compêndio SMEWW descreve uma técnica de filtração por membrana para se obter uma contagem direta de micro-organismos em água. A técnica de filtração por membrana é útil no monitoramento da qualidade microbiológica de amostras provenientes de processos destinados a produzir água potável, bem como amostras provenientes de várias fontes de água natural, não-processada.

[004] Os métodos para enumeração de micróbios presentes em amostras de alimentos frequentemente variam de acordo com a natureza do alimento e com os tipos de organismos que tendem a ser encontrados nas amostras. Vários compêndios de métodos para teste de amostras de alimento incluem "Standard Methods for the Examination of Dairy Products", 27^a Edição, publicado por The American Public Health Association, de Washington, DC, EUA e "Bacteriological Analytical Manual" ("BAM"), publicado por US Food and Drug Administration, de Washington, DC, EUA. Alimentos sólidos são usualmente suspensos em meios aquosos e são misturados e/ou pulverizados para obter-se um homogenato líquido do alimento, que pode ser usado em métodos de análise microbiana quantitativa.

[005] Cada um dos métodos anteriormente mencionados exige tipicamente exigir um técnico altamente treinado para observar e interpretar os resultados do teste. Existe a necessidade de um método simples e acurado para determinar número de micro-organismos de uma amostra líquida.

SUMÁRIO

[006] Em uma modalidade, a presente invenção inclui um método para detectar a presença de um micro-organismo alvo em uma amostra. O método pode incluir o fornecimento de uma amostra com suspeita de conter os micro-organismos alvo, de um filtro de superfície e de um dispositivo de cultura compreendendo um meio de cultura. O método pode incluir, ainda, coletar os micro-organismos alvo no filtro, colocar o filtro de superfície em contato com o meio de cultura, incubar o dispositivo de cultura por um período de tempo e detectar a presença do micro-organismo alvo. O micro-organismo alvo pode ser opcionalmente detectado por um sistema automatizado de detecção.

[007] Em outra modalidade, a presente invenção inclui um método para detectar a presença de um micro-organismo alvo em uma amostra líquida.

O método pode incluir o fornecimento de uma amostra líquida suspeita de conter um micro-organismo alvo, de um dispositivo de cultura que compreende um meio de cultura, e de um filtro que é substancialmente transparente quando em contato com o meio de cultura hidratado no dispositivo de cultura. O método pode incluir, ainda, coletar os micro-organismos alvo no filtro, colocar o filtro em contato com o meio de cultura, incubar o dispositivo de cultura por um período de tempo e detectar a presença do micro-organismo alvo. O micro-organismo alvo pode ser opcionalmente detectado por um sistema automatizado de detecção.

[008] Em outra modalidade, a presente invenção inclui um método para detectar um micro-organismo produtor de gás. O método pode incluir o fornecimento de uma amostra suspeita de conter um micro-organismo produtor de gás, de um filtro de superfície e de um dispositivo de cultura de filme plano contendo um meio de cultura que compreende um nutriente fermentável. O método pode incluir, ainda, coletar um micro-organismo produtor de gás a partir de uma amostra no filtro de superfície, colocar o filtro de superfície em contato com o meio de cultura, incubar o filtro de superfície em contato com o meio de cultura por um período de tempo, e detectar a presença de um micro-organismo produtor de gás. O micro-organismo alvo pode ser opcionalmente detectado por um sistema automatizado de detecção.

[009] Em outra modalidade, a presente invenção inclui um método para detectar um micro-organismo produtor de gás. O método pode incluir o fornecimento de uma amostra suspeita de conter um micro-organismo produtor de gás, de um dispositivo de cultura compreendendo um meio de cultura que contém um nutriente fermentável, de um filtro que é substancialmente transparente quando em contato com um meio de cultura hidratado no dispositivo de cultura, e de um sistema automatizado de detecção. O método pode incluir, ainda, coletar

um micro-organismo produtor de gás a partir de uma amostra no filtro, colocar o filtro em contato com o meio de cultura, incubar o filtro de superfície em contato com o meio de cultura por um período de tempo, e detectar a presença de um micro-organismo produtor de gás. O micro-organismo alvo pode ser opcionalmente detectado por um sistema automatizado de detecção.

[0010] O termo "dispositivo de cultura" refere-se a um dispositivo que é usado para propagar micro-organismos sob condições que irão permitir que pelo menos uma divisão celular ocorra. Dispositivos de cultura incluem um compartimento (por exemplo, uma placa de petri com uma tampa) para minimizar a possibilidade de contaminação accidental e uma fonte de nutrientes para suportar o crescimento dos micro-organismos.

[0011] O termo "filtro" refere-se a uma membrana filtrante relativamente plana, que compreende superfícies principais superior e inferior. Membranas filtrantes compreendem superfícies principais superior e inferior e poros, trajetórias de fluxo, ou passagens, através das quais fluidos e particulados podem passar da superfície superior até a superfície inferior do filtro. Para uso na presente invenção, o termo "superfície principal superior" refere-se a superfície principal do filtro através da qual a amostra fluída (por exemplo, um líquido ou um gás com particulados em suspensão) entra no filtro. O termo "superfície principal inferior" refere-se à superfície principal do filtro através da qual o filtrado sai do filtro.

[0012] Para uso na presente invenção, o termo "filtro de superfície" ou "filtro do tipo de superfície" refere-se a um tipo de filtro em que a área em seção transversal na abertura de uma passagem individual na superfície do filtro é geralmente do mesmo tamanho que a área em seção transversal desta passagem em qualquer outro ponto dentro do filtro. Um filtro de superfície impede a entrada ou passagem de partículas maiores que a

abertura das passagens individuais através do filtro, portanto as partículas tipicamente permanecem sobre a superfície do filtro.

[0013] As palavras "preferencial" e "de preferência" referem-se às modalidades da invenção que podem proporcionar certos benefícios, sob certas circunstâncias. Entretanto, outras modalidades podem, também, ser preferenciais sob as mesmas ou outras circunstâncias. Além disso, a recitação de uma ou mais modalidades preferenciais não implica no desuso de outras modalidades e não têm a intenção de excluir outras modalidades do escopo da invenção.

[0014] Os termos "compreende" e as variações do mesmo não têm um significado limitador, sendo que esses termos aparecem na descrição e nas reivindicações

[0015] Para uso na presente invenção, "um", "uma", "o", "a", "ao menos um", "ao menos uma", "um ou mais" e "uma ou mais" são usados de forma intercambiável. Portanto, por exemplo, uma amostra líquida suspeita de conter "um" micro-organismo alvo pode significar que a amostra líquida pode incluir "um ou mais" micro-organismos alvo.

[0016] O termo "e/ou" significa um ou todos os elementos mencionados ou uma combinação de quaisquer dois ou mais dos elementos listados.

[0017] Para uso na presente invenção, as recitações de faixas numéricas de números inteiros incluem todos os números inclusos dentro desta faixa (por exemplo, 1 a 5 inclui 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

[0018] O sumário da presente invenção, apresentado acima, não se destina a descrever cada uma das modalidades apresentadas ou todas as implementações da presente invenção. A descrição a seguir exemplifica mais particularmente as modalidades ilustrativas. Em diversos lugares, durante a aplicação, a orientação é fornecida através de listas de exemplos, nas quais

os exemplos podem ser usados de várias maneiras. Em cada instância, a lista recitada serve apenas com um grupo representativo e não deve ser interpretada como uma lista exclusiva.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0019] A invenção será explicada com mais detalhes com referência às figuras listadas abaixo, nas quais estruturas similares são indicadas por números similares em todas as várias vistas.

[0020] A figura 1 é uma vista em perspectiva de um dispositivo de cultura de filme plano aberto, que compreende um espaçador com uma abertura com uma membrana filtrante inserida na mesma, de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[0021] A figura 2 é uma vista em perspectiva de um dispositivo de cultura de filme plano aberto com uma membrana filtrante inserida no mesmo, de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[0022] A figura 3 é uma vista em perspectiva de uma placa de petri contendo um meio de cultura semi-sólido com uma membrana filtrante disposta sobre o mesmo, de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[0023] A figura 4 é uma vista em perspectiva de uma placa de petri contendo um suporte poroso com uma membrana filtrante disposta sobre o mesmo, de acordo com uma modalidade da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0024] A presente invenção refere-se a métodos para a detecção e/ou enumeração de micro-organismos em uma amostra líquida. A invenção refere-se adicionalmente ao uso de membranas filtrantes, em conjunto com dispositivos de cultura, para detectar e/ou enumerar micro-organismos em uma amostra líquida. Dispositivos de cultura, como as placas 3M PETRIFILM (3M Company, de St. Paul, MN, EUA) são dispositivos de amostra prontos

para o uso que podem ser usados para a propagação e detecção de micro-organismos. Adicionalmente, as placas PETRIFILM contém indicadores que facilitam a detecção e enumeração de certos micro-organismos alvo.

[0025] A figura 1 mostra um dispositivo de cultura de filme plano 10 que pode ser usado de acordo com a presente invenção. O dispositivo de cultura 10 inclui um elemento estrutural 11 que compreende um substrato auto-suportante 12 que tem superfícies superior e inferior 14 e 16, respectivamente. O substrato 12 é revestido em sua superfície superior 14 com uma camada de composição adesiva 18. Um meio seco reconstituível com água fria 20 contendo pelo menos um ingrediente selecionado do grupo consistindo em um ou mais agentes gelificantes e um ou mais nutrientes é colado em uma camada delgada relativamente uniforme à composição adesiva 18. O espaçador 23 cobre parcialmente o substrato 12 e a superfície do meio seco 20, e contém uma abertura 24, que expõe uma porção do meio seco 20. Uma folha de cobertura 22 recobre o espaçador 23 e a abertura 24. Se a folha de cobertura 22 é levantada para expor o meio seco 20, uma membrana filtrante 26 através da qual uma amostra líquida foi passada pode ser colocada no meio seco exposto 20 na abertura 24. A membrana filtrante 26 pode ser colocada sobre o meio seco 20 em qualquer orientação (isto é, com a superfície principal superior da membrana filtrante 26 voltada para o meio seco 20 ou com a superfície principal superior da membrana filtrante 26 voltada para a folha de cobertura 22). Após a colocação da membrana filtrante 26 no meio seco 20, um volume adequado de solvente aquoso (por exemplo, água estéril) pode ser depositado na abertura 24 e a folha de cobertura 22 pode ser colocada sobre a membrana filtrante 26 e/ou sobre o espaçador 23. A folha de cobertura 22 pode compreender, ainda, uma camada adesiva e uma camada de meio seco, conforme mostrado na figura 2 da patente U.S. n° 5.089.413. Uma vez hidratada com um solvente aquoso (não mostrado) que pode compreender solutos, a camada de meio seco reconstituível com água

fria 20 rapidamente forma um meio reconstituído (não mostrado), que, por sua vez, é capaz de cultivar micro-organismos presentes sobre a superfície de uma membrana filtrante 26. Em uma modalidade alternativa, o meio seco 20 pode ser hidratado com o solvente aquoso, formando um meio reconstituído, antes da inserção da membrana filtrante 26 no dispositivo de cultura.

[0026] A figura 2 mostra um dispositivo de cultura de filme plano 110 que pode ser usado de acordo com a presente invenção. O dispositivo de cultura 110 inclui um elemento estrutural 111 que compreende um substrato auto-suportante 112 que tem superfícies superior e inferior 114 e 116, respectivamente. O substrato 112 é revestido em sua superfície superior 114 com uma camada de composição adesiva 118. Um pó seco reconstituível com água fria 121, contendo pelo menos um ingrediente selecionado do grupo consistindo em um ou mais agentes gelificantes e um ou mais nutrientes, é colado em uma camada delgada relativamente uniforme à composição adesiva 118. Uma folha de cobertura 122 sobre o pó seco 121. Se a folha de cobertura 122 é levantada, uma membrana filtrante 126 através da qual uma amostra líquida foi passada pode ser colocada sobre o pó seco 121. A membrana filtrante 126 pode ser colocada sobre o pó seco 121 em qualquer orientação (isto é, com a superfície principal superior da membrana filtrante 126 voltada para o pó seco 121 ou com a superfície principal superior da membrana filtrante 126 voltada para a folha de cobertura 122). Após a colocação da membrana filtrante 126 sobre o pó seco 121, um volume adequado de solvente aquoso (por exemplo, água estéril) pode ser depositado na membrana filtrante 126 e a folha de cobertura 122 pode ser colocada sobre a membrana filtrante 126. Uma vez hidratada com um solvente aquoso (não mostrado), a camada de pó seco reconstituível com água fria 121 rapidamente forma um meio reconstituído (não mostrado), que, por sua vez, é capaz de cultivar micro-organismos presentes sobre a superfície de uma membrana filtrante 126. Em uma modalidade

alternativa, o pó seco 121 pode ser hidratado com o solvente aquoso, formando um meio reconstituído, antes da inserção da membrana filtrante 126 no dispositivo de cultura.

[0027] A figura 3 mostra um dispositivo de cultura alternativo 210 que pode ser usado de acordo com a presente invenção. O dispositivo de cultura 210 compreende um vaso 260 que contém um meio de cultura semi-sólido 230. Existem inúmeros vasos adequados 260 que são conhecidos na técnica. Vasos adequados 260 incluem placas de petri, frascos, garrafas, tubos, bêqueres, e similares. De preferência, o vaso é estéril ou pode ser esterilizado para evitar a contaminação da amostra ou do meio de cultura 230. O vaso 260 pode ser coberto (não mostrado) com uma tampa, uma capa, ou similares, para evitar contaminação e/ou para evitar desse cação da amostra ou do meio de cultura 230. Uma membrana filtrante 226 através da qual uma amostra líquida foi passada pode ser colocada no meio de cultura 230. A membrana filtrante 226 pode ser colocada sobre o meio de cultura 230 em qualquer orientação (isto é, com a superfície principal superior da membrana filtrante 226 voltada para o meio de cultura 230 ou com a superfície principal inferior da membrana filtrante 226 voltada para o meio de cultura 230). A figura 3 mostra colônias microbianas 250 que podem ser observadas na membrana filtrante 226 após incubação sob condições adequadas.

[0028] A figura 4 mostra um dispositivo de cultura 310 que pode ser usado de acordo com a presente invenção. O dispositivo de cultura 310 compreende um vaso 360 e um suporte filtrante 340. Existem inúmeros vasos adequados 360 que são conhecidos na técnica. Vasos adequados 360 incluem placas de petri, frascos, garrafas, tubos, bêqueres e similares. De preferência, o vaso é estéril ou pode ser esterilizado para evitar a contaminação da amostra ou do suporte poroso 340. De preferência, o vaso 360 pode ser coberto (não mostrado) com uma tampa, uma capa, ou similares, para evitar contaminação

e/ou para evitar dessecação da amostra ou do suporte poroso 340. O suporte poroso 340 pode ser produzido a partir de materiais capazes de suportar uma membrana filtrante 326 de tal modo que, quando o suporte poroso 340 é saturado com um solvente aquoso, o suporte poroso 340 fornece contato entre pelo menos uma parte da superfície inferior da membrana filtrante 326 e o solvente aquoso. Em algumas modalidades, o suporte poroso 340 fornece contato entre toda a superfície inferior da membrana filtrante 326 e o solvente aquoso. O solvente aquoso pode compreender uma solução que contém um nutriente para suportar o crescimento de um micro-organismo alvo e/ou pode compreender uma solução que contém um reagente para detectar um micro-organismo alvo. Alternativamente, o suporte poroso pode compreender um pó que contém um nutriente para suportar o crescimento de um micro-organismo alvo e/ou um pó contendo um reagente para detectar a presença de um micro-organismo alvo. Uma pessoa versada na técnica é familiarizada com nutrientes e reagentes adequados para o cultivo e/ou a detecção de micro-organismos alvo. Alguns exemplos não limitadores de materiais adequados para um suporte poroso 340 incluem materiais celulósicos, como papel de filtro, espumas, como espumas de poliuretano, hidrogéis, vidro sinterizado, e similares. Depois que a amostra líquida foi passada através da membrana filtrante 326, a membrana filtrante 326 pode ser colocada sobre o suporte poroso 340 em qualquer orientação. De preferência, a membrana filtrante 326 é colocada sobre o suporte poroso 340 com a superfície principal superior da membrana filtrante 326 voltada para o suporte poroso.

AMOSTRAS E MICRO-ORGANISMOS ALVO

[0029] As amostras usadas nos métodos da invenção podem ser amostras líquidas ou amostras sólidas, que estão suspensas em um meio líquido. De preferência, uma amostra sólida pode ser tratada fisicamente (por exemplo, homogeneizada) e/ou quimicamente (por exemplo, pela mistura com

um tensoativo) para suspender os micro-organismos alvo no meio líquido. As amostras líquidas podem conter sólidos em suspensão, desde que a concentração ou tamanho dos sólidos em suspensão não evite a filtração da amostra através de uma membrana filtrante superficial. As amostras líquidas ou com sólidos em suspensão podem ser diluídas em um solvente adequado (por exemplo, água estéril ou solução tampão) antes da filtração.

[0030] Amostras aquosas podem ser adequadas para uso nos métodos da invenção, desde que as amostras aquosas não degradem a membrana filtrante ou deixem um resíduo no filtro que pode interferir com a detecção dos micro-organismos alvo (por exemplo, inibir o crescimento do micro-organismo). Amostras não aquosas podem também ser usadas, desde que elas não impeçam que a membrana filtrante se torne transparente quando colocada em contato com o dispositivo de cultura, não degradem a membrana filtrante, ou não deixem um resíduo no filtro que possa interferir com a detecção dos micro-organismos alvo (por exemplo, o resíduo não interfere com o crescimento do micro-organismo ou interfere com uma atividade enzimática que pode ser usada para detectar o micro-organismo). Alguns exemplos não limitadores de amostras líquidas que podem ser adequadas para uso nos métodos da invenção incluem água de superfície, água para consumo humano ou de animais, água para preparações biofarmacêuticas, alimentos ou laticínios suspensos em um solvente aquoso, bebidas, suco de frutas, água de processos, água de resfriamento, água circulante, água de caldeira, água para alimentação de caldeira, água de lençóis freáticos, água recreativa, água tratada e água de despejo.

[0031] Os métodos da invenção são adequados para detectar ou identificar uma variedade de micro-organismos alvo. Os métodos da presente invenção são adequados para micro-organismos alvo que podem crescer e/ou se propagar em um dispositivo de cultura. O micro-organismo alvo pode ser uma bactéria, uma levedura, um fungo, ou um vírus. Os métodos da presente

invenção podem ser usados para detectar bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Micro-organismos alvo exemplificadores incluem espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Thiospirillum*, espécies da família *Enterobacteriaceae*, coliformes, coliformes fecais, espécies de *Streptococcus* fecais, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*; *Enterobacter amnigenus*, espécies *Cylospora* ou *Cryptosporidium*, rotavírus, e o vírus de hepatite A.

MEMBRANAS FILTRANTES E UNIDADES DE FILTRAGEM

[0032] Os micro-organismos alvo podem ser coletados em uma membrana filtrante através da transferência de uma amostra líquida ou sólida na superfície do filtro ou pela filtração de uma amostra líquida através da membrana filtrante. Após a coleta da amostra na membrana filtrante, o filtro pode ser transferido para um dispositivo de cultura. Membranas filtrantes podem ser filtros de membrana microporosa do tipo de superfície que não são inibitórios ao crescimento ou atividade metabólica dos micro-organismos alvo. As membranas filtrantes podem ser feitas de, por exemplo, cerâmica de óxido de alumínio, de policarbonato produzidas por track-etch, ou de poliéster produzidas por track-etch. As membranas filtrantes adequadas também incluem filtros que são substancialmente transparentes quando em contato com um meio de cultura hidratado, como um meio de cultura hidratado em um dispositivo de cultura. Para uso na presente invenção, uma membrana filtrante "substancialmente transparente" refere-se a uma membrana filtrante que não distorce ou impede significativamente a observação ou o imageamento de indícios de crescimento microbiano (por exemplo, uma colônia, um indicador de pH, uma bolha de gás, um produto ou intermediário de uma reação enzimática) em um dispositivo de cultura. Alguns exemplos não limitadores de membranas filtrantes adequadas incluem as membranas filtrantes de cerâmica vendidas pela Whatman Inc. (Florham Park, NJ, EUA) sob o nome comercial de

ANOPORE, que têm uma espessura de cerca de 60 µm, uma porosidade de cerca de 25 a 50% e um índice de refração de cerca de 1,6, e os filtros de policarbonato gravados vendidos pela Whatman Inc. sob o nome comercial de NUCLEOPORE, que têm uma espessura de cerca de 10 a 20 µm, uma porosidade de cerca de 15% e um índice de refração de cerca de 1,6.

[0033] Os tamanhos de poros da membrana filtrante são geralmente escolhidos de modo que os micro-organismos alvo não irão passar através dos poros, assegurando deste modo que substancialmente todos os micro-organismos alvo na amostra são coletados no filtro. Bactérias típicas têm cerca de 0,5 a 5,0 µm de comprimento. Certas bactérias menores, como os micoplasmas, têm aproximadamente 0,3 µm de diâmetro. Células de levedura são geralmente maiores que bactérias. Células de levedura típicas têm aproximadamente 3 a 4 µm de diâmetro, embora algumas tenham diâmetros tão grandes quanto cerca de 40 µm. Fungos podem existir como células únicas, esporos, ou hifas filamentosas. Embora tipicamente maiores que as bactérias, o tamanho médio das células dos fungos varia de espécie para espécie. Vírus são tipicamente menores que bactérias. Por exemplo, rotavírus têm cerca de 0,07 µm de diâmetro, vírus de hepatite A têm cerca de 0,027 µm de diâmetro, calicivírus (por exemplo, norovírus) tem cerca de 0,027-0,040 µm de diâmetro, picornavírus (por exemplo, poliovírus) têm cerca de 0,03 µm de diâmetro, e adenovírus entéricos têm cerca de 0,07 µm de diâmetro. Consequentemente, a seleção de uma membrana filtrante com um tamanho de poro adequado pode depender do micro-organismo alvo. Por exemplo, uma membrana filtrante com um tamanho de poro de 1,0 µm ou menos, 0,8 µm ou menos, 0,6 µm ou menos, 0,4 µm ou menos, 0,2 µm ou menos, 0,1 µm ou menos, 0,05 µm ou menos, 0,03 µm ou menos, 0,02 µm ou menos, ou 0,01 µm ou menos pode ser adequada para capturar e detectar bactérias alvo. Para a captura e detecção de leveduras ou fungos alvo, uma membrana filtrante com

um tamanho de poro de 12 µm ou menos, 8 µm ou menos, 5 µm ou menos, 3 µm ou menos, 2 µm ou menos, 1 µm ou menos, 0,8 µm ou menos, 0,6 µm ou menos, 0,4 µm ou menos, 0,2 µm ou menos, ou 0,1 µm ou menos pode ser adequada. Para a captura e detecção de vírus alvo, uma membrana filtrante com um tamanho de poro de 0,05 µm ou menos, 0,03 µm ou menos, 0,02 µm ou menos, ou 0,01 µm ou menos pode ser adequada.

[0034] Membranas filtrantes podem ser preparadas manualmente a partir de meios filtrantes adequados ou, alternativamente, podem ser compradas pré-cortadas em diversos tamanhos e formatos. O tamanho e o formato da membrana filtrante podem ser escolhidos com base no volume da amostra e na carga esperada de material particulado na amostra. Em geral, membranas filtrantes com áreas superficiais maiores irão permitir maiores taxas de filtração que membranas filtrantes com áreas superficiais menores. Membranas filtrantes circulares que têm um diâmetro de 13 mm, 25 mm, ou 47 mm estão facilmente disponíveis a partir de inúmeras fontes comerciais e são particularmente adequadas para uso com dispositivos de filtração correspondentes. Membranas filtrantes podem ser usadas em combinação com outros meios filtrantes (por exemplo, um pré-filtro, para aprisionar detritos maiores da amostra) ou outras membranas filtrantes. Por exemplo, membranas filtrantes podem ser empilhadas para diminuir o tamanho dos poros a fim de se separar micro-organismos maiores (por exemplo, leveduras e fungos) de micro-organismos menores (por exemplo, bactérias ou vírus), permitindo que as membranas filtrantes sejam analisadas separadamente para detectar micro-organismos diferentes.

[0035] A membrana filtrante pode ser usada em conjunto com uma unidade de filtração. A unidade de filtração pode ser usada para segurar a membrana filtrante enquanto a amostra líquida é passada através da membrana filtrante. Após a passagem da amostra líquida através da membrana filtrante, esta pode ser removida da unidade de filtração e

transferida para um dispositivo de cultura. Unidades de filtragem preferenciais incluem aquelas que são configuradas para fácil remoção da membrana filtrante e colocação da membrana filtrante em um dispositivo de cultura.

[0036] O dispositivo de filtração pode ser projetado para fixação a uma ou uso com uma seringa, como os suportes de filtro vendidos pela Millipore Corporation sob o nome comercial de SWINNEX. Alternativamente, para volumes maiores, o dispositivo de filtração pode ser projetado para fixação a um frasco. De preferência, a membrana filtrante e o dispositivo de filtração podem ser esterilizados antes da passagem da amostra através do filtro.

[0037] Sistemas exemplificadores em que membranas filtrantes e métodos apresentados da presente invenção podem ser incorporados incluem aqueles descritos no pedido de patente U.S. n° 60/941.145, depositado em 31 de maio de 2007, e intitulado "Devices and Processes for Collecting and Concentrating Samples for Microbiological Analysis", no pedido de patente U.S. n° 60/989.180, depositado em 20 de novembro de 2007, e intitulado "System and Method for Preparing and Analyzing Samples", no pedido de patente U.S. n° 60/989.175, depositado em 20 de novembro de 2007, e intitulado "System and Method for Preparing and Delivering Samples", no pedido de patente U.S. n° 60/989.170, depositado em 20 de novembro de 2007, e intitulado "System and Method for Preparing and Collecting Samples", e no pedido de patente U.S. n° 60/989.180, depositado em 20 de novembro de 2007, e intitulado "System and Method for Environmental Sampling".

DISPOSITIVOS DE CULTURA

[0038] Uma variedade de dispositivos de cultura pode ser usada nos métodos da invenção. Em algumas modalidades, os dispositivos de cultura podem detectar a presença de bactérias. Em modalidades alternativas, os dispositivos de cultura podem detectar a presença de

levedura e/ou fungo. Em certas modalidades, os dispositivos de cultura podem detectar a presença de vírus.

[0039] Em algumas modalidades que são usadas para detectar bactérias, levedura ou fungos, os dispositivos de cultura podem incluir uma matriz de hidrogel pré-formada (por exemplo, ágar, agarose, pectinato de cálcio) que comprehende nutrientes para suportar o crescimento de um micro-organismo alvo e, opcionalmente, pelo menos um indicador para facilitar a detecção do micro-organismo alvo. Em algumas modalidades, o hidrogel comprehende adicionalmente pelo menos um agente seletivo (como um sal, um tensoativo, ou um antibiótico) para fornecer um ambiente que favorece mais o crescimento ou detecção dos micro-organismos alvo do que de micro-organismos não alvo que podem estar presentes na amostra. A matriz de hidrogel pré-formada pode ser colocada em qualquer recipiente adequado, como uma placa de petri, bêquer ou frasco. De preferência, o hidrogel e o recipiente podem ser esterilizados antes da membrana filtrante ser colocada em contato com o hidrogel.

[0040] Em outras modalidades, os dispositivos de cultura podem incluir dispositivos de cultura secos e rehidratáveis que comprehendem nutrientes para suportar o crescimento de um micro-organismo alvo e, opcionalmente, pelo menos um indicador para facilitar a detecção do micro-organismo alvo. Alguns exemplos não limitadores de tais dispositivos são descritos nas patentes U.S. n° 4.476.226, 5.089.413, 5.232.838, 6.331.429, e 6.638.755. Dispositivos de cultura secos e rehidratáveis podem incluir agentes gelificantes. Agentes gelificantes adequados incluem agentes gelificantes naturais e sintéticos solúveis em água fria. Alguns exemplos não limitadores de tais agentes gelificantes incluem goma guar, goma de xantana, hidróxi etil celulose, carbóxi metil celulose, poliacrilamida, goma de alfarrobeira, ácido algínico, e combinações de dois ou mais dos itens supracitados. Tais dispositivos podem incluir, também, nutrientes para suportar o crescimento ou o metabolismo dos micro-organismos. Alguns exemplos não

limitadores de nutrientes que suportam o crescimento de uma variedade de micro-organismos incluem peptonas, extratos de levedura, glicose e similares. Nutrientes ou combinações de nutrientes específicos necessários para o cultivo e/ou identificação de certos organismos ou grupos de organismos são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, os dispositivos de cultura secos e rehidratáveis compreendem adicionalmente pelo menos um agente seletivo (como um sal, um tensoativo, ou um antibiótico) para fornecer um ambiente que favorece mais o crescimento ou detecção dos micro-organismos alvo do que de micro-organismos não alvo que podem estar presentes na amostra.

[0041] Em outras modalidades, dispositivos de cultura podem incluir um suporte poroso em comunicação fluida com uma mistura aquosa que compreende nutrientes para suportar o crescimento de um micro-organismo alvo e, opcionalmente, pelo menos um indicador para facilitar a detecção do micro-organismo alvo. Em algumas modalidades, a mistura aquosa compreende adicionalmente pelo menos um agente seletivo (como um sal, um tensoativo, ou um antibiótico) para fornecer um ambiente que favorece o crescimento ou detecção dos micro-organismos alvo sobre micro-organismos não alvo que podem estar presentes na amostra.

[0042] É preferível que o suporte poroso não contenha materiais que possam ser transportados através de um solvente aquoso e que evitem a detecção dos micro-organismos alvo. Suportes porosos podem ter qualquer uma de uma variedade de formas física como, por exemplo, um tecido, um não tecido, um gel, uma espuma, uma rede, uma talagarça, uma frita, um filme microreplicado, ou similares. Certos suportes porosos são construídos a partir de materiais hidrofílicos, como papel de filtro ou filtro de fibra de vidro. Alternativamente, o suporte pode ser construído a partir de um material hidrofóbico que foi tratado para se tornar um material hidrofílico ou o material

hidrofóbico pode ser capaz de transportar um solvente aquoso ou solução através de ação capilar, por exemplo.

[0043] O suporte poroso pode ser colocado em qualquer recipiente adequado, como uma placa de petri, bêquer ou frasco. De preferência, o suporte poroso e o recipiente podem ser esterilizados antes da membrana filtrante ser colocada em contato com o suporte poroso.

[0044] Em certas modalidades, o dispositivo de cultura inclui um compartimento com uma linhagem de células hospedeiras contidas no mesmo. Certos vírus podem ser detectados em um dispositivo de cultura pela observação do efeito citopático (CPE) que eles causam quando as partículas virais infectam linhagens de células cultivadas (cultura de tecidos). Técnicas de cultura de tecidos e seus dispositivos de cultura correspondentes são conhecidos na técnica. Nestas modalidades, uma membrana filtrante através da qual uma amostra líquida foi passada pode ser transferida para um dispositivo de cultura contendo uma linhagem de células. Alternativamente, os vírus podem ser lavados do filtro em um pequeno volume de água estéril, tampão, ou meio de cultura de tecidos, e a suspensão resultante pode ser adicionada ao dispositivo de cultura. Após um período adequado de incubação, a cultura de tecidos pode ser observada para indicações de efeito citopático (CPE) como, por exemplo, formação de placa. Placas podem ser observadas visualmente ou com a ajuda de microscópios e/ou sistemas de formação de imagens. A detecção visual das placas pode ser aprimorada através do uso de manchas, como cristal violeta, ou de imunoreagentes como, por exemplo, anticorpos identificados como fluorescentes.

SISTEMAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRA

[0045] Filtros de superfície, unidades de filtragem e dispositivos de cultura podem ser combinados com material para embalagem e vendidos como um sistema de preparação de amostra (kit) para detecção de micro-

organismos em uma amostra. Por exemplo, os sistemas de preparação de amostra podem compreender dois ou mais componentes (por exemplo, um filtro de superfície e um dispositivo de cultura) ou três ou mais componentes (por exemplo, um filtro de superfície, uma unidade de filtragem, e um dispositivo de cultura) embalados juntos. Em certas modalidades, a unidade de filtragem pode ser configurada para a remoção do filtro de superfície.

[0046] Os sistemas de preparação de amostra podem compreender, ainda, acessórios de amostragem e teste, como um meio para suspensão da amostra (por exemplo, água, um tampão, um meio de crescimento), um reagente (por exemplo, um corante, um indicador, uma enzima, um substrato enzimático, um agente lisina, um reagente para facilitar a eluição), uma pipeta, um rótulo, um fórceps, um veículo de amostra, e/ou uma luva. Em certas modalidades, os componentes individuais do sistema de preparação de amostra podem ser esterilizados. Em certas modalidades, os componentes do sistema de preparação de amostra podem estar embalados individualmente dentro de uma embalagem principal.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE DETECCÃO

[0047] Sistemas automatizados para contagem de colônias microbianas em dispositivos de cultura são conhecidos na técnica. Tais sistemas automatizados compreendem, em geral, um sistema de formação de imagens, um algoritmo de análise de imagens para determinar uma contagem de colônias, e um sistema de gerenciamento de dados para apresentar e, opcionalmente, armazenar e manipular os dados e as imagens de contagem de colônias. Um sistema exemplificador para contagem de colônias em placas de ágar está comercialmente disponível junto à Synbiosis (Cambridge, Reino Unido) sob o nome comercial PROTOCOL e na patente U.S. n° 6.002.789. Sistemas para a contagem de colônias em placas PETRIFILM são descritos nas patentes U.S. n° 5.403.722, 7.298.885, e 7.298.886.

[0048] Tipicamente, sistemas automatizados para contagem de colônias microbianas detectam a presença de micro-organismos alvo através da habilidade das colônias, ou metabólitos derivados das mesmas, de absorver, refletir, emitir ou espalhar luz. Deste modo, as colônias podem ser detectadas oticamente através de meios, por exemplo, colorimétricos, fluorimétricos ou luminométricos (por exemplo, quimioluminescência ou bioluminescência).

[0049] Em certos testes, como testes para bactérias coliformes, é desejável determinar se os micro-organismos produzem gás (isto é, dióxido de carbono) a partir de lactose (açúcar). Placas Petrifilm da 3M para contagem de coliformes e de *E. coli* incorporam lactose ao nutriente do meio de crescimento. Nestes testes, uma colônia de coliformes pode ser temporariamente identificada por uma mudança de cor de um indicador de pH no meio de crescimento. A alteração de pH indica que a colônia pode ter produzido produtos finais ácidos a partir de lactose e supõe-se que a colônia seja uma colônia de coliformes. Pode-se confirmar que a suposta colônia de coliformes é um micro-organismo coliforme observando-se a presença de uma ou mais bolhas de gás próximas à colônia. As bolhas de gás podem ser observadas oticamente, por meios visuais ou por um sistema automatizado, como o sistema automatizado para contagem de colônias descrito na patente U.S. n° 7.298.886. Os dispositivos de cultura de filme planos como as placas PETRIFILM para contagem de coliformes/*E. coli* que, quando hidratadas e fechadas compreendem um meio de crescimento semi-sólido em contato contínuo com um substrato auto-suportante em um lado do meio de crescimento e uma folha de cobertura do outro lado do meio de crescimento (vide figuras 1 e 2), são particularmente adequados para capturar as bolhas de gás produzidas por um micro-organismo coliforme fermentador de lactose.

TESTES DE IDENTIFICAÇÃO CONFIRMATÓRIA

[0050] Alguns dispositivos de cultura da presente descrição fornecem meios, como reagentes seletivos e/ou diferenciais, para identificar sem ambiguidade um micro-organismo presente no dispositivo de cultura. Outros dispositivos de cultura podem fornecer uma identificação provisória de um micro-organismo presente no dispositivo de cultura. Quando se faz uma identificação provisória, é ocasionalmente desejável confirmar a identidade do micro-organismo através de testes adicionais. Os métodos da presente descrição fornecem testes confirmatórios.

[0051] Depois que o dispositivo de cultura foi incubado e a presença de um organismo foi observada (visualmente ou por um sistema automatizado de detecção), os organismos alvo podem ser removidos do dispositivo de cultura para análise adicional ou, na instância de certos testes genéticos ou imunológicos, a análise pode ser realizada no dispositivo de cultura (isto é, *localmente*). Análise adicional pode incluir análise química (por exemplo, cromatografia, espectroscopia, espectometria), análise genética (por exemplo, hibridação, amplificação do ácido nucléico), e análise imunológica (por exemplo, ELISA, imunocromatografia, aglutinação, imunoensaio radial).

[0052] Os métodos analíticos podem ser realizados usando-se toda a amostra no dispositivo de cultura através de, por exemplo, remoção ou extração dos micro-organismos, ou componentes do mesmo, de toda a membrana filtrante e do meio de cultura. Alternativamente, regiões menores do dispositivo de cultura ou colônias individuais podem ser isoladas e/ou extraídas para se executar os métodos analíticos. Em algumas modalidades, uma membrana de nitro celulose ou de náilon pode ser usada para "levantar" os micro-organismos ou componentes do mesmo e, subsequentemente, realizar testes genéticos, bioquímicos, ou imunológicos. Métodos analíticos específicos podem ser encontrados em Molecular Cloning, A Laboratory

Manual, 3^ª edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press, de Cold Spring Harbor, NY, EUA), que é aqui incorporado, por referência, em sua totalidade.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

DETECCÃO VISUAL DE BACTÉRIAS COLIFORMES EM PLACAS PETRIFILM PARA CONTAGEM DE E. COLI E/OU COLIFORMES.

[0053] As placas Petrifilm para contagem de *E. coli* e/ou coliformes (EC) foram obtidas junto à 3M Company (de St. Paul, MN, EUA). Paul, MN, EUA). As membranas filtrantes de mistura de ésteres de celulose (MCE) (47 mm de diâmetro, 0,45 µm de tamanho de poro nominal) foram obtidas junto à Millipore Corporation (de Billerica, MA, EUA). As membranas filtrantes de cerâmica com uma matriz de alumina (47 mm de diâmetro, 0,2 µm de tamanho de poro nominal) foram obtidas junto à Whatman (de Florham Park, NJ, EUA). *Enterobacter amnigenus* ATCC 51818 foram obtidos junto à American Type Culture Collection (de Manassas, VA, EUA).

[0054] Uma cultura de bactérias foi mantida em caldo tripticase de soja de um dia para o outro a 35°C. A cultura que cresceu de um dia para o outro foi diluída em 1,5 litros de água de poço não tratada (por exemplo, água que não foi clorada, fluorada, ou amaciada) até uma concentração final de aproximadamente 0,5 a 1,0 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Um volume de 100 mililitros da cultura diluída foi filtrado através de uma membrana filtrante em um aparelho de filtração estéril (Microfil V, Millipore Corporation, de Billerica, MA, EUA). Usando-se uma tenaz estéril, a membrana foi removida assepticamente do aparelho de filtração e colocada no meio seco e circular de uma placa Petrifilm EC. Um mililitro do diluente estéril, fosfato de Butterfield, foi dispensado na membrana e a placa Petrifilm foi fechada; o diluente foi distribuído igualmente ao longo da placa de acordo com as instruções do fabricante. Esta etapa foi realizada com cuidado para

evitar a introdução de bolhas de ar na placa durante a inoculação. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 ± 2 horas. As placas foram contadas manualmente de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1

DETECÇÃO VISUAL DE ENTEROBACTER AMNIGENUS EM MEMBRANAS FILTRANTES EM PLACAS PETRIFILM

Tipo de filtro	Ésteres de celulose misturados	Cerâmica
Contagem de colônia	59	82
Aparência da colônia	Colônias pequenas (<1 mm de diâmetro), vermelho pálidas, de formato irregular e com margens difusas	Colônias pequenas (cerca de 1 mm de diâmetro), vermelho escuras, circulares, com margens bem definidas e bolhas de gás adjacentes.

EXEMPLO 2

DETECÇÃO AUTOMATIZADA DE BACTÉRIAS COLIFORMES EM PLACAS PETRIFILM PARA CONTAGEM DE *E. COLI*/COLIFORMES.

[0055] Uma cultura de Enterobacter amnigenus mantida de um dia para o outro, foi diluída e filtrada, conforme descrito no exemplo 1. Os filtros foram colocados nas placas Petrifilm EC e foram incubados conforme descrito no exemplo 1. As placas incubadas foram colocadas em um leitor de placa Petrifilm (3M Company, de St. Paul, MN, EUA) e o número de colônias de coliformes foi determinada pelo leitor de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são mostrados na tabela 2.

TABELA 2

DETECÇÃO AUTOMATIZADA DE COLÔNIAS DE ENTEROBACTER AMNIGENUS EM MEMBRANAS FILTRANTES EM PLACAS PETRIFILM

Tipo de filtro	Ésteres de celulose misturados	Cerâmica
Contagem de colônia		
Contagem de coliformes	1	4
Contagem total	1	51

[0056] O leitor de placa detectou apenas uma colônia na membrana filtrante de MCE. Esta colônia foi associada a uma bolha de gás e, portanto, foi contada como um coliforme. A inspeção visual da placa mostrou que havia pelo menos várias dúzias de colônias pequenas, difusas, e avermelhadas que não foram detectadas pelo leitor de placa. Em contraste, o leitor de placa detectou cinquenta e uma colônias na membrana filtrante de cerâmica. Destas colônias, o leitor detectou quatro que foram associadas a uma bolha de gás.

[0057] A presente invenção foi descrita, até aqui, com referência a várias realizações específicas previstas pelo inventor para as quais descrições capacitadoras estão disponíveis. Modificações insubstanciais da invenção, incluindo modificações que não foram previstas presentemente, podem, não obstante, constituir equivalentes da mesma. Dessa forma, o escopo da presente invenção não deveria ser limitado pelos detalhes e estruturas aqui descritos, mas, em vez disso, apenas pelas reivindicações a seguir, e equivalentes das mesmas.

EXEMPLO 3

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO AUTOMATIZADA DE UMA SUSPENSÃO MISTURADA DE BACTÉRIAS USANDO-SE PLACAS PETRIFILM PARA CONTAGEM DE *E. COLI*/COLIFORMES.

[0058] As culturas bacterianas foram preparadas conforme descrito no exemplo 1. As bactérias usadas neste exemplo foram a *Hafnia alvei* ATCC

[0059] 51815 (uma espécie de bactéria coliforme) e a *Escherichia coli* ATCC 11229, ambas obtidas junto à American Type Culture Collection. As culturas foram diluídas conforme descrito no exemplo 1 e misturadas para se obter uma suspensão de aproximadamente 50 a 100 CFU de cada organismo por 100 mililitros de água. A suspensão de 100 mL foi filtrada e colocada em uma placa Petrifilm para contagem de *E.*

coli/coliformes, conforme descrito no exemplo 1. As placas foram incubadas durante 24 horas a 35°C. As placas incubadas foram passadas através de um leitor de placa Petrifilm e as imagens foram analisadas para a presença e o tipo de colônias em cada placa. Os dados são apresentados na tabela 3. As colônias de coliformes e E. coli foram detectadas no experimento pelo sistema não modificado de software e scanner para leitura de placas, usando-se uma membrana filtrante de cerâmica. Algumas colônias azuis que estavam crescendo na membrana filtrante de MCE não foram reconhecidas e contadas pelo leitor automatizado.

TABELA 3

CONTAGENS DE COLÔNIAS NO LEITOR DE PLACA PARA CULTURAS MISTAS QUE CRESCERAM EM PLACAS PETRIFILM PARA CONTAGEM DE E. COLI/COLIFORMES. NESTE TESTE, UMA COLÔNIA TÍPICA DE HAFNIA ALVEI DEVE APARECER COMO UMA COLÔNIA VERMELHA COM UMA BOLHA DE GÁS E UMA COLÔNIA TÍPICA DE ESCHERICHIA COLI DEVE APARECER COMO UMA COLÔNIA AZUL COM UMA BOLHA DE GÁS. A ÚLTIMA COLUNA MOSTRA O NÚMERO DE COLÔNIAS QUE ERAM CLARAMENTE VISÍVEIS NA PLACA E NA IMAGEM DA PLACA, MAS QUE NÃO FORAM RECONHECIDOS E CONTADOS PELO

SOFTWARE PARA ANÁLISE DE IMAGENS DO LEITOR AUTOMATIZADO

Tipo de membrana	Unidades formadoras de colônia				
	azul com gás	azul sem gás	vermelha com gás	vermelha sem gás	Não contada pelo leitor
MCE	0	67	0	0	9
Cerâmica	7	20	14	17	0

[0060] A presente invenção foi descrita, até aqui, com referência a várias

[0061] realizações específicas previstas pelo inventor para as quais descrições capacitadoras estão disponíveis. Modificações insubstanciais da invenção, incluindo modificações que não foram previstas

presentemente, podem, não obstante, constituir equivalentes da mesma. Dessa forma, o escopo da presente invenção não deveria ser limitado pelos detalhes e estruturas aqui descritos, mas, em vez disso, apenas pelas reivindicações a seguir, e equivalentes das mesmas.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA DETECTAR UM MICRO-ORGANISMO PRODUTOR DE GÁS, caracterizado por compreender as etapas de:

fornecer uma amostra suspeita de conter um micro-organismo produtor de gás, um filtro de superfície (26, 126, 226, 326) e um dispositivo de cultura de filme plano (10, 110, 210, 310) contendo um meio de cultura (20, 121, 230) que compreende um nutriente fermentável;

coletar o micro-organismo produtor de gás da amostra do filtro de superfície (26, 126, 226, 326);

colocar o filtro de superfície (26, 126, 226, 326) em contato com o meio de cultura (20, 212, 230);

incubar o filtro de superfície (26, 126, 226, 326) em contato com o meio de cultura (20, 121, 230); e

detectar a presença do micro-organismo produtor de gás;

em que a detecção da presença do micro-organismo produtor de gás compreende a detecção óptica de uma colônia e observação da presença de uma ou mais bolhas de gás nas proximidades da colônia.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda a etapa de fornecer um sistema de detecção automatizado, em que a detecção da presença do micro-organismo produtor de gás compreende detectar o micro-organismo produtor de gás com um sistema de detecção colorimétrico, fluorimétrico ou luminométrico automatizado.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pela bolha de gás ser detectada opticamente.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo filtro de superfície compreender um tamanho de poro de 0,01 µm a 12 µm.

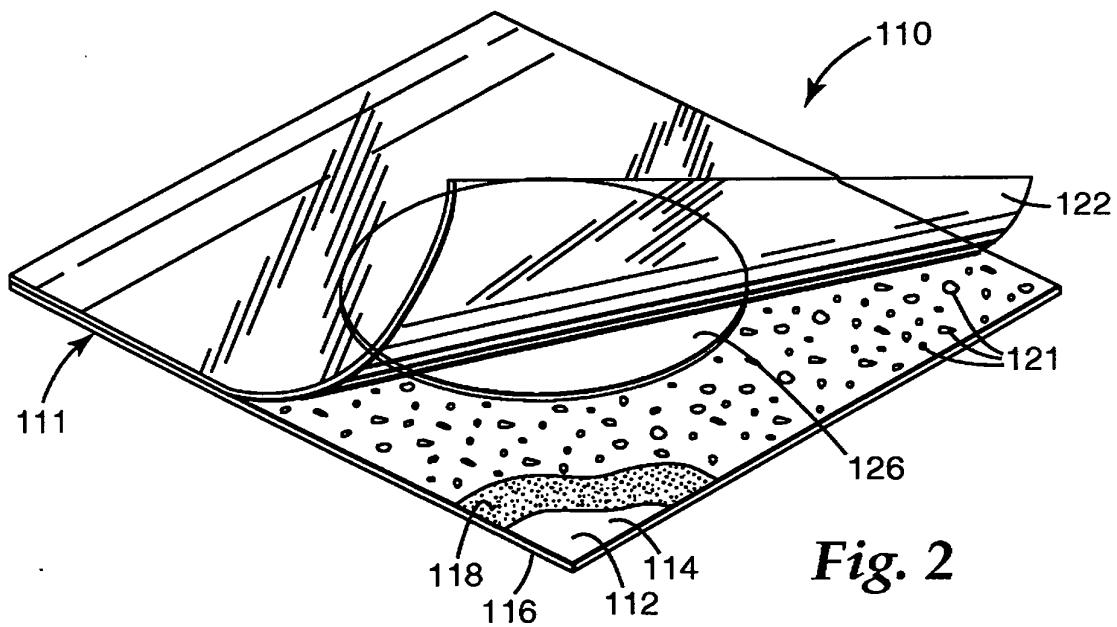
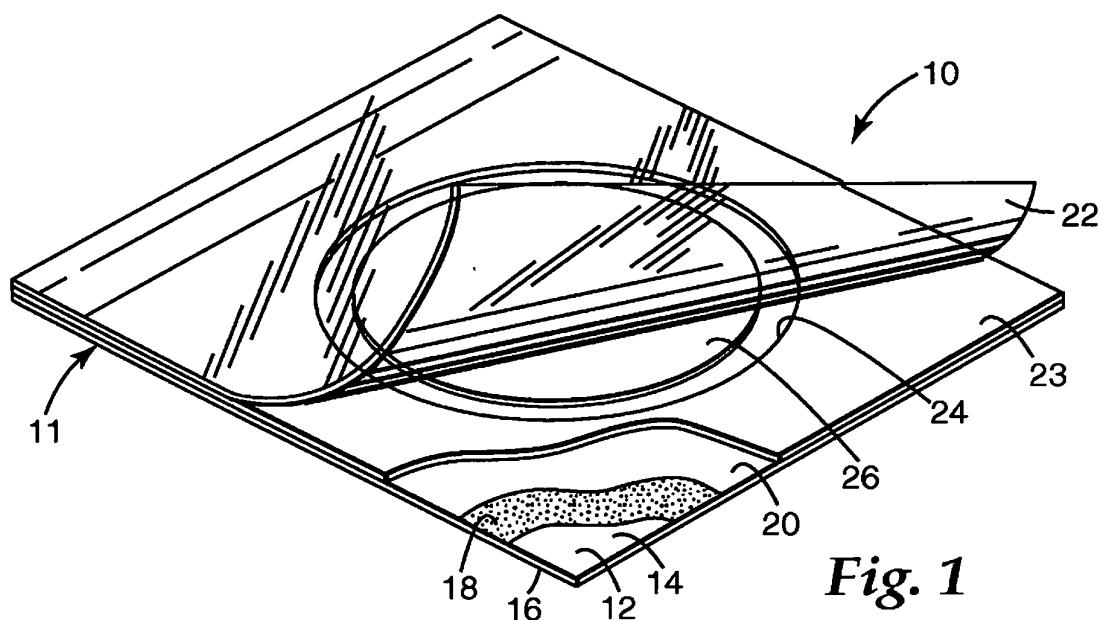
5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dispositivo de cultura ser hidratado com um solvente aquoso antes de se colocar uma superfície principal do filtro com os micro-organismos coletados em contato com o meio seco reconstituível.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela amostra ser selecionada a partir do grupo que consiste em água de superfície, água para consumo humano ou animal, água para preparações biofarmacêuticas, bebidas, alimento ou laticínios suspensos em um solvente aquoso, suco de frutas, água de processo, água de resfriamento, água circulante, água de caldeira, água para alimentação de caldeira, água de lençóis freáticos, água recreativa, água tratada e água de despejo.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo micro-organismo alvo ser uma bactéria, uma levedura ou um fungo.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo micro-organismo produtor de gás ser selecionado a partir do grupo que consiste em uma espécie de *Enterococcus*, uma espécie de *Thiospirillum*, uma espécie de *Enterobacteriaceae*, um coliforme, um *Streptococcus* fecal, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter amnigenus*, uma espécie de *Cryptosporidium* e uma espécie de *Cyclospora*.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo filtro compreender óxido de alumínio cerâmico, policarbonato ou poliéster.



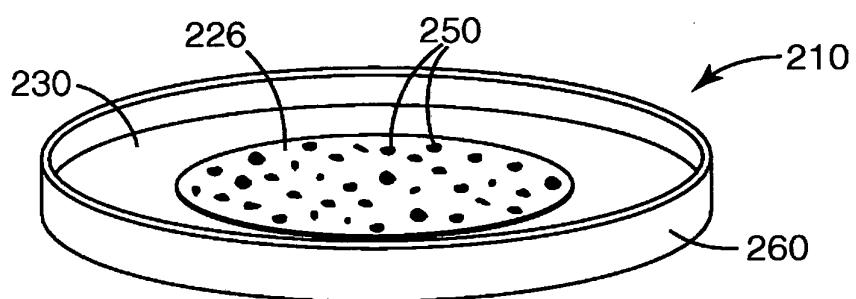


Fig. 3

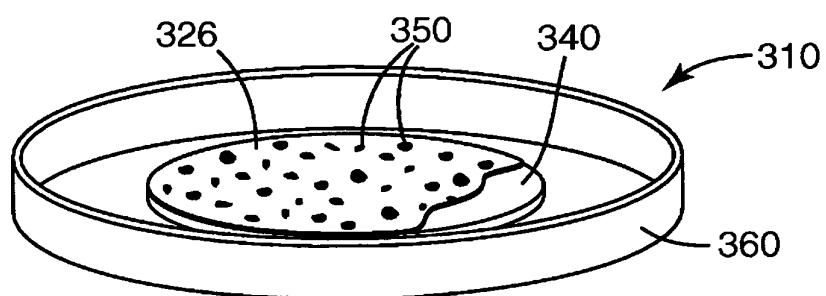


Fig. 4