



INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0817415-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0817415-6

(22) Data do Depósito: 02/10/2008

(43) Data da Publicação do Pedido: 09/07/2009

(51) Classificação Internacional: C12N 1/02; C12N 11/14; C12Q 1/24; G01N 1/40; G01N 33/543.

(30) Prioridade Unionista: US 60/977,180 de 03/10/2007.

(54) Título: PROCESSO E KIT PARA CAPTURAR OU CONCENTRAR MICROORGANISMOS

(73) Titular: 3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY, Sociedade Norte-Americana. Endereço: 3M Center, Post Office Box 33427, Saint Paul, Minnesota 5513-3427, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: MANJIRI T. KSHIRSAGAR; TUSHAR A. KSHIRSAGAR; THOMAS E. WOOD.

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 04/12/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 04/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“PROCESSO E KIT PARA CAPTURAR OU CONCENTRAR MICROORGANISMOS”

Declaração de Prioridade

[001]Este pedido reivindica a prioridade do pedido provisório US nº 60/977.180 depositado em 3 de outubro de 2007, cujo conteúdo está aqui incorporado para referência.

Campo da Invenção

[002]A presente invenção refere-se a processos para capturar ou concentrar microorganismos de modo que permaneçam viáveis para detecção ou teste. Em outros aspectos, esta invenção refere-se, também, a kits de diagnóstico para uso na execução de tais processos de concentração.

Antecedentes

[003]Doenças causadas por alimentos e infecções adquiridas em hospitais resultantes da contaminação por microorganismos são uma preocupação em vários locais ao redor do mundo. Assim, é frequentemente desejável ou necessário realizar testes para se detectar a presença de bactérias ou outros microorganismos em várias amostras, sejam clínicas, ambientais ou outras, para se determinar a identidade e/ou a quantidade dos microorganismos presentes.

[004]DNA bacteriano ou RNA bacteriano, por exemplo, pode ser analisado para se avaliar a presença ou ausência de uma espécie particular de bactérias mesmo na presença de outras espécies de bactérias. A capacidade de detectar a presença de uma bactéria específica, entretanto, depende, pelo menos em parte, da concentração da bactéria na amostra sendo analisada. As amostras de bactérias podem ser colocadas em placas ou submetidas a um processo de cultura para aumentar a quantidade de bactérias na amostra para garantir um nível adequado de detecção, mas a etapa de cultura frequentemente exige um tempo substancial e, portanto, pode atrasar significativamente os resultados da avaliação.

[005]A concentração das bactérias na amostra pode reduzir o tempo de cultura ou mesmo eliminar a necessidade de tal etapa. Assim, foram desenvolvidos métodos para isolar (e por meio disso concentrar) determinadas cepas bacterianas utilizando-se anticorpos específicos para a cepa (por exemplo, sob a forma de partículas magnéticas ou não-magnéticas revestidas com anticorpos). Tais métodos, entretanto, tendem a ser caros e ainda um pouco mais lentos que o desejado para pelo menos algumas aplicações de diagnóstico.

[006]Também têm sido utilizados métodos de concentração que não são específicos para cepas (por exemplo, para se obter uma avaliação mais genérica dos microorganismos presentes em uma amostra). Após a concentração de uma população mista de microorganismos, a presença de determinadas cepas pode ser determinada, se desejado, utilizando-se sondas para cepas específicas.

[007]A concentração ou captura não-específica de microorganismos tem sido realizada através de métodos baseados em interações entre carboidratos e proteína lectina. Suportes revestidos com quitosano têm sido usados como dispositivos de captura não-específica, e substâncias (por exemplo, carboidratos, vitaminas, compostos quelantes de ferro, e sideróforos) que servem como nutrientes para microorganismos também têm sido descritas como ligantes úteis para permitir a captura não-específica de microorganismos.

[008]Vários materiais inorgânicos (por exemplo, hidróxi apatita e hidróxidos metálicos) têm sido usados para ligar e concentrar bactérias não especificamente. Os métodos de concentração físicos (por exemplo, filtração, cromatografia, centrifugação e deposição gravitacional) também têm sido utilizados para captura não-específica, com e/ou sem o uso de agentes de ligação inorgânicos. Esses métodos de concentração não-específica variam em velocidade, custo (necessidade de pelo menos alguns equipamentos caros, materiais e/ou técnicos treinados), requisitos de amostra (por exemplo, a natureza da amostra e/ou limitações de volume), requisitos

de espaço, facilidade de uso (necessidade de pelo menos alguns complicados processos de múltiplas etapas), adequação para uso local e/ou eficácia.

Sumário da Invenção

[009]Com isso, reconhecemos que há uma necessidade urgente por processos que permitam detectar rapidamente microorganismos patogênicos. Esses processos serão de preferência não apenas rápidos, mas também de baixo custo, simples (sem envolver equipamentos ou procedimentos complexos), e/ou eficazes sob uma variedade de condições (por exemplo, com vários tipos de matrizes de amostra, várias cargas bacterianas e vários volumes de amostra).

[0010]Brevemente, em um aspecto, esta invenção fornece um processo para concentrar não especificamente as cepas de microorganismos (por exemplo, cepas de bactérias, fungos, leveduras, protozoários, vírus (incluindo vírus não-envelopados e vírus envelopados), e endosporos bacterianos) presentes em uma amostra, de modo que os microorganismos permaneçam viáveis com o propósito de detecção ou teste de uma ou mais das cepas. O processo compreende (a) o fornecimento de um agente de concentração (de preferência, um agente de concentração particulado) que compreende um silicato amorfo de metal e que tem uma composição de superfície com uma razão entre átomos de metal e átomos de silício menor que ou igual a cerca de 0,5, conforme determinado por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS) (por exemplo, um talco esferoidizado); (b) o fornecimento de uma amostra (de preferência, sob a forma de um fluido) que compreende pelo menos uma cepa de microorganismo; e (c) o contato (de preferência, por misturação) do agente de concentração com a amostra de modo que ao menos uma porção de pelo menos uma cepa de microorganismo seja ligada ao ou capturada pelo agente de concentração. De preferência, o processo compreende adicionalmente a detecção da presença da ao menos uma cepa de microorganismo ligada (por exemplo, por cultura, microscopia/formação de imagens, genética, biolumi-

nescência ou métodos de detecção imunológica) e/ou a separação (de preferência, por deposição gravitacional) do agente de concentração resultante ligado ao microorganismo. O processo pode, opcionalmente, compreender adicionalmente separar da amostra o agente de concentração segregado resultante.

[0011]O processo da presente invenção não se destina a uma cepa de microorganismo específica. Ao contrário, descobriu-se que certos materiais inorgânicos relativamente baratos podem ser surpreendentemente eficazes na captura de uma variedade de microorganismos. Esses materiais podem ser usados para concentrar as cepas de microorganismos presentes em uma amostra (por exemplo, uma amostra de alimento) em uma maneira que independe da cepa, de modo que uma ou mais das cepas de microorganismos (de preferência, uma ou mais cepas de bactérias) podem ser testadas mais facilmente e rapidamente.

[0012]O processo da invenção é relativamente simples e de baixo custo (sem exigir equipamentos complexos ou caros materiais de cepas específicas) e pode ser relativamente rápido (em modalidades preferenciais capturando pelo menos cerca de 70 por cento (com mais preferência, pelo menos cerca de 80 por cento; com a máxima preferência, pelo menos cerca de 90 por cento) dos microorganismos presentes em uma amostra em menos de cerca de 30 minutos, em relação a uma amostra de controle correspondente sem agente de concentração). Além disso, o processo pode ser eficaz com uma variedade de microorganismos (incluindo patógenos como bactérias gram-positivas e gram-negativas) e com uma variedade de amostras (matrizes de amostras diferentes e, ao contrário de pelo menos alguns métodos da técnica anterior, mesmo amostras com baixo teor e/ou grandes volumes de microorganismos). Dessa forma, pelo menos algumas modalidades do processo da presente invenção podem satisfazer a urgente necessidade acima citada de processos simples e de baixo custo de detecção rápida de microorganismos patogênicos sob uma variedade de condições.

[0013]Em outro aspecto, a invenção fornece, também, um kit de diagnóstico

para uso da execução do processo da invenção, sendo que o kit compreende (a) um agente de concentração (de preferência, um agente de concentração particulado) que compreende um silicato de metal e que tem uma composição de superfície com uma razão entre átomos de metal e átomos de silício menor que ou igual a cerca de 0,5, conforme determinado por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS); (b) um recipiente de teste (de preferência, um recipiente de teste esterilizado); e (c) instruções para uso do agente de concentração na execução do processo da invenção. De preferência, o kit de diagnóstico compreende adicionalmente um ou mais componentes selecionados a partir de meios de cultura de microorganismos, reagentes de lise, tampões, componentes de teste de detecção de bioluminescência, componentes de teste de detecção genética, e combinações dos mesmos.

Descrição Detalhada

Definições

[0014]Conforme utilizados neste pedido de patente:

“amostra” significa uma substância ou material que é coletado (por exemplo, para ser analisado) por um método não-cosmético (ou seja, por um método diferente da aplicação e/ou remoção de uma composição compreendendo o agente de concentração descrito acima do corpo de um ser humano);

“matriz de amostra” significa os componentes de uma amostra exceto microorganismos;

“detecção” significa a identificação de pelo menos um componente de um microorganismo, que determina que o microorganismo está presente;

“detecção genética” significa a identificação de um componente de material genético como DNA ou RNA que deriva de um microorganismo-alvo;

“detecção imunológica” significa a identificação de um material antígeno como uma proteína ou um proteoglicano derivado de um microorganismo-alvo;

“microorganismo” significa qualquer célula que tem material genético ade-

quado para análise ou detecção (incluindo, por exemplo, bactérias, leveduras, vírus e endosporos bacterianos);

“cepa de microorganismo” significa um tipo particular de microorganismo que é distinguível através de um método de detecção (por exemplo, microorganismos de diferentes gêneros, de diferentes espécies dentro de um gênero, ou de diferentes grupos isolados dentro de uma espécie); e

“microorganismo-alvo” significa qualquer microorganismo que se deseja detectar.

Agente de concentração

[0015]Agentes de concentração adequados para uso da execução do processo da invenção incluem os agentes que compreendem um silicato de metal e que têm uma composição de superfície com uma razão entre átomos de metal e átomos de silício menor que ou igual a cerca de 0,5 (de preferência, menor que ou igual a cerca de 0,4; com mais preferência, menor que ou igual a cerca de 0,3; com a máxima preferência, menor que ou igual a cerca de 0,2), conforme determinado por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS). De preferência, a composição de superfície compreende também ao menos cerca de 10 em porcentagem atômica média de carbono (com mais preferência, ao menos cerca de 12 em porcentagem atômica média de carbono; com a máxima preferência, ao menos cerca de 14 em porcentagem atômica média de carbono), conforme determinado por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS). XPS é uma técnica que pode determinar a composição elementar dos elementos mais externos, aproximadamente de 3 a 10 nanômetros (nm) em uma superfície da amostra e que é sensível a todos os elementos da Tabela Periódica exceto o hidrogênio e o hélio. XPS é uma técnica quantitativa com limites de detecção para a maioria dos elementos na faixa de concentração de 0,1 a 1 em porcentagem atômica. As condições preferenciais de avaliação de composições de superfície para a técnica XPS podem incluir um ângulo de emissão de 90 graus me-

dido em relação à superfície da amostra com um ângulo sólido de aceitação de ± 10 graus.

[0016]A concentração ou captura utilizando-se os agentes de concentração acima descritos é, em geral, não-específica para qualquer cepa, espécie ou tipo de microorganismo particular e, portanto, torna possível a concentração de uma população geral de microorganismos em uma amostra. Cepas específicas de microorganismos podem, então, ser detectadas entre a população de microorganismos capturados usando-se qualquer método de detecção conhecido com sondas para cepas específicas. Dessa forma, os agentes de concentração podem ser usados para a detecção de contaminantes microbianos ou patógenos (particularmente patógenos existentes em alimentos como bactérias) em amostras clínicas, alimentares, ambientais ou outras.

[0017]Quando dispersos ou suspensos em sistemas de água, os materiais inorgânicos como silicatos de metais apresentam cargas de superfície que são características do material e do pH do sistema de água. O potencial na interface material-água é chamado de “potencial zeta”, que pode ser calculado a partir de mobilidades eletroforéticas (isto é, a partir das taxas segundo as quais as partículas de material deslocam-se entre os eletrodos carregados dispostos no sistema de água). Os agentes de concentração utilizados na execução do processo da invenção têm potenciais zeta que são mais negativos que os potenciais de, por exemplo, um silicato de metal comum como talco comum. Ainda assim, os agentes de concentração são surpreendentemente mais eficazes que o talco em concentrar microorganismos como bactérias, cujas superfícies geralmente tendem a ser carregadas negativamente. De preferência, os agentes de concentração têm um potencial zeta negativo a um pH de cerca de 7 (com mais preferência, um potencial zeta de Smoluchowski na faixa de cerca de -9 milivolts a cerca de -25 milivolts a um pH de cerca de 7; com mais preferência ainda, um potencial zeta de Smoluchowski na

faixa de cerca de -10 milivolts a cerca de -20 milivolts a um pH de cerca de 7; com a máxima preferência, um potencial zeta de Smoluchowski na faixa de cerca de -11 milivolts a cerca de -15 milivolts a um pH de cerca de 7).

[0018]Silicatos de metais úteis incluem silicatos amorfos de metais como magnésio, cálcio, zinco, alumínio, ferro, titânio e similares (de preferência, magnésio, zinco, ferro e titânio; com mais preferência, magnésio), e combinações dos mesmos. São preferenciais silicatos amorfos de metais em uma forma particulada ao menos parcialmente fundida (com mais preferência, silicatos amorfos esferoidizados de metais; com a máxima preferência, silicato amorfo esferoidizado de magnésio). Silicatos de metais são conhecidos e podem ser quimicamente sintetizados por métodos conhecidos ou obtidos através da mineração e do processamento de minérios em bruto de ocorrência natural.

[0019]Formas particuladas, ao menos parcialmente fundidas, de silicatos amorfos de metais podem ser preparadas empregando-se qualquer um dos métodos conhecidos de derretimento ou amaciamento de partículas de alimentação relativamente pequenas (por exemplo, partículas com tamanho médio de até cerca de 25 microns) sob condições controladas para produzir partículas geralmente elipsoidais ou esferoidais (ou seja, partículas que têm imagens bidimensionais ampliadas que são genericamente arredondadas e isentas de cantos ou bordas agudas, incluindo formatos verdadeiramente ou substancialmente circulares e elípticos e quaisquer outros formatos redondos ou curvos). Tais métodos incluem atomização, polimento a fogo, fusão direta e similares. Um método preferencial é a fusão a chama, no qual partículas substancialmente vítreas, ao menos parcialmente fundidas, são formadas por fusão direta ou polimento a fogo de partículas sólidas de alimentação (por exemplo, como no método descrito na patente US n° 6.045.913 (Castle), cuja descrição é aqui incorporada, por referência). Com a máxima preferência, tais métodos podem ser utilizados para produzir silicatos amorfos esferoidizados de metais

convertendo-se uma porção substancial de partículas de alimentação de formato irregular (por exemplo, de cerca de 15 a cerca de 99 volumes por cento; de preferência, de cerca de 50 a cerca de 99 volumes por cento; com mais preferência, de cerca de 75 a cerca de 99 volumes por cento; com a máxima preferência, de cerca de 90 a cerca de 99 volumes por cento) para partículas genericamente elipsoidais ou esferoidais.

[0020]Alguns silicatos amorfos de metais encontram-se comercialmente disponíveis. Por exemplo, silicato amorfo esferoidizado de magnésio encontra-se comercialmente disponível para uso em formulações cosméticas (por exemplo, como microesferas cosméticas CM-111 da 3M™, disponíveis junto à 3M Company, St. Paul, MN, EUA).

[0021]Além de silicatos amorfos de metais, os agentes de concentração podem compreender adicionalmente outros materiais incluindo óxidos de metais (por exemplo, ferro ou titânio), silicatos cristalinos de metais, outros materiais cristalinos e similares, desde que os agentes de concentração tenham as composições de superfície descritas acima. Os agentes de concentração, entretanto, de preferência não contêm essencialmente sílica cristalina.

[0022]Na execução do processo da invenção, os agentes de concentração podem ser utilizados em qualquer forma que seja sensível ao contato da amostra e à captura de microorganismos (por exemplo, sob a forma de particulado ou aplicado a um suporte como uma vareta, filme, filtro, tubo, cavidade, placa, cápsulas, membrana, ou canal de um dispositivo de microfluído, ou similar). De preferência, os agentes de concentração são usados sob a forma de particulados, com mais preferência compreendendo micropartículas (de preferência, micropartículas com tamanhos de partícula na faixa de cerca de 1 micrômetro (com mais preferência, cerca de 2 micrômetros) a cerca de 100 micrômetros (com mais preferência, cerca de 50 micrômetros; com mais preferência ainda, cerca de 25 micrômetros; com a máxi-

ma preferência, cerca de 15 micrômetros; onde qualquer limite inferior pode ser alinhado com qualquer limite superior do intervalo).

Amostra

[0023]O processo da invenção pode ser aplicado a uma variedade de tipos diferentes de amostras, incluindo, mas não se limitando a, amostras médicas, ambientais, alimentares, clínicas e de laboratório, e combinações das mesmas. Amostras médicas ou veterinárias podem incluir, por exemplo, células, tecidos, ou fluidos de uma fonte biológica (por exemplo, um ser humano ou um animal) que devem ser testadas para diagnóstico clínico. Amostras ambientais podem ser, por exemplo, procedentes de um estabelecimento médico ou veterinário, uma instalação industrial, solo, uma fonte de água, uma área de preparo de alimentos (áreas de contato e não-contato com alimentos), um laboratório, ou uma área que tenha estado potencialmente sujeita a ações de bioterrorismo. As amostras de áreas de processamento, manipulação e preparação de alimentos são preferenciais, uma vez que são, frequentemente, de interesse particular em relação à contaminação de alimentos causada por patógenos bacterianos.

[0024]As amostras obtidas sob a forma de um líquido ou sob a forma de uma dispersão ou suspensão de sólido em líquido podem ser usadas diretamente, ou podem ser concentradas (por exemplo, por centrifugação) ou diluídas (por exemplo, mediante a adição de uma solução tampão (com pH controlado)). As amostra sob a forma de um sólido ou de um semi-sólido podem ser usadas diretamente ou podem ser extraídas, se for desejado, por um método como, por exemplo, lavagem ou enxágue com, ou suspensão ou dispersão em, um meio fluido (por exemplo, uma solução' tampão). As amostras podem ser obtidas de superfícies (por exemplo, usando-se cotonete ou por enxágue). De preferência, a amostra é um fluido (por exemplo, um líquido, um gás, ou uma dispersão ou suspensão de sólido ou líquido em líquido ou gás).

[0025]Exemplos de amostras que podem ser usadas na execução do proces-

so da invenção incluem alimentos (por exemplo, produtos vegetais frescos ou pratos pronto para consumo ou carnes preparadas (“frios”)), bebidas (por exemplo, sucos ou bebidas carbonatadas), água potável, e fluidos biológicos (por exemplo, sangue integral ou um componente do mesmo como plasma, uma fração de sangue enriquecida com plaquetas, um concentrado de plaquetas, ou células com grandes quantidades de eritrócitos; preparações de células (por exemplo, tecido disperso, aspiração de medula óssea, ou medula óssea de estruturas vertebrais); suspensão de células; urina, saliva, e outros fluidos corpóreos; medula óssea; fluido pulmonar; fluido cerebral; exsudatos de ferimentos; amostras de biópsia de ferimentos; fluido ocular; fluido espinhal; e similares), bem como preparações lisadas, como lisatos celulares, que podem ser formados usando-se procedimentos conhecidos como o uso de tampões e lise e similares. Amostras preferenciais incluem alimentos, bebidas, água potável, fluidos biológicos, e combinações dos mesmos (com alimentos, bebidas, água potável, e combinações dos mesmos sendo as mais preferenciais).

[0026]O volume da amostra pode variar dependendo da aplicação específica. Por exemplo, quando o processo da invenção é usado para um diagnóstico ou aplicação de pesquisa, o volume da amostra pode tipicamente situar-se na faixa de microlitro (por exemplo, 10 μ L ou mais). Quando o processo é usado para um teste de patógenos em alimentos ou teste de segurança de água potável, o volume da amostra pode tipicamente situar-se na faixa de mililitro a litro (por exemplo, 100 mililitros a 3 litros). Em uma aplicação industrial, como bioprocessamento ou formulação farmacêutica, o volume pode ser de dezenas de milhares de litros.

[0027]O processo da invenção pode isolar microorganismos de uma amostra em um estado concentrado e pode, também, permitir o isolamento de microorganismos dos componentes da matriz de amostra que podem inibir os procedimentos de detecção a serem utilizados. Em todos esses casos, o processo da invenção pode ser usado além ou no lugar de outros métodos de concentração de microorganismos.

mos. Dessa forma, opcionalmente, as culturas podem ser desenvolvidas a partir de amostras antes ou depois da execução do processo da invenção, se for desejada uma concentração adicional.

Contato

[0028]O processo da invenção pode ser executado por qualquer um dos vários métodos conhecidos existentes ou que venham ser desenvolvidos para proporcionar o contato entre dois materiais. Por exemplo, o agente de concentração pode ser adicionado à amostra, ou a amostra pode ser adicionada ao agente de concentração. Uma vareta revestida com agente de concentração pode ser imersa em uma solução de amostra, uma solução de amostra pode ser derramada sobre um filme revestido com agente de concentração, uma solução de amostra pode ser derramada em um tubo ou cavidade revestida com agente de concentração, ou uma solução de amostra pode ser passada através de um filtro (por exemplo, um filtro com tecido ou não-tecido) revestido com agente de concentração.

[0029]De preferência, entretanto, o agente de concentração e a amostra são combinados (usando-se qualquer ordem de adição) em qualquer um de uma variedade de recipientes (opcionalmente, mas de preferência, um recipiente fechado, encerrado ou lacrado; com mais preferência, um tubo de ensaio, garrafa ou jarra fechados). Recipientes adequados para uso na execução do processo da invenção serão determinados pela amostra específica e poderão variar amplamente em tamanho e natureza. Por exemplo, o recipiente pode ser pequeno, como um recipiente de 10 microlitros (por exemplo, um tubo de ensaio) ou maior, como um recipiente de 100 mililitros a 3 litros (por exemplo, um frasco de Erlenmeyer ou uma garrafa de polipropileno de boca grande). O recipiente, o agente de concentração, e qualquer outro aparelho ou aditivos que entrarem em contato com a amostra diretamente poderão ser esterilizados (por exemplo, por calor controlado, gás de óxido de etileno, ou radiação) antes do uso, para reduzir ou evitar qualquer contamina-

ção da amostra que possa causar erros de detecção. A quantidade de agente de concentração que é suficiente para capturar ou concentrar os microorganismos de uma determinada amostra para a detecção bem-sucedida irá variar (dependendo, por exemplo, da natureza e forma do agente de concentração e do volume da amostra) e pode ser prontamente determinada pelo versado na técnica. Por exemplo, 10 miligramas de agente de concentração por mililitro de amostra podem ser úteis para algumas aplicações.

[0030]Se for desejado, o contato pode ser realizado passando-se um agente de concentração particulado ao menos uma vez através de uma amostra (por exemplo, por deposição gravitacional ao longo de um período de, por exemplo, cerca de 10 minutos). O contato pode ser otimizado misturando-se (por exemplo, por movimentação, agitação, ou uso de uma plataforma de vibração) de modo que as partículas do agente de concentração passem repetidamente ou decanem através de uma porção substancial da amostra. Para pequenos volume da ordem de microlitros (tipicamente menos que 0,5 mililitro), a mistura pode ser rápida como por rotação ou “nutation”, por exemplo conforme descrito na patente US nº 5.238. 812 (Coulter et al.), cuja descrição é aqui incorporada, por referência. Para volumes maiores, da ordem de 0,5 mililitros ou mais (tipicamente 0,5 mililitro a 3 litros), a mistura pode ser feita revolvendo-se suavemente o agente de concentração particulado e a amostra em uma maneira “extremidade sobre extremidade”, por exemplo conforme descrito na patente US nº 5.576.185 (Coulter et al.), cuja descrição é aqui incorporada, por referência. A ação de revolver pode ser feita, por exemplo, por meio de um dispositivo configurado para segurar um tubo de ensaio ou outro tipo de vaso de reação e girar lentamente o tubo de ensaio ou o vaso em uma maneira “extremidade sobre extremidade”. O contato pode ser executado por um período desejado (por exemplo, para volumes de amostras de cerca de 100 mililitros ou menos, até cerca de 60 minutos de contato podem ser úteis; de preferência, cerca de 15 segundos a cerca de 10 minutos ou mais; com mais preferência, cerca de 15 segundos

a cerca de 5 minutos).

[0031] Dessa forma, na execução do processo da invenção, a mistura (por exemplo, agitação, vibração ou movimentação) e/ou a incubação (por exemplo, à temperatura ambiente) são opcionais, mas preferenciais, para aumentar o contato dos microorganismos com o agente de concentração. Um método de contato preferencial inclui a mistura (por exemplo, durante cerca de 15 segundos a cerca de 5 minutos) e a incubação (por exemplo, durante cerca de 3 minutos a cerca de 30 minutos) de uma amostra contendo microorganismos (de preferência, um fluido) com agente de concentração particulado. Se for desejado, um ou mais aditivos (por exemplo, reagentes de lise, reagentes de teste de bioluminescência, reagentes de captura de ácido nucléico (por exemplo, cápsulas magnéticas), meio de crescimento microbiano, tampões (por exemplo, para umedecer uma amostra sólida), reagentes de coloração microbiana, tampões de lavagem (por exemplo, para remover material não ligado), agentes de eluição (por exemplo, albumina sérica), tensoativos (por exemplo, tensoativo não-iônico Triton™ X -100 disponível junto à Union Carbide Chemicals and Plastics, Houston, TX, EUA), agentes de abrasão mecânica/eluição (por exemplo, contas de vidro) e similares) podem ser incluídos na combinação do agente de concentração e da amostra.

[0032] Se for desejado, o agente de concentração (sozinho ou em combinação com, por exemplo, materiais microbicida e/ou com materiais veículo sob a forma de líquidos (por exemplo, água ou óleos), sólidos (por exemplo, tecidos, polímeros, papéis, ou sólidos inorgânicos), géis, cremes, espumas, ou pastas) pode ser aplicado ou esfregado contra uma superfície ou material não-poroso ou poroso, sólido, contaminado por microorganismo ou que pode ser contaminado por microorganismos (por exemplo, para uso como agente de "limpeza"). Se for desejado, podem ser utilizados aglutinantes, estabilizantes, tensoativos, ou outros modificadores de propriedade.

[0033] Para tal uso, o agente de concentração pode ser aplicado a materiais te-

cidos ou não-tecidos e pode ser aplicado a superfícies descartáveis como papel, lenços de papel, cotonete, bem como a uma variedade de materiais absorventes e não-absorventes. Por exemplo, o agente de concentração pode ser incorporado em materiais veículo de pano ou de papel para uso como lenços de “limpeza”. O agente de concentração pode ser aplicado (por exemplo, sob a forma de lenços ou pastas que compreendem um material veículo) em superfícies sólidas, por exemplo, em ambientes domésticos, creches, instalações industriais e hospitalares, para limpar brinquedos, equipamentos, dispositivos médicos, superfícies de trabalho e similares. Quando utilizada para limpeza ou outras finalidades, a amostra pode ser simultaneamente coletada e colocada em contato com o agente de concentração em uma única etapa, se for desejado.

Segregação e/ou separação

[0034]Opcionalmente, mas de preferência, o processo da invenção compreende adicionalmente a segregação do agente de concentração resultante ligado ao microorganismo. De preferência, essa segregação pode ser feita baseando-se, ao menos em parte, na deposição gravitacional (sedimentação por gravidade; por exemplo, ao longo de um período de cerca de 5 minutos a cerca de 30 minutos). Em alguns casos, entretanto, pode ser desejável acelerar a segregação (por exemplo, por centrifugação ou filtração) ou usar combinações de qualquer um dos métodos de segregação.

[0035]O processo da invenção pode, opcionalmente, compreender adicionalmente a separação do agente de concentração resultante ligado ao microorganismo e à amostra. Para amostras fluidas, isso pode envolver a remoção ou a separação do sobrenadante que resulta após a segregação. A separação do sobrenadante pode ser executada por meio de inúmeros métodos que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, por decantação ou sifonamento, de modo a deixar o agente de concentração ligado ao microorganismo no fundo do recipiente ou vaso utilizado no processo).

[0036]O processo da invenção pode ser executado manualmente (por exemplo, por lotes) ou pode ser automatizado (por exemplo, para permitir o processamento contínuo ou semicontínuo).

Detecção

[0037]Uma variedade de microorganismos pode ser concentrada e, opcionalmente, mas de preferência, detectada pelo uso do processo da invenção, incluindo, por exemplo, bactérias, fungos, leveduras, protozoários, vírus (incluindo vírus não-envelopados e vírus envelopados), endosporos bacterianos (por exemplo, *bacilo* (incluindo *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) e *clostrídio* (incluindo *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens*)) e similares, e combinações dos mesmos (de preferência, bactérias, leveduras, vírus, endosporos bacterianos, fungos, e combinações dos mesmos; com mais preferência, bactérias, leveduras, vírus, endosporos bacterianos, e combinações dos mesmos; com mais preferência ainda, bactérias, vírus, endosporos bacterianos, e combinações dos mesmos; com a máxima preferência, bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas, vírus não-envelopados (por exemplo, norovírus, poliovírus, vírus da hepatite A, rinovírus, e combinações dos mesmos), endosporos bacterianos, e combinações dos mesmos). O processo tem utilidade na detecção de patógenos, que podem ser importantes para a segurança de alimentos ou por razões médicas, ambientais ou antiterrorismo. O processo pode ser particularmente útil na detecção de bactérias patogênicas (por exemplo, bactérias gram-negativas e gram-positivas), bem como várias leveduras, bolor e micoplasmas (e combinações de qualquer um desses).

[0038]Os gêneros dos microorganismos-alvo a serem detectados incluem, mas não se limitam a, *listeria*, *escherichia*, *salmonela*, *Campylobacter*, *clostrídio*, *Helicobacter*, *micobactéria*, *estafilococo*, *shiguela*, *enterococo*, *bacilo*, *neisséria*, *shiguela*, *estreptococo*, *vibrão*, *yersínia*, *bordetella*, *borrélia*, *pseudomonas*, *sacaromicetos*, *cândida* e similares, e combinações dos mesmos. As amostras podem conter uma pluralidade de

cepas de microorganismos, e qualquer cepa específica pode ser detectada independentemente de qualquer outra cepa. Cepas de microorganismos específicos que podem ser alvos para a detecção incluem *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Staphylococcal enterotoxin ssp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas aeruginosa* e similares, e combinações dos mesmos (de preferência, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, vírus entéricos não-envelopados que infectam seres humanos dos quais o bacteriófago *Escherichia coli* é um hospedeiro, e combinações dos mesmos).

[0039] Os microorganismos que foram capturados ou ligados (por exemplo, por adsorção) pelo agente de concentração podem ser detectados essencialmente por qualquer método desejado que seja atualmente conhecido ou que venha a ser desenvolvido. Esses métodos incluem, por exemplo, métodos baseados em culturas (que podem ser preferenciais quando o tempo permite), microscopia (por exemplo, usando-se um microscópio de luz transmitida ou um microscópio de epifluorescência, que pode ser usado para visualizar microorganismos marcados com corantes fluorescentes) e outros métodos de formação de imagens, métodos de detecção imunológica e métodos de detecção genética. O processo de detecção após a captura dos microorganismos pode incluir, opcionalmente, a lavagem para remover componentes da matriz de amostra.

[0040] A detecção imunológica é a detecção de um material antígeno derivado de um organismo-alvo, que é comumente uma molécula biológica (por exemplo, uma proteína ou proteoglicano) agindo como um marcador sobre a superfície das bactérias ou das partículas virais. A detecção do material antígeno pode ser

feita, tipicamente, por um anticorpo, um polipeptídeo selecionado a partir de um processo como Phage Display, ou um aptâmero a partir de um processo de triagem.

[0041]Os métodos de detecção imunológica são bem conhecidos e incluem, por exemplo, imunoprecipitação e ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA). A ligação de anticorpos pode ser detectada de várias maneiras (por exemplo, pela marcação de um anticorpo primário ou secundário com um corante fluorescente, com um ponto quântico, ou com uma enzima que pode produzir quimioluminescência ou um substrato colorido, e o uso de uma leitora de placas ou um dispositivo de fluxo lateral).

[0042]A detecção pode ser executada também por testes genéticos (por exemplo, por hibridização de ácido nucléico ou amplificação dirigida por iniciador), que é frequentemente um método preferencial. Os microorganismos capturados ou ligados podem ser lisados para tornar seu material genético disponível para teste. Os métodos de lise são bem conhecidos e incluem, por exemplo, tratamentos como sonicação, choque osmótico, tratamento por alta temperatura (por exemplo, de cerca de 50°C a cerca de 100°C), e a incubação com uma enzima como lisozima, glucolase, zimolase, liticase, proteinase K, proteinase E, e enolisinas virais.

[0043]Muitos testes de detecção genética comumente usados detectam os ácidos nucléicos de um microorganismo específico, incluindo o DNA e/ou o RNA. A estringência das condições utilizadas em um método de detecção genética está correlacionada com o nível de variação na sequência do ácido nucléico que é detectada. Condições altamente rigorosas de concentração de sal e temperatura podem limitar a detecção até a sequência exata de ácido nucléico do alvo. Dessa forma, as cepas de microorganismos com pequenas variações em uma sequência de ácido nucléico do alvo pode ser distinguida usando-se um teste genético altamente rigoroso. A detecção genética pode se basear na hibridização de ácido nucléico onde uma sonda de ácido

nucléico de filamento único é hibridizada até os ácido nucléicos sem propriedade do microorganismo, de modo que é produzido um ácido nucléico de filamento duplo, incluindo a cepa de sonda. O versado na técnica estará familiarizado com identificações de sondas, como radioativas, fluorescentes, e quimioluminescentes, para a detecção de híbridos após a eletroforese em gel, eletroforese capilar, ou outro método de separação.

[0044]Os métodos de detecção genética particularmente úteis baseiam-se na amplificação de ácido nucléico dirigida por iniciadores. Os métodos de amplificação de ácido nucléico dirigida por iniciadores incluem, por exemplo, métodos de ciclagem térmica (por exemplo, reação em cadeia de polimerase (PCR), reação em cadeia de polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), e reação em cadeia de ligase (LCR)), bem como métodos isotérmicos e amplificação de deslocamento de cepas (SDA) (e combinações dos mesmos; de preferência, PCR ou RT-PCR). Os métodos para a detecção do produto amplificado não se limitam a e incluem, por exemplo, separação por eletroforese em gel e coloração por brometo de etídeo, bem como a detecção de uma marca fluorescente ou marca de rádio incorporada no produto. Os métodos que não exigem uma etapa de separação antes da detecção do produto amplificado podem também ser usados (por exemplo, PCR em tempo real ou detecção homogênea).

[0045]Os métodos de detecção por bioluminescência são bem conhecidos e incluem, por exemplo, métodos de detecção por trifosfato de adenosina (ATP) inclusive aqueles descritos na patente US n° 7.422.868 (Fan et al.), cujas descrições estão aqui incorporadas a título de referência.

[0046]Como não é específico para uma determinada cepa, o processo da invenção fornece um sistema de captura geral que permite que múltiplas cepas de microorganismos sejam o alvo para testes na mesma amostra. Por exemplo, quando se testa quanto à contaminação de amostras de alimentos, pode ser desejado testar a presença de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *salmonela* dentro da

mesma amostra. Uma única etapa de captura pode, então, ser seguida de, por exemplo, testes PCR ou RT-PCR usando-se iniciadores específicos para amplificar diferentes sequências de ácido nucléico de cada uma dessas cepas de microorganismos. Dessa forma, pode-se evitar a necessidade de manuseio e procedimentos de preparo de amostras separadas para cada cepa.

Kit de diagnóstico

[0047]Um kit de diagnóstico para uso na execução do processo da invenção compreende (a) um agente de concentração acima descrito (de preferência, particulado); (b) um recipiente de teste (de preferência, um recipiente de teste esterilizado); e (c) instruções para uso do agente de concentração na execução do processo da invenção. De preferência, o kit de diagnóstico compreende adicionalmente um ou mais componentes selecionados a partir de meios de cultura ou de crescimento de microorganismos, reagentes de lise, tampões, componentes de teste de detecção de bioluminescência (por exemplo, luminômetro, reagentes de lise, enzima luciferase, substrato de enzima, tampões de reação e similares), componentes de teste de detecção genética, e combinações dos mesmos. Um preferencial reagente de lise preferencial é uma enzima lítica fornecida em uma tampão, e componentes do teste de detecção genética preferenciais incluem um ou mais iniciadores específicos para um microorganismo-alvo.

[0048]Por exemplo, uma modalidade preferencial do kit de diagnóstico da invenção contém um agente de concentração particulado (por exemplo, em um recipiente descartável esterilizado como um frasco de vidro ou de polipropileno), juntamente com instruções de uso do dito agente para executar o processo da invenção (por exemplo, misturando-se o agente de concentração com uma amostra fluida a ser analisada, permitindo-se que o agente de concentração seja depositado por gravidade, removendo-se o sobrenadante resultante, e detectando-se a presença de pelo menos uma cepa de microorganismo-alvo ligada por agente de concentração). O agente de concentração pode, opcionalmente, ser hidratado em um pequeno volume de tampão com conservan-

te para otimizar a estabilidade durante o armazenamento e transporte e/ou pode ser contido/separado em um saco de contenção lacrado e de abertura por rasgamento para evitar contaminação. O agente de concentração pode estar sob a forma de uma dispersão ou suspensão em um líquido ou pode estar sob a forma de pó. De preferência, o kit de diagnóstico compreende alíquotas previamente medidas (por exemplo, com base no volume da amostra) do agente de concentração particulado (com mais preferência, contido em um ou mais sacos de contenção lacrados e de abertura por rasgamento).

Exemplos

[0049]Os objetivos e vantagens desta invenção são ilustrados, ainda, pelos exemplos a seguir, porém, os materiais e quantidades relatados nestes exemplos, bem como outras condições e detalhes, não devem ser interpretados de modo a limitar indevidamente esta invenção.

Materiais

[0050]O agente de concentração silicato cristalino de magnésio (deste ponto em diante do presente documento referido como talco) foi adquirido junto à Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, EUA). Todas as culturas de microorganismos foram adquiridas junto à The American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA).

[0051]O agente de concentração silicato amorfo esferoidizado de magnésio (deste ponto em diante do presente documento referido como talco-AS) foi obtido como microesferas cosméticas CM-111 da 3M™ (conformadas como esferas sólidas; densidade da partícula de 2,3 g/centímetros cúbico; área superficial de 3,3 m²/g; tamanho de partícula: 90 por cento menos que cerca de 11 microns, 50 por cento menos que cerca de 5 microns, 10 por cento menos que cerca de 2 microns; disponível junto à 3M Company, St. Paul, MN, EUA).

Medições do potencial zeta

[0052]Os potenciais zeta das dispersões aquosas dos agentes de concentra-

ção talco e talco-AS (5,75 por cento em peso de talco e 5,8 por cento em peso de talco-AS, respectivamente, em água desionizada de 18 mega Ohms obtida utilizando-se um sistema de desionização Milli-Q™ Elix 10™ Synthesis A10 da Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) foram medidos como função do ácido clorídrico adicionado (pH) empregando-se um analisador espectral eletroacústico de multi-frequência Colloidal Dynamics Acoustosizer II™ (Colloidal Dynamics, Warwick, RI, EUA) equipado com um módulo de titulação automática TM200, eletrodo de pH e célula de condutividade em linha. As medições foram realizadas usando-se calibração polar e ajustes de amostra polares com os seguintes parâmetros gerais:

Volume inicial:	170 mL de dispersão
Volume de titulação:	5 a 10 mL ao final; 20 etapas para cada titulação
Titulante:	ácido clorídrico 1,0 N em água (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
Taxa de agitação:	300 rotações por minuto (rpm)
Taxa de bombeamento:	400 mL por minuto
Atraso de mistura:	120 segundos com agitação após a adição de ácido antes da medição

[0053]A um pH de cerca de 7, o talco-AS exibiu um potencial zeta de Smoluchowski de cerca de -12 mV, e o talco exibiu um potencial zeta de Smoluchowski de cerca de -8 mV.

Análise da composição de superfície

[0054]As composições de superfície das amostras dos agentes de concentração de talco e talco-AS foram analisadas por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS; também conhecida como ESCA). As amostras dos pós foram prensadas em fitas adesivas de lado duplo e sensíveis à pressão sobre papel alumínio. O excesso de pó foi removido de cada superfície da amostra aplicando-se gás nitrogênio comprimido.

[0055] Os dados espectrais foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Kratos AXIS Ultra™ DLD (Kratos Analytical, Manchester, Inglaterra) com uma fonte de excitação de raios X monocromática de Al-K_α (1487 eV) e um analisador hemisférico de energia de elétrons operado em um modo de energia contínua. Os fotoelétrons emitidos foram detectados a um ângulo de emissão de 90 graus medido em relação à superfície da amostra com um ângulo sólido de aceitação de ± 10 graus. Foi utilizado um canhão de elétrons de baixa energia para minimizar a carga da superfície. As medições foram feitas usando-se uma potência de 140 watts no ânodo e uma pressão de câmara de 2,7 mPa (2×10^{-8} Torr).

[0056] Uma área da superfície de cada amostra de agente de concentração medindo cerca de 300 micrômetros por cerca de 700 micrômetros foi analisada para cada ponto de dados. Três áreas em cada amostra foram analisadas e sua média calculada para se obter os valores médios em porcentagem atômica relatados. O processamento dos dados foi executado usando-se o software padrão Vision2™ (Kratos Analytical, Manchester, Inglaterra). Os resultados (elementos presentes em um nível detectável por XPS sobre a superfície dos agentes de concentração) são mostrados na Tabela A abaixo:

Tabela A.

Concentração Agente	Magnésio (Média em porcentagem atômica)	Silício (Média em porcentagem atômica)	Razão en- tre magné- sio e silício	Carbono (Média em porcentagem atômica)	Oxigênio (Média em porcentagem atômica)
Talco	17	26	0,65	6,9	50
Talco-AS	6,5	32	0,20	14	47

Método do teste de concentração de microorganismos

[0057] Uma colônia isolada de microorganismos foi inoculada em 5 mL de caldo de soja BBL™ Trypticase™ (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e incubada a

37 °C durante 18-20 horas. Essa cultura formada de um dia para o outro com $\sim 10^9$ unidades formadoras de colônia por mL foi diluída em um tampão de adsorção (contendo 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,1 mM MgCl_2 , e 1 mM K_2HPO_4) com pH de 7,2 para obter 10^3 microorganismos por mL de diluição. Um volume de 1,1 mL da diluição de microorganismos foi adicionado a tubos de polipropileno de 5 mL, separados, identificados e esterilizados (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 10 mg de agente de concentração, cada um dos quais foi fechado e misturado em um misturador de vórtice Thermolyne Maximix Plus™ (Barnstead International, Iowa, EUA). Cada tubo fechado foi incubado à temperatura ambiente (25 °C) durante 15 minutos em uma plataforma de vibração Thermolyne Vari Mix™ (Barnstead International, Iowa, EUA). Após a incubação, cada tubo permaneceu em repouso na bancada do laboratório por 10 minutos para decantar o agente de concentração. Os tubos com as amostras de controle contendo 1,1 mL da diluição de microorganismos sem agente de concentração foram tratados da mesma maneira. O agente de concentração decantado resultante e/ou o sobrenadante (e as amostras de controle) foram então usados para análise.

[0058]O agente de concentração decantado foi ressuspenso em uma solução tampão de Butterfield esterilizada de 1 mL (pH $7,2 \pm 0,2$; solução tampão de fosfato de potássio monobásico; número de catálogo VWR 83008-093, VWR, West Chester, PA, EUA) e colocado em um meio de cultura consistindo em placas 3M™ Petrifilm™ de contagem aeróbica (secas, reidratáveis; 3M Company, St. Paul., MN) de acordo com as instruções do fabricante. A contagem aeróbica foi quantificada usando-se uma leitora de placas 3M™ Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA). Os resultados foram calculados usando-se a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} &\text{Porcentagem de UFC/mL no agente de concentração ressuspenso} = \\ &(\text{número de colônias do agente de concentração ressuspenso em placas}) / \\ &(\text{número de colônias da amostra de controle não tratada em placas}) \times 100 \end{aligned}$$

(onde UFC = unidade formadora de colônia, que é uma unidade de microorganismos vivos ou viáveis).

[0059]Os resultados foram então relatados em termos de porcentagem de captura dos microorganismos pelo agente de concentração usando-se a fórmula abaixo:

Eficiência de captura ou porcentagem de captura = porcentagem de UFC/mL no agente de concentração ressuspenso Agente de concentração

[0060]Para fins de comparação, em ao menos alguns casos 1 mL do sobrenadante foi removido e colocado em placas não diluído ou diluído a 1:10 na solução tampão de Butterfield e colocado em um meio de cultura consistindo em placas 3M™ Petrifilm™ de contagem aeróbica. A contagem aeróbica foi quantificada usando-se uma leitora de placas 3M™ Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA). Os resultados foram calculados usando-se a seguinte fórmula:

Porcentagem de UFC/mL no sobrenadante =

(número de colônias do sobrenadante colocado em placas) / (número de colônias da amostra de controle não tratada em placas) x 100

(onde UFC = unidade formadora de colônia, que é uma unidade de microorganismos vivos ou viáveis).

[0061]Quando as colônias de microorganismos e o agente de concentração apresentaram cor similar (fornecendo pouco contraste para a leitora de placas), os resultados foram baseados no sobrenadante e foram então relatados em termos de porcentagem de captura dos microorganismos pelo agente de concentração usando-se a fórmula abaixo:

Eficiência de captura ou porcentagem de captura = 100 - porcentagem de UFC/mL no sobrenadante

Exemplos 1 e 2 e exemplos comparativos 1 e 2

[0062]Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos

descrito acima, 10 mg de silicato amorfo esferoidizado de magnésio (preparado conforme descrito acima; deste ponto em diante do presente documento referido como talco-AS) e silicato cristalino de magnésio (não-esferoidizado) (deste ponto em diante do presente documento referido como talco) foram testados separadamente quanto à concentração bacteriana em relação a microorganismos-alvo, a bactéria gram-negativa *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987) e a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Os resultados são mostrados na Tabela 1 abaixo (desvio padrão para todas as amostras menor que 10 por cento).

Tabela 1.

Exemplo n°.	Microorganismo	Agente de concentração	Porcentagem de captura
C-1	<i>Estafilococo</i>	Talco	58
1	<i>Estafilococo</i>	Talco-AS	99
C-2	<i>Salmonela</i>	Talco	69
2	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	92

Exemplos 3 a 5 e exemplos comparativos 3 a 5

[0063]Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima, diferentes pesos por volume unitário de talco-AS e de talco foram testados separadamente quanto à concentração bacteriana do microorganismo-alvo, *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987). Os resultados são mostrados na Tabela 2 abaixo (desvio padrão para todas as amostras menor que 10 por cento).

Tabela 2.

Exemplo n°.	Microorganismo	Agente de concentração	Quantidade de agente de concentração	Porcentagem de captura
-------------	----------------	------------------------	--------------------------------------	------------------------

			(mg/mL)	
C-3	<i>Salmonela</i>	Talco	1	63
3	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	1	82
C-4	<i>Salmonela</i>	Talco	5	64
4	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	5	90
C-5	<i>Salmonela</i>	Talco	10	69
5	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	10	95

Exemplos 6 a 8 e exemplos comparativos 6 a 8

[0064] Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima, 10 mg de talco-AS e de talco foram testados separadamente em relação a diferentes concentrações bacterianas do microorganismo-alvo, *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987). Os resultados são mostrados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3.

Exemplo n°.	Microorganismo	Agente de concentração	Concentração de microorganismos (UFC/mL)	Porcentagem de captura $\pm$ desvio padrão
C-6	<i>Salmonela</i>	Talco	10	68 $\pm$ 9
6	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	10	92 $\pm$ 11
C-7	<i>Salmonela</i>	Talco	100	74 $\pm$ 3
7	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	100	98 $\pm$ 3
C-8	<i>Salmonela</i>	Talco	1000	69 $\pm$ 1
8	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	1000	92 $\pm$ 1

Exemplos 9 a 11 e exemplos comparativos 9 a 11

[0065] Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima, 10 mg de talco-AS e de talco foram testados separadamente quanto à concentração bacteriana do microorganismo-alvo, *Salmonella enterica*, subespécie

Typhimurium enterica serovar (ATCC 35987) durante 5, 10 e 15 minutos de incubação. Os resultados são mostrados na Tabela 4 abaixo (desvio padrão para todas as amostras menor que 10 por cento).

Tabela 4.

Exemplo n.º	Microorganismo	Agente de concentração	Tempo de incubação (minutos)	Porcentagem de captura
C-9	<i>Salmonela</i>	Talco	5	74
9	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	5	97
C-10	<i>Salmonela</i>	Talco	10	77
10	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	10	96
C-11	<i>Salmonela</i>	Talco	15	75
11	<i>Salmonela</i>	Talco-AS	15	92

Exemplo 12 e exemplo comparativo 12

[0066] Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima, com exceção do uso da solução tampão de Butterfield Em vez da solução tampão de adsorção, 10 mg de talco-AS e de talco foram testados separadamente quanto à concentração de levedura do microorganismo-alvo, *Saccharomyces cerevisiae* (10^2 UFC/mL; ATCC 201390). Os materiais resultantes foram colocados em um meio de cultura consistindo em placas 3M™ Petrifilm™ de contagem de levedura e bolor (secas, reidratáveis; 3M Company, St. Paul, MN) e incubados durante 5 dias de acordo com as instruções do fabricante. As colônias isoladas de levedura foram contadas manualmente, e a porcentagem de captura foi calculado conforme descrito acima. A porcentagem de captura foi de 97 por cento para o talco-AS e de 82 por cento para o talco (desvio padrão para todas as amostras menor que 10 por cento).

Exemplos 13 a 15

[0067] Amostras de alimentos foram adquiridas em uma mercearia local (Cub Foods, St. Paul). Fatias de peru e suco de maçã (11 g) foram pesados em pratos de

vidro esterilizados e adicionados em bolsas de filtro esterilizadas de polietileno Stomacher™ (Seward Corp, Norfolk, Reino Unido). As amostras de alimentos foram injetadas com culturas bacterianas a uma concentração de 10^2 UFC/mL usando-se uma cultura formada de um dia para o outro durante 18 a 20 horas (estoque) de *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987). Depois disso, foi adicionada uma solução tampão de Butterfield de 99 mL em cada amostra injetada. As amostras resultantes foram misturadas durante um ciclo de 2 minutos em um misturador Stomacher™ 400 Circulator (Seward Corp. Norfolk, Reino Unido). As amostras misturadas foram coletadas em tubos de centrifugação de 50 mL esterilizados (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos para remover resíduos grandes. Os sobrenadantes resultantes foram usados como amostras para testes adicionais. O pH do sobrenadante à base de suco de maçã foi ajustado para 7,2 antes do teste pela adição de 1N de hidróxido de sódio (VWR, West Chester, PA, EUA.). Água potável (100 mL) de um bebedouro foi coletada em uma garrafa de vidro de 250 mL esterilizada (VWR, West Chester, PA, EUA) e inoculada com o microorganismo-alvo *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987) a 10^2 UFC/mL, misturada manualmente de uma extremidade à outra 5 vezes, e incubada à temperatura ambiente (25°C) durante 15 minutos. Essa amostra de água foi usada para testes adicionais.

[0068]Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima, cada 1 mL da amostra de teste preparada conforme descrito acima foi adicionado separadamente em um tubo de ensaio contendo 10 mg de talco-AS e testado quanto à concentração bacteriana do microorganismo-alvo, *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987). Os resultados são mostrados na Tabela 5 abaixo (desvio padrão para todas as amostras menor que 10 por cento).

Tabela 5.

Exemplo n°.	Microorganismo	Agente de concentração	Amostra	Porcentagem de captura
13	<i>Salmonella</i>	Talco-AS	Suco de maçã	86
14	<i>Salmonella</i>	Talco-AS	Peru	78
15	<i>Salmonella</i>	Talco-AS	Água potável	98

Exemplos 16 e 17

[0069]O talco-AS foi testado quanto à concentração do microorganismo-alvo *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987) a partir de amostras de grande volume (300 mg de talco-AS por 30 mL de volume de amostra). Água potável (100 mL) de um bebedouro foi coletada em uma garrafa de vidro de 250 mL esterilizada (VWR, West Chester, PA, EUA) e inoculada com o microorganismo-alvo *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987) a 10^2 UFC/mL. A água inoculada resultante foi completamente misturada manualmente 5 vezes e incubada à temperatura ambiente (25 °C) durante 15 minutos. Amostras de 30 mL da água incubada foram adicionadas em tubos de centrifugação cônicos de polipropileno de 50 mL esterilizados (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 300 mg de talco-AS e foram testadas usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima. O talco-AS decantado resultante foi ressuspenso em 30 mL de solução tampão de Butterfield esterilizada, e 1 mL da suspensão resultante foi colocado em um meio de cultura consistindo em placas 3M™ Petrifilm™ de contagem aeróbica. A porcentagem de captura foi de 98 por cento (desvio padrão menor que 10 por cento).

[0070]11 g de tomates-uva integrais adquiridos em uma mercearia local (Cub Foods, St. Paul) foram colocados em placas de petri esterilizadas e inoculados com o microorganismo-alvo *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica sero-*

var (ATCC 35987) a 10^2 UFC/mL, misturados manualmente agitando-se 5 vezes, e incubados à temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. Os tomates foram adicionados em bolsas de filtro esterilizadas de polietileno Stomacher™ (Seward Corp, Norfolk, Reino Unido) contendo 99 mL da solução tampão de Butterfield. O conteúdo das bolsas foi misturado por agitação durante 1 minuto. Amostras de 30 mL foram adicionadas em tubos de centrifugação cônicos de polipropileno de 50 mL esterilizados (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 300 mg de talco-AS e testadas quanto à concentração bacteriana usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima. As partículas de talco-AS foram decantadas por centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos (Eppendorf, Westbury, NY, EUA). As partículas decantadas foram ressuspensas em 30 mL de solução tampão de Butterfield esterilizada, e 1 mL da suspensão resultante foi colocado em um meio de cultura consistindo em placas 3M™ Petrifilm™ de contagem aeróbica. A porcentagem de captura foi de 99 por cento (desvio padrão menor que 10 por cento).

Exemplos 18 e 19

[0071] 10 mg de talco-AS foram testados quanto à concentração dos endosporos bacterianos-avos *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659). O método de teste de concentração de microorganismos descrito acima foi utilizado com as seguintes modificações: as culturas formadas de um dia para o outro tinham 2×10^2 UFC/mL de *Bacillus atrophaeus* e 7×10^2 UFC/mL de *Bacillus subtilis*, respectivamente; os sobrenadantes resultantes foram colocados em placas não diluídos; o agente de concentração decantado com *Bacillus atrophaeus* ligado foi ressuspenso em 1 mL de solução tampão de Butterfield esterilizada e colocado em placas; e o agente de concentração decantado com *Bacillus subtilis* ligado foi ressuspenso em 5 mL de solução tampão de Butterfield esterilizada e colocado em placas (1 mL cada). As eficiências de captura foram calculadas com base nas contagens dos sobrenadantes em placas, e os resultados são mostrados na Tabela 6 abaixo (desvio padrão para

todas as amostras menor que 10 por cento).

Tabela 6.

Exemplo n°	Microorganismo	Agente de concentração	Porcentagem de captura
18	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Talco-AS	97
19	<i>Bacillus subtilis</i>	Talco-AS	95

Exemplos 20 e 21

[0072] 10 mg de talco-AS foram testados quanto à concentração do vírus não-envelopado infectante de bactérias, bacteriófago MS-2 da *Escherichia coli* (ATCC 15597-B1; que é frequentemente usado como um substituto para vários vírus não-envelopados entéricos que infectam seres humanos). Um método ágar de duas camadas (descrito a seguir) foi utilizado para testar a captura do bacteriófago MS-2 da *Escherichia coli* (ATCC 15597-B1) usando-se bactérias *Escherichia coli* (ATCC 15597) como hospedeiro.

[0073] O estoque de bacteriófago MS-2 de *Escherichia coli* foi diluído dez vezes serialmente em um tampão de adsorção 1X esterilizado (contendo 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂, e 1 mM K₂HPO₄) a um pH de 7,2 para obter duas diluições com 10³ e 10² unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL), respectivamente. Um volume de 1,0 mL da diluição resultante do bacteriófago foi adicionado a um tubo de polipropileno de 5 mL identificado e esterilizado (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 10 mg de agente de concentração e misturado em um misturador de vórtice Thermolyne Maximix Plus™ (Barnstead International, Iowa). O tubo fechado foi incubado à temperatura ambiente (25°C) durante 15 minutos em uma plataforma de vibração Thermolyne Vari Mix™ (Barnstead International, Iowa). Após a incubação, o tubo permaneceu em repouso na bancada do laboratório por 10 minutos para decantar o agente de concentração. Um tubo com a amostra de controle contendo 1,0 mL da diluição do bacteriófago sem agente de con-

centração foi tratado da mesma maneira. O agente de concentração decantado resultante e o sobrenadante (e a amostra de controle) foram então usados para análise.

[0074] 100 microlitros do sobrenadante foram removidos e testados quanto à presença do bacteriófago usando o método ágar de duas camadas descrito a seguir. Um volume adicional de 800 microlitros de sobrenadante foi removido e descartado. Um volume de 100 microlitros do agente de concentração decantado foi também testado quanto à presença do bacteriófago.

Método ágar de duas camadas:

[0075] Uma única colônia de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 15597) foi inoculada em 25 mL de caldo de soja trípico, 3 por cento em peso, esterilizado (Bacto™ Tryptic Soy Broth, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA; preparado de acordo com as instruções do fabricante) e incubada a 37°C em um incubador de agitação (Innova™ 44, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, EUA) ajustado para 250 rotações por minuto (rpm) de um dia para o outro. 750 microlitros dessa cultura formada de um dia para o outro foi usada para inocular 75 mL, 3 por cento em peso, de caldo de soja trípico esterilizado. A cultura resultante foi incubada a 37°C no incubador de agitação ajustado para 250 rpm para obter células de *Escherichia coli* na fase exponencial conforme medido pela absorbância a 550 nm (valores de absorbância 0,3-0,6) usando-se um espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). As células foram incubadas sobre gelo até serem utilizadas para testes.

[0076] Um volume de 100 microlitros com as amostras do teste de bacteriófago descrito acima foi misturado com 75 microlitros das células de *Escherichia coli* incubadas no gelo (bactérias hospedeiras) e incubado à temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos. As amostras resultantes foram misturadas com 5 mL de ágar do topo derretido esterilizado (3 por cento em peso de caldo de soja trípico esterilizado, 1,5 por cento em peso de NaCl, 0,6 por cento em peso de ágar; prepa-

rado naquele dia e mantido em banho-maria a 48°C). A mistura foi, então, derramada no topo do ágar do fundo (3 por cento em peso de caldo de soja trípico, 1,5 por cento em peso de NaCl, 1,2 por cento em peso de ágar) em placas de petri. O componente do ágar derretido da mistura foi deixado solidificar durante 5 minutos, e as placas de petri ou placas foram invertidas e incubadas a 37°C. As placas foram inspecionadas visualmente após a incubação de um dia para outro, e as placas contendo agente de concentração decantado (bem como a placa de controle) mostraram a presença de placas do bacteriófago. As eficiências de captura foram calculadas com base nas contagens dos sobrenadantes em placas e seu valor determinado em 72 por cento para a diluição 10^2 UFP/mL (desvio padrão menor que 10 por cento).

Exemplo 22

[0077]O suco de maçã foi adquirido em uma mercearia local (Cub Foods, St. Paul). O suco de maçã (11 g) foi pesado em um prato de vidro e adicionado a 99 mL de solução tampão de Butterfield em condições estéreis. A combinação resultante foi misturada por movimentação circular durante 1 minuto e foi injetada com duas culturas bacterianas, cada uma a uma concentração de 1 UFC/mL, usando-se culturas formadas de um dia para o outro durante 18-20 horas (estoques bacterianos) de *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987) e *Escherichia coli* (ATCC 51813). As diluições seriais dos estoques bacterianos tinham sido feitas em um tampão de adsorção 1X esterilizado conforme descrito acima.

[0078]Usando-se o método de teste de concentração de microorganismos descrito acima, um volume de 10 mL da amostra de suco de maçã injetada foi adicionado em um tubo de centrifugação cônico de polipropileno de 50 mL esterilizado (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 100 mg de talco-AS e incubado durante 15 minutos para captura/concentração bacteriana do microorganis-

mo-alvo, *salmonela* (na presença de *Escherichia coli*, um microorganismo concorrente). O sobrenadante resultante foi removido, e o agente de concentração decantado foi transferido para outro tubo de 50 mL esterilizado contendo 2 mL de caldo de soja tríptico esterilizado, 3 por cento em peso, (Bacto™ Tryptic Soy Broth, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA; preparado de acordo com as instruções do fabricante). O tubo foi fechado de maneira frouxa, e seu conteúdo foi misturado e incubado a 37°C. Após a incubação de um dia para outro, a mistura do caldo resultante foi testada quanto à presença de *salmonela* usando-se uma tira de teste RapidChek™ de imunoensaio de fluxo lateral de *salmonela* disponível junto à SDI (Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE, EUA). A inspeção visual da tira de teste mostrou a presença de *salmonela*.

[0079]A detecção de ácido nucléico por reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada também para a mistura do caldo contendo *microorganismos*. 1 mL do caldo contendo agente de concentração incubado de um dia para o outro conforme descrito acima, foi testado como amostra de teste quanto à presença de *salmonela* utilizando-se o kit de detecção TaqMan™ ABI de *Salmonella enterica*, disponível junto à Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Como amostra de controle, foi testado também um volume de 1 mL da cultura formada de um dia para o outro durante 18-20 horas (estoque) de *Salmonella enterica*, subespécie *Typhimurium enterica serovar* (ATCC 35987). O teste de PCR foi conduzido em um sistema Stratagene Mx3005P™ QPCR (PCR quantitativo) (Stratagene Corporation, La Jolla, CA, EUA) utilizando-se as seguintes condições de ciclo por ciclo durante 45 ciclos: 25°C durante 30 segundos, 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 15 segundos, e 60°C durante 1 minuto. Foi obtido um valor limite de ciclo médio (n=2) (valor CT) de 17,71 para a amostra de controle. Foi obtido um valor CT médio (n=2) de 19,88 para a amostra de teste contendo agente de concentração, indicando uma reação positiva ao teste de PCR e confirmando a presença de *salmonela*.

[0080]As descrições aqui referidas e contidas nas patentes, documentos de patente e publicações citadas no presente documento estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade como se cada uma fosse incorporada individualmente. Várias modificações e alterações imprevisíveis desta invenção se tornarão evidentes aos versados na técnica sem divergir do escopo e do espírito desta invenção. Deve-se compreender que esta invenção não tenciona ser desnecessariamente limitada pelas modalidades e exemplos ilustrativos aqui apresentados e que tais exemplos e modalidades são apresentados somente a título de exemplo, tendo o escopo da invenção a intenção de ser limitado apenas pelas reivindicações aqui apresentadas da seguinte forma:

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para capturar ou concentrar microorganismos, o processo sendo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende (a) fornecer um agente de concentração que compreende um silicato amorfo esferoidizado de magnésio e que tem uma composição de superfície com uma razão entre átomos de metal e átomos de silício menor que ou igual a 0,5, conforme determinado por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS); (b) fornecer uma amostra que compreende pelo menos uma cepa de microorganismo; e (c) colocar em contato o dito agente de concentração com a dita amostra de modo que ao menos uma porção da dita ao menos uma cepa de microorganismo seja ligada ao ou capturada pelo dito agente de concentração.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito processo compreende adicionalmente a detecção da presença de pelo menos uma cepa de microorganismo ligada.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito agente de concentração é um agente de concentração particulado.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito agente de concentração compreende um silicato amorfo esferoidizado de magnésio sob a forma particulada ao menos parcialmente fundida.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita amostra está na forma de um fluido.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita cepa de microorganismo é selecionada a partir de cepas de bactérias, fungos, leveduras, protozoários, vírus, endosporos bacterianos e combinações dos mesmos.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito contato é realizado através da mistura do dito agente de concentração e

a dita amostra; e/ou em que o dito processo compreende adicionalmente a segregação do agente de concentração resultante ligado ao microorganismo.

8. Kit para capturar ou concentrar microorganismos, o kit sendo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende (a) um agente de concentração que compreende um silicato amorfo esferoidizado de magnésio e que tem uma composição de superfície tendo uma razão entre átomo de metal e átomo de silício menor que ou igual a 0,5, conforme determinado por espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS); (b) um recipiente de teste; e (c) instruções de uso do dito agente de concentração na realização do processo conforme definido na reivindicação 1.