

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
3 de octubre de 2013 (03.10.2013) WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2013/143508 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU2013/000002

(22) Fecha de presentación internacional: 27 de marzo de 2013 (27.03.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad: CU/P/2012/0055  
30 de marzo de 2012 (30.03.2012) CU

(71) Solicitantes: CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS (BIOCEN) [CU/CU]; Carretera de Beltrán, Km 1 ½, Bejucal, Mayabeque, Cuba, Mayabeque 32600 (CU). CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [CU/CU]; Ave. 25 y 158 No. 15202, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba., La Habana 12100 (CU).

(72) Inventores; e

(71) Solicitantes : RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, Claudio [CU/CU]; Calle 16, No.917 e/ 9 y 11, Bejucal, Mayabeque, Cuba, Mayabeque 32600 (CU). GONZÁLEZ RUIZ, Jesús Eduardo [CU/CU]; Gonzalo No259 / Santa Amalia y Arnao, reparto Santa Amalia, Arroyo Naranjo, La Habana 10900 (CU). LOBAINA RODRÍGUEZ, Tamara [CU/CU]; Edificio 4 Apto. 3 Comunidad Científica, Bejucal, Mayabeque, Cuba, Mayabeque 32600 (CU). ZHURBENKO, Raisa [CU/CU]; Edificio 2 Apto. 1, Comunidad Científica, Bejucal, Mayabeque 32600 (CU). BRITO GONZÁLEZ, Ana Iris [CU/CU]; calle 24 No. 1717 A e/ 17 y 19, Bejucal, Mayabeque 32600 (CU). LÓPEZ HERNÁNDEZ, Mónica [CU/CU]; Ave 5ta No 30 / 10 y 13, reparto Eduardo Chivás, Guanabacoa, La Habana, Cuba., La Habana 11100 (CU). ARAGÓN FERNÁNDEZ, Javier [CU/CU]; Ataré No460 / Pérez y

Rodríguez, Reparto Luyanó, Diez de Octubre, La Habana, Cuba, La Habana 10700 (CU). ALFONSO VALDÉS, Ivonne [CU/CU]; Calle 12 No. 907 e/ 9 y 11, Bejucal, Mayabeque, Cuba, Mayabeque 32600 (CU). ORTEGA SURÍS, Adelaida [CU/CU]; Calle 27 B No. 101, Edificio 23 207 A Apto: 57 e/ 232 y 234, Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba., La Habana 17100 (CU).

(74) Mandatario: VÁZQUEZ D' ALVARÉ, Dánice; Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10, Miramar, Playa, La Habana. Cuba, La Habana 11300 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION, RECOVERY, IDENTIFICATION AND COUNTING OF MICROORGANISMS AND DEVICES FOR THE IMPLEMENTATION OF SAID METHOD

(54) Título : MÉTODO PARA LA DETECCIÓN, RECUPERACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y ENUMERACIÓN SIMULTÁNEA DE MICROORGANISMOS Y DISPOSITIVOS PARA SU EJECUCIÓN

(57) Abstract: The present invention describes a method and devices for the simultaneous detection, recovery, identification and counting of a plurality of microorganisms consisting in providing mixtures of nutrients specially selected from those that curtail the lag phase of growth in bacteria and moulds and which, together with fluorescent enzymatic, chromogenic or bioluminescent markers and other nutrient components or growth inhibitors, are embedded in three-dimensional structures or natural or artificial clays or ceramics with cavities of different dimensions and forms and specific surface areas of between  $2 \times 10^3$  and  $6 \times 10^8$  m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.

(57) Resumen: La presente invención describe un método y dispositivos para la detección, recuperación, identificación y enumeración simultánea de una pluralidad de microorganismos consistente en proveer mezclas de sustancias nutritivas especialmente seleccionadas entre aquellas que acortan la fase lag de crecimiento de bacterias y mohos y que, conjuntamente con marcadores enzimáticos fluorescentes, cromogénicos o bioluminiscentes y otros componentes nutritivos o inhibidores del crecimiento, son embebidos en estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales o artificiales con cavidades de diferentes dimensiones y formas y superficies específicas entre  $2 \times 10^3$  y  $6 \times 10^8$  m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.



WO 2013/143508 A2

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN, RECUPERACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y  
ENUMERACIÓN SIMULTÁNEA DE MICROORGANISMOS Y DISPOSITIVOS  
PARA SU EJECUCIÓN

5 La presente invención se relaciona con el campo de la microbiología y más específicamente con la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes y muestras.

Se conoce una número significativo de medios y métodos convencionales de cultivo para la detección e identificación de microorganismos, cuyas principales  
10 desventajas consisten en un período prolongado de incubación de las muestras (mínimo 18-24 h), engorrosa manipulación al emplear diferentes medios para aislar, enriquecer e identificar las bacterias y levaduras.

Algunas soluciones se han brindado para reducir el tiempo de identificación, como el empleo de medios con sustratos cromogénicos y fluorogénicos, que resultan  
15 igualmente muy demorados para las necesidades, en términos de inmediatez, en la identificación.

El empleo de materiales cerámicos, incluyendo los nanoestructurados ha estado dirigido fundamentalmente a la concentración de los microorganismos en las muestras para su posterior identificación y a la detección o la identificación con  
20 anticuerpos monoclonales o fragmentos de estructuras genéticas acopladas a nanoestructuras (Integration of hydroxyapatite concentration of bacteria and seminested PCR to enhance detection of *Salmonella typhimurium* from ground beef and bovine carcass sponge samples. Elaine D. Berry and Gregory R. Siragusa. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service2.  
25 Roman L. Hruska U.S. Meat Animal Research CenterClay Center, NE 68933-0166. Accepted for Publication February 15, 1999), (Method of manufacturing hydroxyapatite and uses therefor in delivery of nucleic acids. United States Patent Application US20080095820).

Por otra parte, las nanopartículas de silicatos se han empleado, por el contrario,  
30 para inhibir el crecimiento microbiano (Composition comprising aluminum silicates and silver nanoparticles as bactericides. WIPO patent application WO/2011/128488).

En la patente de Estados Unidos US6596505 B2 del 2003 Ceri y colaboradores, propusieron un aparato y métodos para ensayar el efecto de materiales y de las  
35 superficies en la formación de biofilmes. El método comprende el empleo de

hidroxiapatita y medios de cultivo para formar biofilmes y la posterior identificación de las características de esos microorganismos. El método no prevé la identificación en un solo paso y requiere de aditamentos para la formación de biofilmes, y para fines de identificación no es muy adecuado, ya que se conoce  
5 que las características metabólicas de los microorganismos y su resistencia a los antimicrobianos varía al formarse los biofilmes.

En la invención de Hatzmann M.J. y colaboradores (WO 2009/067012 A2) se reivindica un método para detectar microorganismos en diferentes materiales líquidos, y prevé la concentración del microorganismo en un dispositivo tipo filtro,  
10 conectado a otros aparatos y cuyo filtro está conformado por una estructura de hidroxiapatita, un medio de cultivo y sustratos cromogénicos y fluorogénicos. Las principales limitaciones del método consisten en que se necesita de una fase de concentración de la muestra para poder detectar la contaminación, que solo se aplica a muestras líquidas y necesita de otro equipamiento y que la respuesta de  
15 identificación no es rápida ni exacta para muchos microorganismos, ya que se basa en la detección de las actividades glucuronidasa o galactosidasa.

En resumen, las deficiencias de los métodos descritos con anterioridad en la bibliografía científica y en los documentos de patentes consisten en:

- no todos los microorganismos se adhieren a las estructuras de las nano  
20 estructuras (como ejemplo *E. coli* O157:H7), ni todos los que se adhieren pueden ser recuperados en un tiempo razonable para su futura identificación;
- la adhesión de los microorganismos depende de su concentración en la muestra; a menor concentración, menor adhesión;
- 25 - en la mayoría de los métodos es necesario la separación de los microorganismos de las estructuras para su posterior identificación, lo que requiere de pasos adicionales tales como la centrifugación que implica el uso de equipos adicionales y expone a los microorganismos recuperados a la contaminación ambiental o a utilizar centrifugas bajo condiciones de  
30 asepsia;
- las invenciones que prevén esta fase adicional, requieren de medios de cultivo para aislar los microorganismos para su identificación posterior por diferentes métodos inmunoenzimáticos o por otras técnicas moleculares;
- los métodos protegidos por las invenciones, descritas hasta el momento,  
35 basan la identificación en mecanismos de detección con anticuerpos

monoclonales que son muy sensibles a las temperaturas y tienen corta vida útil; o utilizan técnicas de detección de fragmentos de AND o ARN, que requieren de equipos adicionales de elevado costo para laboratorios pequeños o de escasos recursos;

- 5
- no se promueve realmente el crecimiento acelerado de los microorganismos, por tanto, a concentraciones muy bajas, se dificulta la identificación e incluso no se detecta, o se requiere filtrar grandes volúmenes de muestra para la detección de esas bajas concentraciones;
  - en las escasas invenciones que prevén el contacto de los microorganismos
- 10
- con las nano- o micro- estructuras y con medios de cultivo, éstos últimos no son seleccionados especialmente por su capacidad de promover rápidamente su crecimiento, y por tanto a bajas concentraciones no son detectados o su detección es tardía con respecto a las necesidades del diagnóstico;
- 15
- las bases nutritivas existentes en mercados internacionales seleccionadas para emplearse en los medios de cultivo no son capaces de promover la formación de enzimas y multiplicar la biomasa en un tiempo reducido, pues no logran reducir la fase lag de crecimiento microbiano;
  - en una misma estructura basada materiales nanoporosos o conformadas
- 20
- por nanopartículas agregadas, no se detectan al unísono una amplia variedad de microorganismos, tales como levaduras, hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, microbacterias y nanobacterias;
  - la mayoría de los métodos patentados requiere que la muestra se aplique
- 25
- en estado líquido y, además, que se concentre por filtración, y no comprende la recuperación de microorganismos suspendidos en aire y otros gases o en muestras sólidas;
  - algunas de las arcillas naturales, como la zeolita, el caolín y otras, por su propia composición mineral, resultan inhibitorias por sí mismas para la mayoría de los microorganismos, por lo que no se utilizan para la
- 30
- promoción del crecimiento, sino para su inhibición;
  - ninguno de los métodos, hasta ahora divulgados, garantiza una sencilla, rápida y simultánea recuperación, detección e identificación de una pluralidad de microorganismos que pueden encontrarse en concentraciones tan bajas como 1 UFC/tamaño de muestra y en un
- 35
- período de tiempo reducido.

El objetivo de la presente invención consiste en proveer un nuevo método para la detección, recuperación, identificación y enumeración simultánea de una pluralidad de microorganismos en diferentes muestras y los dispositivos para su ejecución.

La novedad de la presente invención consiste en que:

- el método prevé la promoción intensa y acelerada de la formación de estructuras celulares y enzimas por una combinación de efectos antes no descrita, ni en la literatura científica, ni en los documentos de patentes. Estos efectos se logran en esencia: a) mediante el uso de composiciones nutritivas especialmente producidas por métodos originales que acortan la fase lag de crecimiento y promueven la fase de aceleración del crecimiento; b) la aceleración de los procesos enzimáticos de degradación de sustratos indicadores por el aporte de iones que pueden contener las estructuras tridimensionales de las arcillas o cerámicas; c) el efecto mecánico de adhesión de las estructuras arcillosas o cerámicas que poseen combinaciones de cavidades de diferentes tamaños, los cuales atrapan, retienen o albergan a microorganismos de las más disímiles tallas, desde nanómetros hasta colonias de varios centímetros o estructuras filamentosas de hongos, hifas o esporas y/o otros propágulos; d) el efecto de multiplicación de la muy elevada superficie de contacto que brindan las nano- y micro- estructuras que incrementa significativamente la velocidad de degradación enzimática en una fase sólida; e) el efecto de las cargas que puedan aportar los iones en la superficie de las estructuras tridimensionales, incluyendo las arcillosas, o de los ingredientes de las composiciones nutritivas que pueden incrementar la adhesión de las células; y en general, al contrario de las anteriores soluciones, no se basa en la recuperación, detección e identificación de los microorganismos solamente en la adhesión a las estructuras (concentración);
- por primera vez se logra emplear arcillas o cerámicas que, de manera natural, presentan actividad bactericida, fungicida o bacteriostática, tales como la zeolita, bentonita, caolinita, entre otras, sin la necesidad de una modificación química para la promoción de crecimiento microbiano, debido a que este efecto inhibitor provocado por la presencia natural en ellas de

- iones "tóxicos" para los microorganismos es eliminado gracias a la absorción o adsorción de las mezclas nutritivas que son diseñadas especialmente para cada tipo de muestra y cada estructura tridimensional. Las aplicaciones anteriores de estas arcillas han estado dirigidas a la eliminación de las bacterias;
- 5
- no existen soluciones anteriores que combinen la promoción de crecimiento sobre arcillas naturales o artificiales con los sustratos, pues en las soluciones anteriores que emplean los sustratos cromogénicos y fluorogénicos la identificación se ejecuta sólo sobre la base exclusiva de la acción de dichos sustratos en presencia de elevadas concentraciones de células y por otra parte las soluciones anteriores para promover el crecimiento de hongos o bacterias en arcillas o cerámicas, no tienen como propósito la identificación, sino el incremento de la concentración de células;
  - 10
  - por primera vez, se combina el empleo de una diversidad de arcillas o cerámicas naturales o artificiales en un mismo y único método de ensayo o en un dispositivo individual o compuesto, aportando cada uno diferentes iones que actúan selectivamente como catalizadores de reacciones enzimáticas específicas de una especie, género o grupo de microorganismos y que, conjuntamente con los nutrientes y factores de crecimiento que aportan las formulaciones nutritivas escogidas especialmente por promover un período corto de la fase lag y acelerar el crecimiento microbiano e, inesperadamente posibilitaron la detección, recuperación, identificación y/o enumeración de una pluralidad de microorganismos por separado o dentro de una misma muestra en un tiempo tan reducido como 60-90 min, antes no alcanzado para los métodos cromogénicos o fluorogénicos de identificación microbiana;
  - 15
  - 20
  - 25
  - sorprendentemente, algunos microorganismos, tales como determinadas especies de *Pseudomonas* mostraron características que comúnmente no muestran en determinados medios, por ejemplo, al emplear la tierra silíceo con la composición nutritiva *Pseudomonas* desarrolló fluorescencia en tan sólo 120 min, cuando en los medios de cultivo ensayados que contienen este compuesto, la fluorescencia aparece sólo después de las 18 h;
  - 30
  - inesperadamente se detectó, por primera vez, que al disminuir la talla de las cavidades y en especial de los poros en las estructuras tridimensionales
  - 35

- de los dispositivos ensayados, y por tanto al aumentar la superficie de contacto y la disponibilidad de cargas superficiales, se aceleraba la reacción enzimática de degradación de los sustratos y se detectaban las bacterias al menos con 60 min de antelación en comparación con las mismas estructuras que contenían la misma composición nutricional y para el mismo microorganismo, pero con mayores tallas de las cavidades;
- 5
- en las variantes del método que prevén el empleo de estructuras tridimensionales con formulaciones nutritivas, sustratos indicadores específicos y antimicrobianos en diferentes combinaciones paralelas como parte de los dispositivos, se logra determinar la sensibilidad a los antimicrobianos conjuntamente con la identificación de los microorganismos en un solo paso;
  - por primera vez se combinan en un dispositivo y como parte de un método los hidrolizados enzimáticos de alga *Spirulina platensis*; hidrolizados enzimáticos de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Torula*; extracto de *Ipomoea batatas*; extracto de tomate; hidrolizado papaínico de tejido de corazón de res y de sangre bovina; hidrolizados enzimáticos de lactoalbúmina de suero de queso; hidrolizados enzimáticos o ácidos de caseína de suero de mantequilla e hidrolizado o autolizado de *Eudrillus eugeniae* con las estructuras tridimensionales naturales o artificiales que inesperadamente acortaron el período de la fase lag de los microorganismos;
  - en una misma etapa de detección del método se pueden eliminar los contaminantes de la muestra, tales como los sólidos en suspensión en las aguas que interfieren en la identificación y cuantificación microbiana;
  - se logra un dispositivo extremadamente versátil que en forma de una unidad o de varias unidades combinadas, posibilita la ejecución de la detección, recuperación, identificación y/o recuento de los más disímiles microorganismos en diferentes tipos de muestras, desde gaseosas, líquidas, sólidas, geles, zoles, con niveles de contaminación desde menos de 1 UFC/unidad de muestra hasta  $10^9$  UFC/unidad de muestra, sin interferencia de contaminantes de las muestras.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

Las ventajas del método y del dispositivo consisten en:

- todos los microorganismos viables pueden ser detectados, recuperados e identificados y/o enumerados al unísono ya que los principios del método garantizan todas las condiciones para ello;
- 5 - el método y los dispositivos propuestos logran la detección de todos los microorganismos y/o su recuperación, se adhieran o no a la estructura, a diferencia de las soluciones anteriores a la presente invención, que no garantizan que todos los microorganismos se adhieren a las nanoestructuras nano (como ejemplo *E. coli* O157:H7), ni que todos los
- 10 que se adhieren pueden ser recuperados en un tiempo razonable para su futura identificación;
- como el presente método no se basa esencialmente, ni solamente, en la adhesión de los microorganismos viables a las estructuras del dispositivo, se detectan todos los microorganismos presentes en la muestra, incluso a
- 15 bajas concentraciones o a partir de sus esporas, hifas u otros propágulos, y esto se logra a diferencia de los métodos anteriores, en los cuales la adhesión de los microorganismos depende de su concentración en la muestra (a menor concentración, menor adhesión);
- el método previsto en la presente invención posibilita la detección,
- 20 recuperación, identificación y/o enumeración, independientemente de las características originales de las estructuras, sus iones o su pH, a diferencia de algunas de las patentes ya descritas, en la cuales, la adhesión de microorganismos a las estructuras para su concentración y posterior
- 25 identificación se ejecuta por la actividad de los iones en las superficies de las estructuras que interactúan con las células microbianas, de forma tal, que si la muestra que porta los microorganismos contiene sustancias que interfieran o atrapen estos iones, o si su pH los afecta, no se logra la correcta detección, identificación o cuantificación oportuna;
- la invención propuesta no necesita de pasos secundarios de identificación,
- 30 o concentración de la muestra, o condiciones especiales de asepsia, ni obligatoriamente de equipos y así se diferencia de las descripciones anteriores, que en su gran mayoría necesitan de la separación de los microorganismos de las estructuras para su posterior identificación, lo que incluye pasos adicionales como la centrifugación, requiere de equipos
- 35 adicionales (centrífugas) y expone a los microorganismos recuperados a la

- contaminación ambiental o a utilizar centrifugas bajo condiciones de asepsia;
- el nuevo método es sencillo, de bajo costo, la identificación no es demorada y no requiere de técnicas de alta tecnología adicionales, por el contrario de otras invenciones divulgadas que prevén una o varias fases adicionales, requieren de medios de cultivo independientes de las estructuras para aislar los microorganismos para su posterior identificación por diferentes métodos, incluyendo los inmunoenzimáticos o por otras técnicas moleculares que demoran la identificación, la encarecen y complejizan técnicamente;
  - el método descrito en la solicitud de patente se ejecuta con seguridad y bajo disímiles condiciones de laboratorio, ambientales y tiene elevada estabilidad, ya que los reactivos y formulaciones o composiciones nutritivas, una vez embebidas en las estructuras tridimensionales de los dispositivos son muy estables a la temperatura y humedad ambientales del laboratorio, lo que marca diferencias significativas con métodos y dispositivos relacionados con anterioridad en la bibliografía científica y de patentes, pues en ellos, por lo general, la identificación se basa en mecanismos de detección con anticuerpos monoclonales que son muy sensibles a las temperaturas y tienen corta vida útil; o utilizan técnicas de detección de fragmentos de AND o ARN, que requieren de equipos adicionales de elevado costo para laboratorios pequeños o de escasos recursos;
  - el método es muy estable para su ejecución permitiendo ejecutar cada paso con intervalos prolongados de tiempo entre ellos en los casos que se requiera pues, como ya se mencionó, las formulaciones nutritivas, al ser absorbidas en las estructuras tridimensionales con nano- y micro-cavidades y después de eliminado el solvente, conformando los dispositivos son muy estables a los cambios de temperatura y humedad y por tanto pueden ser empleadas con seguridad por largos períodos de tiempo. Este efecto se debe a que los sólidos de la formulación nutritiva poseen baja humedad y la humedad residual está sometida a fuerzas de adsorción de las superficies de las cavidades que conforman el dispositivo y por tanto no está disponible para las reacciones de degradación

bioquímica o biológica, hasta que se adicione el segundo solvente o la muestra;

- 5 - la presente invención describe un método con un límite de detección por unidad de muestra de las composiciones nutritivas que se emplean muy bajo (inferior a 1 UFC), lo que significa que las mismas pueden detectar y recuperar las especies microbianas a muy bajas concentraciones y la identificación y/o enumeración se facilita y a diferencia de los procedimientos divulgados en el estado del arte, no necesita de grandes volúmenes de muestra, ni altas concentraciones de inóculo;
- 10 - bajas concentraciones (menos de 1 UFC/unidad de muestra) de microorganismos de diferentes especies, géneros, grupos y tallas son detectadas al unísono por el presente método gracias al contacto de los nutrientes y los sustratos marcadores especialmente seleccionados para diferentes estructuras tridimensionales de diferentes características; esto se ejecuta contrariamente a lo antes concebido por otros autores que no seleccionan dichos nutrientes especialmente por su capacidad de promover rápidamente el crecimiento en condiciones específicas de las estructuras y las características de los microorganismos a detectar y por tanto, a bajas concentraciones, algunos no son detectados, o su detección es tardía con respecto a las necesidades del diagnóstico;
- 15 - en una misma estructura o dispositivo se detecta al unísono una amplia variedad de microorganismos, tales como levaduras, hongos filamentosos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, microbacterias y nanobacterias, efecto antes no logrado por otros proceder;
- 20 - con la invención descrita en este documento se posibilita, con una misma combinación de estructura-compuesto nutritivo-marcadores enzimáticos detectar, recuperar, identificar y/o enumerar los microorganismos suspendidos en gases, por ejemplo en el aire, en líquidos, o en muestras sólidas, diferenciándose marcadamente de los procedimientos tradicionales que utilizan utensilios, soportes, componentes, medios de cultivo diferentes según el tipo de muestra a tratar, como en el caso de análisis de muestras líquidas en el que se emplean medios especiales y membranas filtrantes de acetato o nitrato de celulosa y, sin embargo, para muestras sólidas, estas membranas no se emplean, los medios tienen variaciones en su fórmula e incluso el tamaño de la placa es diferente;
- 25 -
- 30 -
- 35 -

- 5 - según la presente invención, se pueden emplear sin limitaciones todas las arcillas o cerámicas naturales y fosfatos de calcio, pues ellas, en los dispositivos, se combinan con composiciones nutritivas y otros componentes que neutralizan el efecto inhibitorio que pueden presentar algunos iones que contienen, por ejemplo, la zeolita, la caolinita o la bentonita, por sólo citar 3 ejemplos; marcando una gran diferencia con el empleo de estas arcillas previsto en soluciones anteriores, en las que se prevé su uso como antibacterianos;
- 10 - para los propósitos del presente método (detección, recuperación, identificación y/o enumeración) se pueden emplear, para ejecutar el método y conformar los dispositivos, arcillas naturales que originalmente presentan actividades bactericida, fungicida o bacteriostática, sin los gastos adicionales de purificación o modificación química para la promoción de crecimiento microbiano, gracias a su combinación con otros componentes descritos en el párrafo anterior;
- 15 - el método posibilita determinar la sensibilidad o resistencia a los antimicrobianos al unísono con su identificación en un período de tiempo muy reducido y para cualquier especie, género o grupo de microorganismos presente en la muestra, gracias a la combinación de diferentes estructuras tridimensionales, con diferentes composiciones nutritivas, marcadores enzimáticos y con los antimicrobianos seleccionados;
- 20 - el nuevo dispositivo es sencillo, de bajo costo, de fácil preparación para su fabricación.

25

A continuación se ofrece la descripción detallada de la invención.

Los componentes nutritivos de la presente invención son seleccionados entre las mezclas de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales degradadas por métodos químicos o enzimáticos. Una o varias de estas mezclas nutritivas estimuladoras del crecimiento microbiano, preparadas en soluciones acuosas o en soluciones con sales en concentraciones de 0,1 a 3 g/l, se inoculan con 0,1 ml del o de los microorganismos posibles a detectar, recuperar, identificar o enumerar a concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml y se incuban a la temperatura y tensión de oxígeno deseados, midiendo la cinética de crecimiento microbiano por cualesquiera de los métodos conocidos, preferiblemente determinando el

35

incremento de la densidad óptica en el tiempo. Se selecciona aquella o aquellas composiciones que garantizan una reducción de la fase lag de crecimiento que no supere los 60-120 min para las bacterias y 16 h para las levaduras y hongos filamentosos.

5 Ejemplos de los componentes nutritivos son los hidrolizados enzimáticos de alga *Spirulina platensis* descrito en el Certificado de Autor de Invención de Cuba 22310; extracto de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido por hidrólisis enzimática según se describe en el Certificado de Autor de Invención de Cuba 22221 e hidrolizado enzimático de levadura forrajera de *Torula* (Certificado de Autor de  
10 Invención de Cuba 22280); extracto de *Ipomoea batatas*, según se divulga en la patente de Cuba 23507; extracto de tomate (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22308); hidrolizados enzimáticos de tejido de corazón de res (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22442), de sangre bovina (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22208) y de hígado de res (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22220); hidrolizados enzimáticos de lactoalbúmina obtenida de suero de  
15 queso (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22219), hidrolizados enzimáticos o ácidos de caseína de suero de mantequilla (Certificados de Autor de Invención de Cuba 22166 y 22089, respectivamente) e hidrolizado o autolizado de *Eudrillus eugeniae* (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22381). Las  
20 composiciones seleccionadas se disuelven o suspenden en un primer solvente en cantidades de 1 a 50 g/l.

A ellos se pueden incorporar, además, otros hidrolizados enzimáticos, hidrolizados químicos, tales como peptonas y triptonas o extractos comerciales de proteínas de algas, de microorganismos, partes vegetales, tejidos animales  
25 superiores y sus combinaciones, como ejemplo los obtenidos a partir de carne de res, de cerebro, de papa, entre otros, en cantidades de 1 a 10 g/l.

Una vez preparada la composición, a ésta se le adiciona uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes en cantidades de 0,01 a 2 g/l. Ejemplos de estos marcadores pueden ser: los compuestos  
30 derivados del fenol, tales como orto- y para- nitrofenoles, para-nitro-anilina, indolil derivados: 5-bromo-4-cloro-3-indolil, 5-bromo-6-cloro-3-indolil (magenta), 6-cloro-3-indolil (salmón), los derivados de la metilcoumarina y del metilumbeliferil (MUG) para detectar actividades galactosidasa, glucuronidasa, decarboxilasa, glucosidasa, fosfatasa, entre otras.

A la mezcla de las composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos se le pueden adicionar otras sustancias, tales como promotores o inhibidores de microorganismos pertenecientes a determinados géneros, especies o grupos. Ejemplos de estas sustancias pueden ser las vitaminas, sales minerales, albúmina, antibióticos, colorantes, tintes, sales biliares, bilis de buey, azúcares, aminoácidos. Igualmente se pueden adicionar otras sustancias que aumenten la solubilidad de los marcadores enzimáticos o la permeabilidad de las células de los microorganismos en cantidades de 0,01 hasta 40 g/l.

Si se pretende determinar la sensibilidad a los antimicrobianos y antifúngicos, o a las soluciones de limpieza o desinfección, o para comprobar el efecto bactericida o bacteriostático en particular de alguna sustancia o producto, a la composición nutritiva seleccionada se le puede adicionar, además, sales, resinas, extractos naturales de plantas, ácidos grasos, ésteres, bactericidas, bacteriostáticos, alcoholes, sustancias con actividad de superficie o sus mezclas en cantidades de 0,01 a 2 g/l y/o antibióticos o antifúngicos en cantidades de 10 a 100 µg/l.

La composición nutritiva seleccionada, conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes, se disuelve o dispersa en un primer solvente en cantidades de 1 a 150 g/l.

El solvente puede ser el agua destilada o desionizada, soluciones acuosas de sales (NaCl, soluciones de fosfato, entre otras), alcoholes y soluciones alcohólicas (ejemplo solución de fucsina básica al 10 % p/v en alcohol etílico), soluciones de sustancias que aumenten la solubilidad de los marcadores enzimáticos [ejemplo de dimetilsulfóxido (DMSO)] o la permeabilidad de las células de los microorganismos.

Conformada la mezcla nutritiva y conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes disueltos o suspendidos en el primer solvente, se pueden esterilizar por cualquiera de los métodos conocidos, a excepción de aquellas composiciones que contienen sustancias termolábiles, que no deben ser esterilizadas por calor.

Una vez conformada la mezcla nutritiva y conjuntamente con los marcadores enzimáticos y disueltos o suspendidos en el primer solvente y demás componentes, éstos se ponen en contacto con una o varias estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales o artificiales o de otras cerámicas.

Estas estructuras tridimensionales pueden previamente someterse a esterilización por cualquiera de los métodos conocidos.

El tiempo de contacto de la composición nutritiva y demás componentes disueltos o suspendidos en el primer solvente y la estructura tridimensional de arcilla o cerámica varía, por lo general, desde 10 min para las tallas menores de tamaño nanométrico o submicrométrico ( $< 1000$  nm) hasta 60 min para las estructuras de mayor tamaño.

Estas estructuras cuentan con una superficie específica de  $2 \times 10^3$  a  $6 \times 10^8$   $m^2/m^3$  y están conformadas por una pluralidad de nano-, micro- y macro-cavidades o sus combinaciones.

Estas arcillas y/o cerámicas naturales o artificiales son seleccionadas entre la caolinita, halloisita, dickita, nacrita, crisolita, antigorita, lizardita, vermiculita, mica, hectorita, saponita, hidrotalcita, muscovita, clorita, la tierra de diatomea, bentonitas (montmorillonita, sauconita, beidellinita, nontrolita) clinoptilolitas, hidroxapatitas, zeolitas y fosfatos de calcio o sus combinaciones.

Las estructuras de fosfato de calcio mencionadas en el párrafo anterior son seleccionadas entre: metafosfato  $[Ca(PO_3)_2]$ , fosfato monocálcico mono-hidratado  $[Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O]$ , di-hidrógeno fosfato tetracálcico  $(Ca_4H_2P_6O_{20})$ , fosfato heptacálcico  $[Ca_7(P_5O_{16})_2]$ , pirofosfato de calcio  $(Ca_2P_2O_7$  y  $Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O)$ , fosfato dicálcico  $[CaHPO_4$ ,  $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$  y  $Ca(H_2PO_4)_2]$ , tricálcico  $[Ca_3(PO_4)_2]$ , fosfato octacálcico  $[Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O]$ , hidroxapatita deficiente en calcio  $[Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}]$ , hidroxapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , fosfato tetracálcico  $[Ca_4O(PO_4)_2]$ , apatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH,F,Cl,Br)_2]$ , carbonatoapatita  $[Ca_5(PO_4,CO_3)_3(OH,F)]$  o mezcla de ellas.

Las arcillas y/o cerámicas naturales o artificiales y los fosfatos de calcio pueden poseer sustituciones isomórficas de los iones por cationes o previamente funcionalizadas con diferentes iones, preferiblemente monovalentes, divalentes, trivalentes o tetravalentes, que actúan como catalizadores enzimáticos, tales como Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, formando capas superficiales o distribuidas en toda su estructura.

Las estructuras tridimensionales mencionadas son seleccionadas entre aquellas cuyas dimensiones de las cavidades responden a:

- nano- cavidades o partículas, preferiblemente de superficies rugosas, con diámetros u holguras de hasta 200 nm para nano- y micro- bacterias;

- nano- y submicro- cavidades con diámetros u holguras de 5 nm a 1000 nm para bacterias de diferentes tallas;
- micro- cavidades con diámetros u holguras de 1  $\mu$ m a 1000  $\mu$ m para bacterias y células de levaduras;
- 5 - micro- y macro- cavidades con diámetros u holguras de más de 1  $\mu$ m y hasta 2 mm para bacterias, levaduras y hongos filamentosos;
- combinaciones con todos los diámetros u holguras de las cavidades desde nano- hasta macro- de 2 mm para la pluralidad de microorganismos.

Las cavidades en la estructura pueden presentarse en forma de poros, canales, 10 tubos, bolsas regulares o irregulares, de diferentes formas geométricas o sus combinaciones; o se disponen en forma de capas o láminas.

Las estructuras tridimensionales puede conformar una película o capa de 5 nm a 1 mm de espesor en especial cuando se emplean para la detección, identificación o enumeración de microorganismos por la técnica de filtración por membrana o 15 para la detección de microorganismos en superficies; o una columna de hasta 10 cm de altura, en especial, cuando se requiere filtrar grandes volúmenes de líquido o suspensión de microorganismos que pueden encontrarse a bajas concentraciones, o cuando se emplean varias zonas de la estructura con diferentes marcadores enzimáticos o con diferentes mezclas nutritivas.

20 Las estructuras pueden también emplearse en forma de esferas o perlas de diámetro de 5 nm a 10 mm; hexágonos o cubos en especial, formando parte de un conjunto de pruebas con diferentes composiciones, o pueden ser adicionadas a la muestra líquida o suspensión que contiene los microorganismos.

Se puede utilizar otras estructuras en forma de cilindros o tubos desde un 25 diámetro muy pequeño de 5 nm para pequeñas alícuotas, uniendo varios de esos tubos para conformar un conjunto de ellos hasta 10 cm de diámetro que simulan el diámetro de una placa de Petri para aquellos exámenes previstos en normas para recuentos que requieren de esa superficie.

La altura de las estructuras varía según el formato de presentación a emplear en 30 el método y va desde los 5 nm para las nanoalícuotas, o microalícuotas, o para la unión de varias estructuras en un conjunto de capas tipo *sandwich*, hasta 10 cm de altura.

Las estructuras tridimensionales pueden presentarse en formas de fibras o redes que retienen los microorganismos y permiten su detección.

Cuando se desea que las estructuras detecten e identifiquen los microorganismos en todo el volumen de una muestra, se utilizan aquellas arcillas de gran capacidad de hinchazón, hasta que, de manera natural o mediante la adición de gelificantes, adopten la forma del recipiente que la contenga.

5 Las estructuras tridimensionales de la presente invención pueden presentar diferentes zonas con distintas porosidades y diferentes diámetros u holguras de las nano-, micro- y macro- cavidades a través de su volumen, o de su longitud, o de su diámetro, distribuyendo dichas zonas en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.

10 A las estructuras tridimensionales, se les puede adicionar diferentes composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos en cada zona, tanto a través de su estructura, longitud o de su diámetro, distribuyéndose en este caso en zonas concéntricas. La distribución de las composiciones, o la concentración de uno, o varios de sus componentes se puede garantizar en forma de gradiente  
15 continuo o discontinuo.

A las estructuras, se le pueden adicionar sustancias que coadyuvan la fijación de la composición nutritiva y los marcadores enzimáticos seleccionados y otros componentes en aquellos casos en que se sospeche que el fluido de la muestra pueda arrastrar dicha composición. Entre estas sustancias se pueden emplear los  
20 alginatos, como el de sodio; polisacáridos naturales, tales como derivados de la pectina y de la quitina; goma arábica y otras gomas; almidones, como los de maíz y de boniato, o almidones pre-gelatinizados; la dextrana y la carboximetilcelulosa y otros polímeros derivados de ellos; carragenina o el carragenato de sodio; el agar; la agarosa y polímeros artificiales derivados;  
25 derivados del alcohol vinílico, del polibutileno, polietileno y polipropileno; y la polivinilpirrolidona de diferentes pesos moleculares en cantidades de 0,01 a 0,5 g/g de estructura tridimensional.

A la estructura tridimensional, en el caso de que su superficie específica sea menor de 500 m<sup>2</sup>/g, se le puede adicionar sustancias que aumentan su capacidad  
30 de absorción, tales como el carbón activado y la celulosa en cantidades de 2 a 4 mg/g, por ejemplo en forma de láminas.

Al concluir la etapa de absorción, se elimina el primer solvente. El procedimiento más recomendado es a temperatura ambiente y presión atmosférica con circulación forzada de aire para preservar los nutrientes y evitar su degradación,  
35 como el caso de las vitaminas termolábiles.

La eliminación del primer solvente puede ser ejecutada también sometiendo la estructura tridimensional a secado a temperatura de 25 a 110 °C a presión atmosférica o a presión menor que la atmosférica, por ejemplo en horno de vacío, por un período de 30 min a 3 h o eliminándolo por sublimación, o por secado por  
5 aspersion a temperatura de 90 a 180 °C.

Después de la eliminación del primer solvente, se puede conservar la estructura hasta el momento del ensayos por períodos de hasta 5 años. Se recomienda esterilizar las estructuras con las composiciones embebidas, preferiblemente, pero no exclusivamente por irradiación de diferente naturaleza. Otros métodos se  
10 pueden utilizar, como la esterilización en autoclave, para aquellas estructuras que no contienen componentes termolábiles.

Se comprueba la capacidad de recuperar los microorganismos diana seleccionando aquellas estructuras que poseen un límite de detección de menos de 1 UFC/10 l para las muestras líquidas, menos de 1 UFC/250 g para las  
15 muestras sólidas o menos de 1 UFC/10 m<sup>3</sup> de aire y un límite máximo de hasta 10<sup>9</sup> UFC/ml ó 10<sup>9</sup> UFC/g ó 10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup>.

Antes de comenzar el ensayo, se puede colocar la estructura tridimensional sobre soportes en forma de láminas, capas o cilindros permeables a gases o líquidos o impermeables a los mismos; o rodeadas por materiales impermeables en al  
20 menos el 90 % de su superficie.

Con posterioridad, se ponen en contacto las células microbianas que pueden estar conformadas por una pluralidad de los microorganismos a detectar, recuperar, identificar y/o enumerar pertenecientes a una especie, un género, un grupo o combinaciones de ellas, e incluye a las nanobacterias, bacterias, mohos y  
25 levaduras y las esporas, hifas u otros propágulos, con las estructuras tridimensionales en presencia de un segundo solvente.

Este segundo solvente puede ser el agua, una solución hipotónica, isotónica o hipertónica de sales, como por ejemplo el cloruro de sodio, o la propia muestra en dependencia de la naturaleza de los microorganismos a identificar.

30 Ejemplos pueden ser muestras biológicas como la sangre o alimentos, como la leche, o suspensiones de la muestra.

Otra variante del método consiste en poner en contacto una suspensión de microorganismos en portadores gaseosos, tales como el aire o aerosoles.

La muestra se aplica a la estructura en las siguientes proporciones: 0,05 a  
35 13 ml/g, o de 0,1 a 10 m<sup>3</sup>/g de estructura tridimensional.

Para detectar, recuperar, identificar o cuantificar la pluralidad de células se puede poner en contacto el segundo solvente o las muestras que las contienen con la superficie de la estructura tridimensional o pasándola a través de ella, o hasta una determinada profundidad; estando las células o las muestras que la contienen en  
5 forma de una suspensión en fase gaseosa o en fase líquida, o en forma de gel o con consistencia semisólida o sólida, aplicándola directamente sobre la estructura, o mediante un dispositivo de aplicación como, por ejemplo, un hisopo, asa, aguja, entre otros.

Las muestras o el segundo solvente que contiene los microorganismos se pueden  
10 aplicar a varias estructuras a la vez.

A continuación se mantiene la estructura tridimensional a temperaturas de 20 a 50 °C por un período coincidente con la mayor duración de la fase lag o del final de la fase de aceleración del crecimiento del microorganismo de más lento desarrollo, con tensión de oxígeno que puede variar, desde condiciones aerobias,  
15 hasta la ausencia total de este elemento en dependencia de los microorganismos diana a detectar.

El crecimiento se observa a partir de los 30 min hasta los 240 min para las bacterias, y conjuntamente con la detección se puede identificar las diferentes especies, géneros o grupos. Para ello, las estructuras se mantienen en las  
20 condiciones antes señaladas para propiciar el crecimiento microbiano, tanto en el interior de las cavidades, como en la superficie.

Para determinados microorganismos de muy lento crecimiento, como las levaduras y hongos filamentosos el crecimiento se observa en tan solo 16 h en lugar de 36 - 72 h que se observa al emplear los métodos tradicionales.

En las nano- partículas o cavidades se aprecia el crecimiento por la actividad de nanobacterias, y de otras bacterias indirectamente por los productos de la escisión de los marcadores enzimáticos que bajo la acción de las enzimas microbianas se puedan acumular en ellas. En las micro- cavidades se desarrollan las bacterias de menor talla, en las macro- cavidades las bacterias de mayor talla,  
30 las levaduras y los hongos filamentosos y en la superficie todos los microorganismos.

La detección e identificación de la pluralidad de células se ejecuta fundamentalmente, pero no exclusivamente por la detección visual u automática de la fluorescencia o la bioluminiscencia.

Además se puede emplear otros métodos, tales como: por el cambio de color de la estructura tridimensional o de su consistencia, textura, brillantez, de su opacidad, tonalidad, homogeneidad, o transparencia; o por los cambios de color, de brillantez, tonalidad, transparencia, o fluorescencia del segundo solvente o de la muestra; o por la aparición de bioluminiscencia, tanto en el interior de las cavidades, como en la superficie de la estructura; o por la observación de otras estructuras morfológicas; o reacciones metabólicas en la estructura tridimensional, en el segundo solvente o en la muestra; o por una combinación de varias, o de todas las formas de identificación.

La determinación de la concentración de células en la muestra se realiza sobre la superficie de láminas o capas de la estructura, o se puede ejecutar mediante la enumeración visual, o mediante métodos automáticos en la superficie, o mediante la medición de la intensidad de la señal fluorogénica, colorimétrica o bioluminiscente, bajo luz en el rango del espectro ultravioleta, visible o infrarrojo, de señales eléctricas, térmicas, magnéticas, por el cambio de pH, o por la cuantificación de la emisión o consumo de gases derivados de la actividad de los microorganismos durante la fase lag o del período de aceleración del crecimiento, tales como dióxido de carbono, oxígeno, sulfuro de hidrógeno, amonio, hidrógeno. Conjuntamente con la identificación de la pluralidad de microorganismos, se puede determinar la resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos, tales como bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, soluciones de limpieza, adicionando a la mezcla de la composición nutritiva y de los marcadores enzimáticos, dichas sustancias y observando la inhibición total o parcial del crecimiento, la desaceleración del mismo, la prolongación de la fase lag, o por la ausencia de reacción de degradación de los sustratos.

El método puede ser ejecutado con ayuda de dispositivos conformados por una mezcla nutritiva estimuladora del crecimiento microbiano, seleccionada entre los hidrolizados enzimáticos de alga *Spirulina platensis*; hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Torula*; extracto de *Ipomoea batatas*; extracto de tomate; hidrolizado enzimático de tejido de corazón e hígado de res y de sangre bovina; hidrolizados enzimáticos de lactoalbúmina obtenida de suero de queso, hidrolizados enzimáticos o ácidos de caseína de suero de mantequilla e hidrolizado o autolizado de *Eudrillus eugeniae* y sus combinaciones y uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes absorbidos y/o adsorbidos en una estructura tridimensional de arcillas o

cerámicas naturales o artificiales, seleccionadas entre la caolinita, halloisita, dickita, nacrita, crisolita, antigorita, lizardita, vermiculita, mica, hectorita, saponita, hidrotalcita, muscovita, clorita, la tierra de diatomea, bentonitas (montmorillonita, sauconita, beidellinita, nontrolita), y fosfatos de calcio, o sus combinaciones conformadas por una pluralidad de nano- cavidades o partículas; submicro-, 5 micro- y macro- cavidades.

Los dispositivos de la presente invención contienen todos los componentes necesarios para la ejecución del método y dichos componentes se encuentran en forma deshidratada en cantidades que garantizan las concentraciones de cada uno de ellos como se describe en el método original. 10

Estos dispositivos pueden estar conformados por fosfatos de calcio seleccionadas entre el metafosfato  $[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]$ , fosfato monocálcico monohidratado  $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ , di-hidrógeno fosfato tetracálcico  $(\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20})$ , fosfato heptacálcico  $[\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2]$ , pirofosfato de calcio  $(\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  y  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , fosfato dicálcico  $[\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ , 15 tricálcico  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , fosfato octacálcico  $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ , hidroxiapatita deficiente en calcio  $[\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}]$ , hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , fosfato tetracálcico  $[\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2]$ , apatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F},\text{Cl},\text{Br})_2]$ , carbonatoapatita  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4,\text{CO}_3)_3(\text{OH},\text{F})]$  o mezcla de ellos. También pueden contener mezclas de las sustancias mencionadas con los 20 fosfatos descritos en el párrafo anterior.

Algunos dispositivos pueden estar conformados por arcillas naturales o artificiales, cerámicas y otros fosfatos de calcio con sustituciones isomórficas de iones o ser funcionalizados por iones o por cationes monovalentes, divalentes, trivalentes o 25 tetravalentes, formando capas superficiales o distribuidas en toda su estructura. Estos cationes pueden ser el Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn y esencialmente jugar un papel de catalizadores de la reacción enzimática de degradación de los marcadores.

Las estructuras tridimensionales de estos dispositivos presentan cavidades en 30 forma de poros, canales, tubos, bolsas regulares o irregulares, de diferentes formas geométricas o sus combinaciones; o se disponen en forma de capas o láminas, dependiendo del tipo de arcilla o cerámica empleada y de su tecnología de obtención estas cavidades se clasifican para dirigir su empleo en el método como:

- nano- cavidades o partículas, preferiblemente de superficies rugosas, con diámetros u holguras de hasta 200 nm para nano- y micro- bacterias;
- nano- y submicro- cavidades con diámetros u holguras de 5 nm a 1000 nm para bacterias de diferentes tallas;
- 5 - micro- cavidades con diámetros u holguras de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$  para bacterias y células de levaduras;
- micro- y macro- cavidades con diámetros u holguras de más de 1  $\mu\text{m}$  y hasta 2 mm para bacterias, levaduras y hongos filamentosos;
- combinaciones con todos los diámetros u holguras de las cavidades desde  
10 nano- hasta macro- de 2 mm para la pluralidad de microorganismos.

Estos dispositivos contienen una o varias composiciones nutritivas, cuyos componentes son seleccionados entre las mezclas de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales degradadas por métodos químicos o enzimáticos que garanticen que el período de fase lag no supere los 60-120 min para las  
15 bacterias y 16 h para las levaduras y hongos filamentosos en cantidades de 0,33 a 20 mg/g de estructura tridimensional.

Los dispositivos también contienen uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes dentro de las cavidades o en la superficie de las estructuras en cantidades de 0,0033 a 0,66 mg/g de estructura  
20 tridimensional. Además de estos sustratos, los dispositivos pueden contener indicadores de pH y de potencial redox.

Adicionalmente, dentro de la composición nutritiva incluida en los dispositivos se pueden incorporar otros productos comerciales tales como hidrolizados enzimáticos, hidrolizados químicos o extractos de proteínas de algas,  
25 microorganismos, partes vegetales, tejidos animales superiores y sus combinaciones en cantidades de 0,33 a 4 mg/g de estructura tridimensional. Como ejemplos de estas sustancias se pueden señalar la peptona bacteriológica, la triptona, el extracto de carne, de cerebro, de corazón, el extracto de papa, de maíz, de arroz, la peptona de soya, el extracto de levadura.

30 Los dispositivos pueden contener otras sustancias tales como promotores de crecimiento, inhibidores, sales, tampones, hidratos de carbono y otros componentes para promover el crecimiento de microorganismos pertenecientes a determinados géneros, especies o grupos en cantidades de 0,003 hasta 14 mg/g.

En su totalidad, los componentes que se encuentran dentro de las cavidades o en  
35 la superficie de los dispositivos (mezcla de la composición nutritiva con los

marcadores enzimáticos y demás componentes) se encuentran en cantidades de 0,33 a 60 mg/g de la estructura tridimensional.

Los dispositivos de la presente invención poseen límites de detección de menos de 1 UFC/10 l para las muestras líquidas, menos de 1 UFC/250 g para las muestras sólidas o menos de 1 UFC/10 m<sup>3</sup> y un límite máximo de hasta 10<sup>9</sup> UFC/ml ó 10<sup>9</sup> UFC/g ó 10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup>.

Aquellos dispositivos que son empleados para detectar, recuperar, identificar o enumerar selectivamente determinados microorganismos dentro de una muestra contienen agentes selectivos del crecimiento microbiano, seleccionados entre las sales (ejemplo las sales biliares, desoxicolato de sodio), otras como resinas, extractos naturales de plantas, ácidos grasos, ésteres, bactericidas, bacteriostáticos, alcoholes, sustancias con actividad de superficie o sus mezclas en cantidades de 0,0033 a 0,8 mg/g de las estructuras tridimensionales de las arcillas o cerámicas y antibióticos (ejemplo vancomicina, ácido nalidíxico), antifúngicos (ejemplo nistatina, ketoconazol, amfotericina B), en cantidades de 0,033 a 0,33 µg/g.

Aquellos dispositivos que se emplean haciendo pasar muestras acuosas a través de su estructura tridimensional, y que poseen componentes muy solubles en agua, pueden contener sustancias que coadyuvan la fijación de la composición nutritiva y los marcadores enzimáticos a las estructuras tridimensionales, entre ellos los alginatos (por ejemplo de sodio o de calcio), polisacáridos naturales; pectina, quitina, goma arábica y otras gomas, almidones como el pregelatinizado de maíz, dextrana y carboximetilcelulosa y otros polímeros derivados de ellos; carragenina, agar, agarosa y polímeros artificiales derivados, derivados del alcohol vinílico, del polibutileno, polietileno y polipropileno, polivinilpirrolidona en cantidades de 0,01 a 0,5 g/g de estructura tridimensional.

Otros compuestos pueden formar parte de los dispositivos, como el caso de sustancias que aumentan su capacidad de absorción, tales como el carbón activado y la celulosa en cantidad de 2 a 4 mg/g que se emplea para conformar los dispositivos cuyas estructuras tienen superficies específicas de menos de 3 x 10 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.

Un dispositivo puede estar formado por una estructura tridimensional o por un conjunto de estructuras. Cada estructura tridimensional puede conformar una película o capa de 5 nm a 1 mm de espesor; o una columna de hasta 10 cm de altura; o partículas de diferentes formas geométricas, tales como esferas, perlas,

hexágonos, cubos, de diámetro de 5 nm a 10 mm; o cilindros o tubos de 5 nm a 10 cm de diámetro y de 5 nm a 10 cm de altura; o fibras, redes, o adoptar la forma del recipiente que la contenga. En algunos casos la estructura del dispositivo puede aumentar en tamaño y volumen producto de la “hinchazón” al absorber la muestra que contiene los microorganismos, o al segundo solvente que contiene los microorganismos y ocupar todo el volumen del recipiente que los contenga. Pueden ser dispositivos elaborados a partir de hidroxiapatita, agar y almidón pre gelatinizado de maíz.

Un dispositivo puede poseer una estructura tridimensional que presenta diferentes zonas con distintas porosidades y diferentes diámetros u holguras de las nano-, micro- y macro- cavidades a través de su volumen, o de su longitud, o de su diámetro, distribuyéndose dichas zonas en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.

Cada dispositivo en su única estructura tridimensional contiene una o varias composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos diferentes a través de su volumen, longitud o diámetro, distribuyendo dichas composiciones en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.

Los dispositivos pueden mantener la estructura tridimensional sobre soportes en forma de láminas, capas o cilindros permeables a gases o líquidos o impermeables a los mismos; o rodeada por materiales impermeables en al menos el 90 % de su superficie.

A continuación se exponen algunos ejemplos de ejecución

Ejemplo 1.

Se tomaron para la prueba de promoción de crecimiento de bacterias (*E. coli*) varias bases nutritivas, entre ellas, hidrolizado papaínico de músculo de corazón, según el Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22442 en cantidad de 0,2 g/l de agua desionizada, extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, según el Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22221, en cantidad de 0,2 g/l, hidrolizado enzimático de caseína (Certificados de Autor de Invención de Cuba 22166) en cantidad de 0,2 g/l y 0,2 g/l de hidrolizado pancreático de corazón.

Igualmente se conformó una mezcla de ellas en las siguientes cantidades: hidrolizado papaínico de músculo de corazón en cantidad de 1 g/l de agua desionizada, extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en cantidad de 1 g/l,

hidrolizado enzimático de caseína en cantidad de 2 g/l y 1 g/l de hidrolizado pancreático de corazón.

Los productos a ensayar se inocularon con 0,1 ml de una suspensión de los microorganismos diana a concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml.

- 5 Se incubaron las bases por separado y la mezcla por 8 h a 37 °C en atmósfera aerobia y se monitoreó el incremento de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 680 nm.

De todas las variantes, la mezcla nutritiva mostró una reducción de la fase lag de crecimiento de *E. coli* en 30 min, mientras que las bases individuales mostraron  
10 una duración de esa fase variable, entre ellas: hidrolizado papaínico de músculo de corazón – 45 min, extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* – 80 min, hidrolizado enzimático de caseína 60 min y el hidrolizado pancreático de corazón – 50 min.

De esta manera, se seleccionó la mezcla de componentes nutritivos, que en lo  
15 adelante se identificará como CCL, y se disolvió en 1 l de agua desionizada como primer solvente en cantidad de 5 g/l (variante 1) y en cantidad de 10 g/l (variante 2).

A esta mezcla nutritiva se le había incorporado el hidrolizado pancreático de músculo de corazón en cantidad de 1 g/l (variante 1) y 2 g/l (variante 2),  
20 resultando las concentraciones de los nutrientes, como ya se expresó en 5 g/l y 10 g/l, respectivamente.

Una vez preparada la composición, a ésta se le adicionaron dos marcadores enzimáticos, uno cromogénico [2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido ( $C_{12}H_{15}NO_6$ )], en cantidades de 0,5 g/l (variante 1) y 1 g/l (variante 2) y otro fluorogénico  
25 [4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido ( $C_{16}H_{16}O_9 \cdot 2H_2O$ )] en cantidades de 0,075 g/l (variante 1) y 0,15 g/l (variante 2).

A las mezclas de las composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos se les adicionaron otras sustancias, tales como promotores de crecimiento, específicamente lactosa (5 y 10 g/l), sorbitol (0,5 y 1 g/l), L-triptófano (1 y 2 g/l);  
30 sales inorgánicas, específicamente fosfato monobásico de potasio (2,75 y 5,5 g/l), fosfato dibásico de potasio (2,75 y 5,5 g/l) y cloruro de sodio (5 y 10 g/l); por último se incorporaron las sales biliares en concentración de 1,3 a 2,6 g/l.

La composición nutritiva seleccionada, conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes se encontraban disueltas en el primer solvente  
35 en cantidades de 23,9 g/l para la variante 1 y 47,8 g/l para la variante 2.

Conformada la mezcla nutritiva y conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes disueltos en el primer solvente, se esterilizaron por filtración.

Las mezclas nutritivas conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes disueltos en el primer solvente se pusieron en contacto con dos estructuras tridimensionales de cerámicas específicamente la hidroxiapatita previamente esterilizada a 180 °C por 60 min.

El tiempo de contacto de las composiciones de la variante 1 (V1) y de la variante 2 (V2) fue de 60 min.

10 Estas estructuras contaban con una superficie específica de 7500 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.

Las estructuras tridimensionales mencionadas presentaban dimensiones de las cavidades correspondientes a combinaciones de todos los diámetros u holguras de las cavidades correspondientes a nano- micro- cavidades con diámetros u holguras de 5 nm a 600 µm en forma de poros. Estas estructuras presentaban  
15 forma de cilindro de 0,5 cm de diámetro y 0,5 cm de altura.

Al concluir la etapa de absorción, se eliminó el primer solvente sometiendo las estructuras tridimensionales a secado a temperatura de 60 °C en horno de vacío, por un período de 3 h.

Se comprobó la capacidad de recuperar el microorganismo diana (*E. coli*) demostrando que las estructuras poseían límites de detección de menos de  
20 1 UFC/100 ml para ambas variantes.

Se puso en contacto una suspensión de *E. coli* en solución isotónica salina en concentración de 3 x 10<sup>6</sup> UFC/ml con 0,1 g de las estructuras tridimensionales en cantidades de 0,2 ml (relación de 2 ml/g).

25 A continuación se mantuvieron las estructuras tridimensional a temperaturas de 35 ± 2 °C, en condiciones aerobias por un período de 2 h coincidente con la duración de la fase lag de crecimiento de *E. coli*.

Al concluir la incubación por 2 h se detectó la presencia del microorganismo objeto en ambas variantes por la fluorescencia bajo luz ultravioleta a 366 nm  
30 visualmente en el líquido sobrenadante y se pudo identificar *E. coli* por su reacción positiva a la glucuronidasa (fluorescencia).

## Ejemplo 2

Similar a la variante 1 del ejemplo 1, con la diferencia que se conformaron las  
35 siguientes variantes:

V3 – Perlas de hidroxiapatita con un peso total de 0,2 g, con una superficie específica de  $2 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , impregnada con la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1.

5 V4 - Perlas de hidroxiapatita con un peso total de 0,2 g, con una superficie específica de  $3000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , impregnada con la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1.

Se absorbieron las estructuras por 2 h con las composiciones nutritivas y se secaron al vacío por 2 h a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se inocularon con 2 UFC/ml de *E. coli* en un volumen de 0,2 ml (1 ml/g)

10 La fluorescencia de *E. coli* se observó a los 120 min.

### Ejemplo 3

V5 - Perlas de hidroxiapatita con un peso total de 0,2 g, con una superficie específica de impregnada con la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1.

15 V6 - Perlas de hidroxiapatita con un peso total de 0,2 g, con una superficie específica de  $1,5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , impregnada con la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1.

V7 – Discos de celulosa sin arcillas con 6 mm de diámetro,  $0,94 \text{ cm}^2$  de superficie y 0,014 g, impregnada con la composición nutritiva según la V1 del ejemplo 1.

20 V8 - composición nutritiva según la V1 del ejemplo 1 en volumen de 0,25 ml.

Se embebieron las cerámicas en la composición nutritiva por 3 h y se eliminó el primer solvente a temperatura de  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se inocularon 0,1 ml de suspensión concentrada (1 colonia en 5 ml de solución salina) de *E. coli*.

25 Como resultado se observó la fluorescencia a los 90 min en la V6, a los 105 min en la V5 y no se observó ni en la V7 ni en la V8, lo que demuestra que la combinación del empleo de las arcillas tridimensionales en combinación con las mezclas nutritivas escogidas entre aquellas que acortan la fase lag de crecimiento aceleran la detección e identificación microbiana en comparación con el empleo  
30 solamente de la composición, o de ésta con otro tipo de estructuras.

### Ejemplo 4

En general el método se ejecutó según el ejemplo 1, con las siguientes diferencias:

Se tomaron para la prueba de promoción de crecimiento de bacterias el hidrolizado papaínico de músculo de corazón, según el Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22442 en cantidad de 0,2 g/l de agua desionizada.

Se incubó la base por 8 h a 37 °C en atmósfera aerobia y se monitoreó el incremento de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 680 nm.

La base nutritiva mostró una reducción de la fase lag de crecimiento de *Enterococcus* en 120 min.

Para la preparación del dispositivo (variante 9) para ejecutar el método, se seleccionó este hidrolizado y se disolvió en 1 l de agua desionizada como primer solvente en cantidad de (10 g/l equivalente a 10 mg/g de estructura) y se le añadieron sales para regular el posible cambio de pH provocado por la estructura tridimensional en específico fosfato dipotásico (3,5 g/l, equivalente a 8,75 mg/g de estructura), fosfato monopotásico (1,5 g/l, equivalente a 3,75 mg/g de estructura) y cloruro de sodio (5 g/l, equivalente a 12,5 mg/g de estructura), lo que hace un total de mezcla nutritiva de 50 mg/g). A la estructura se le adicionó como marcador fluorogénico metilumbeliferil- $\beta$ -glucósido en cantidad de 0,075 g/l, equivalente a 0,1875 mg/g de estructura arcillosa tridimensional.

Previamente se esterilizaron los componentes en autoclave a 121 °C por 15 min.

La presencia de *Enterococcus* se observó por la fluorescencia azulosa a los 120 min.

#### Ejemplo 5

En general el método se ejecutó según el ejemplo 4, con las siguientes diferencias:

Se tomaron para la prueba de promoción de crecimiento de bacterias (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Enterococcus avium* ATCC 14025) el hidrolizado papaínico de músculo de corazón, según el Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22442 en cantidad de 0,2 g/l de agua desionizada.

Se incubaron las bases por 8 h a 37 °C en atmósfera aerobia y se monitoreó el incremento de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 680 nm.

Las bases nutritivas mostraron una reducción de la fase lag de crecimiento de 2 h.

Para la preparación del dispositivo para ejecutar el método, se duplicaron las concentraciones de cada componente a embeber en las estructuras.

A los 90 min se observó un cambio de color en el segundo solvente, ligeramente azulado, con respecto al original que era verdoso para ambos dispositivos con estructuras tridimensionales arcillosas para *E. avium*.

5 A los 150 min se observó la aparición de fluorescencia en el segundo solvente, para el dispositivo de  $7,5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  de superficie específica (variante 10) y ligera fluorescencia para el dispositivo con superficie específica de  $2 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  (variante 11) para *E. avium*.

A los 210 min *E. faecalis* fue detectado en el dispositivo de la variante 11 por la aparición de fluorescencia.

10 A los 240 min todos los microorganismos mostraron fluorescencia en las estructuras tridimensionales.

#### Ejemplo 6

Se ejecutó según el ejemplo 1, con las siguientes diferencias:

15 Se prepararon 3 dispositivos: el de la variante 11 (V 11) con la superficie específica de  $2 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , el de la variante 12 (V12) con la superficie específica de  $3,3 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  y la variante 13 con la superficie específica de  $1,5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ .

El tiempo de contacto de las composiciones de las variantes fue de 180 min.

20 Al concluir la etapa de absorción, se eliminó el primer solvente sometiendo las estructuras tridimensionales a secado a temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  en horno de vacío, por un período de 60 min.

Se puso en contacto una suspensión de *E. coli* en solución isotónica salina en concentración de 1 colonia en 5 ml y de ella se tomaron 0,1 ml y se aplicaron  
25 sobre la superficie del dispositivo.

A los 90 min se observó fluorescencia en el dispositivo con la estructura de la variante 11 (V11).

A los 210 min se observó fluorescencia en los otros dos dispositivos (V12 y V13) con las estructuras de superficie específica de  $1,5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  a  $3,3 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ .

30

#### Ejemplo 7

Similar a la variante 1 del ejemplo 1, con la diferencia que se conforman las siguientes variantes:

35 V14 – Caolinita en conglomerados compactada con un peso total de 0,2 g, impregnada con la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1. Los espacios

entre las partículas de caolinita conforman cavidades de disímiles formas, de tamaño correspondiente a micro- y macro- cavidades.

V15 – Bentonita en polvo molinada por molino de bolas y compactada con posterioridad con un peso total de 0,2 g, impregnada con la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1. Los espacios entre las partículas de caolinita conforman cavidades de disímiles formas, de tamaño correspondiente a micro-cavidades.

Se absorben las estructuras por 4 h con las composiciones nutritivas y se secan al vacío por 3 h a 60 °C.

10 Se pone en contacto una suspensión de *E. coli* en solución isotónica de fosfato de sodio en concentración de  $10^6$  UFC/ml con 0,1 g de las estructuras tridimensionales en cantidades de 0,2 ml (relación de 2 ml/g).

La fluorescencia de *E. coli* se observa a los 280 min.

15 Ejemplo 8

La cepa de *E. coli* ATCC 25922 se ensaya como se describe en el ejemplo 1, y se conforma según la V2 de ese ejemplo, y se confecciona una composición nutritiva según se describe en esa variante 2 del ejemplo 1, con excepción que solamente se adiciona el sustrato fluorogénico 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucurónido (MUG) en cantidad de 0,2 g/l.

La mezcla nutritiva conjuntamente con el marcador enzimático y demás componentes disueltos en el primer solvente se ponen en contacto con tres estructuras tridimensionales.

La primera estructura de naturaleza cerámica artificial está compuesta por una nano- capa de hidroxiapatita con nanoporosidad, superficie específica de  $50 \times 10^6$   $m^2/m^3$  y con nano- cavidades, de 20 nm de altura que, descansa sobre una capa inferior de agarpectina en cantidad de 0,5 g/g. La estructura descansa, a su vez, sobre toda la superficie de un disco impermeable de derivados de la celulosa, específicamente nitrato de celulosa de 6 cm de diámetro para conformar un primer dispositivo (variante 16).

La segunda estructura, pero de tierra silíceas con una superficie específica de  $3 \times 10^5$   $m^2/m^3$  a  $1 \times 10^6$   $m^2/m^3$  y porosidad en el rango de las nano- y micro-cavidades se mezcla con los ingredientes de la composición nutritiva y con adición de agar (0,3 g/g) disueltos en el primer solvente. El segundo dispositivo

se prepara colocando la estructura de tierra silíceica descrita en un cilindro de 3 mm de altura por 90 mm de diámetro (variante 17).

La tercera estructura tridimensional, compuesta por hidroxiapatita con una superficie específica de mínima de  $1,25 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  con macro- y micro-cavidades irregulares, seguida de una estructura tridimensional de zeolita con una superficie específica mayor de  $5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Se absorben en la primera y segunda estructuras las composiciones nutritivas del ejemplo 1, variante 2 y el sustrato fluorogénico descrito en esa variante. La altura del conjunto de las estructuras tridimensionales alcanza los 10 cm y el diámetro de 4 cm. Con ella se conforma un dispositivo, colocando esta columna tridimensional en un tubo de material impermeable con una abertura en la parte superior y otra inferior, de forma tal, que el tubo de material impermeable (derivado del cloruro de vinilo) rodea la estructura en el 90 % de la superficie externa (variante 18).

Se pone en contacto una suspensión de *E. coli* en solución isotónica salina en concentración de  $10^2$  UFC/ml con toda la superficie del primer dispositivo (V16) con ayuda de un hisopo de alginato de sodio. A continuación se mantiene la estructura tridimensional a temperaturas de  $35 \pm 2$  °C, en condiciones aerobias por un período de 120 min y se detecta el crecimiento por la emisión de fluorescencia bajo luz a 366 nm con ayuda de un sensor y se identifica por la actividad glucuronidasa.

Se pone en contacto la suspensión de *E. coli* en solución isotónica salina en concentración de 10 UFC/ml con toda la superficie del segundo dispositivo (V17) con ayuda de una pipeta automática y se distribuye con una espátula de Drigalski. A continuación se mantiene la estructura tridimensional a temperaturas de  $35 \pm 2$  °C, en condiciones aerobias por un período de 240 min y se detecta el crecimiento por la emisión de fluorescencia bajo luz a 366 nm con ayuda de un sensor y se identifica por la actividad glucuronidasa.

Se pasa una muestra de 10 l de agua desionizada, contaminada artificialmente con *E. coli* a concentración de 8 UFC/10 l a través de todo el volumen del dispositivo y se pone a incubar en las condiciones descritas en los experimentos anteriores. Después de 210 min se observa fluorescencia en el interior del dispositivo.

## Ejemplo 9

Se evaluaron cuatro estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales con dos composiciones nutricionales para la identificación de bacterias Gram-negativas.

- 5 La selección de los componentes nutritivos se ejecutó según el ejemplo 1.

Con esta composición se prepararon diferentes dispositivos para ejecutar el método.

Los soportes seleccionados fueron las cerámicas HAP-S (superficie específica de  $7,5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ) y HAP-56 (superficie específica de  $3 \times 10^5 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ), además de  
10 tierra silícea calcinada y purificada (TSC) (superficie específica de  $5,3 \times 10^4 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ).

Se preparó una mezcla nutritiva, con marcadores fluorogénico y cromogénico y otros componentes según la V1 del ejemplo 1. Se preparó en paralelo otra mezcla de un compuesto fluorogénico con sales y otros componentes según la siguiente  
15 composición: sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  5,0 g/l del primer solvente; hidrógeno fosfato de potasio  $[\text{K}_2\text{HPO}_4]$  0,45 g/l; di-hidrógeno fosfato de potasio  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  0,31 g/l; hidrógeno fosfato de sodio  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$  0,92 g/l; cloruro de sodio  $[\text{NaCl}]$  0,1 g/l; cloruro de calcio  $[\text{CaCl}_2]$  0,05 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado  $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  0,2 g/l; L-histidina monoclóhidrato 0,005 g/l; L-triptófano 0,02 g/l;  
20 L-metionina 0,02 g/l y dextrosa 10,0 g/l y MUG en cantidad de 0,2 g/l.

Ambas composiciones se ajustaron a 6,8 de pH y se esterizaron por filtración a través de unidades de filtración desechables Nalgene (0,2  $\mu\text{m}$ , tamaño del poro) (Nalge Co., Rochester, N.Y.).

La preparación de las estructuras tridimensionales con las mezclas se realizó  
25 siguiendo la siguiente metodología:

-se pesó por independiente 1 g de cada soporte estructurado en contenedores resistentes al calor seco

-se esterizaron a 180 °C por 1 h, se adicionó 2 ml de la composición nutricional o de la mezcla del marcador enzimático con sales y otros componentes (MCS)  
30 estéril por filtración bajo flujo laminar vertical y se embebieron durante 1 h en la estructura, se destaparon y se dejaron bajo flujo laminar vertical hasta su la eliminación del primer solvente durante 3 h, bajo condiciones de asepsia se re envasó una porción de 0,1 g del dispositivo, de forma tal que su diámetro y altura fuera de 0,5 cm, así obtenido a un contenedor de vidrio calidad hidrolítica 1,  
35 transparente, con tapa y de capacidad máxima 2 ml.

Los dispositivos finales contenían: sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 10 mg/g de estructura tridimensional; hidrógeno fosfato de potasio [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] 0,9 mg/g; dihidrógeno fosfato de potasio [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 0,62 mg/g; hidrógeno fosfato de sodio [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] 1,84 mg/g; cloruro de sodio [NaCl] 0,2 mg/g; cloruro de calcio [CaCl<sub>2</sub>] 0,1 mg/g; sulfato de magnesio heptahidratado [MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O] 0,4 mg/g; L-histidina monoclóhidrato 0,001 mg/g; L-triptófano 0,04 mg/g; L-metionina 0,04 mg/g y dextrosa 20,0 mg/g y MUG en cantidad de 0,4 mg/g, para un total de 34,55 mg/g.

El diseño experimental abarcó las siguientes variantes de ensayo:

10

Tipos de soporte		
	Composición nutritiva	MCS
HAP-S	V18	V22
HAP-56	V19	V23
TSC	V20	V24

15

Para la inoculación de todas las variantes de estudio, se prepararon suspensiones microbianas de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml, en 9 ml de una disolución salina estéril al 0,85% (p/p), a partir de cultivos puros de *Escherichia coli* ATCC 25922 incubados hasta 24 h. El volumen del inóculo fue de 0,2 ml para cada variante de ensayo, garantizando una concentración del inóculo de 2 x 10<sup>7</sup>. Los dispositivos inoculados fueron incubados a 35 ± 2 °C en condiciones aerobias.

La lectura se realizó de forma visual utilizando lámpara UV de 366 nm cada 30 min.

20

Los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla, declarando el período en horas:min de la respuesta positiva a la fluorescencia.

Dispositivos con mezcla						
+ marcadores + otros componentes			Microorganismo	Dispositivos MCS		
HAP-S (V18)	HAP-56 (V19)	TSC (V20)	<i>E. coli</i>	HAP-S (V22)	HAP-56 (V23)	TSC (V24)
2:30	3:30	2:30		24:00	5:00	24:00

Este indicador demuestra que la especie microbiana posee una actividad enzimática en correspondencia con el marcador enzimático empleado en las composiciones.

5 Se demuestra además, que no es obvio que cada composición nutritiva combinada con una estructura arcillosa tridimensional responda en un menor o período de tiempo a la detección o identificación de los microorganismos.

Se demuestra además, que la combinación de las estructuras arcillosas o cerámicas con las mezclas nutritivas, los marcadores enzimáticos y demás ingredientes acelera la identificación con respecto a las variantes de la V21 a la 10 V23 que no poseían los componentes nutritivos basados en los hidrolizados y extractos de proteínas protegidos anteriormente por los autores de la presente invención, demostrando lo imprescindible de emplear composiciones que prevén la disminución de la fase lag de crecimiento de las bacterias para disminuir el tiempo de detección e identificación.

15 Este experimento también demostró que sorprendentemente las composiciones nutricionales diseñadas son capaces de atenuar o eliminar el efecto inhibitorio o aplicación antibacteriana de esta estructura descrito por varios autores para determinados procesos biotecnológicos, en especial de la zeolita (V21) cuando se le adiciona una composición nutritiva especialmente diseñada para eliminar ese 20 efecto antibacteriano.

#### Ejemplo 10

Se evaluarón las cuatro estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales con dos composiciones nutricionales para la identificación de bacterias 25 Gram-negativas descritas en el ejemplo anterior (ejemplo 9).

La selección de los componentes nutritivos se ejecutó igualmente según la metodología del ejemplo 1, pero con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Se evaluaron hidrolizados enzimáticos individuales y en mezclas, entre ellos hidrolizado papaínico de tejido de corazón de res, según Certificado de 30 Autor de Invención de Cuba 22442, e hidrolizado pancreático de músculo de corazón y sus mezclas. Los resultados mostraron que para los 3 casos la fase lag tuvo una duración máxima de 120 min, por lo que ambos fueron seleccionados para conformar la composición nutritiva.

Con esta composición se prepararon diferentes dispositivos para ejecutar el 35 método.

Se preparó una mezcla nutritiva, con marcadores fluorogénico y cromogénico y otros componentes según la V1 del ejemplo 1. Se preparó en paralelo otra mezcla de un compuesto fluorogénico con sales y otros componentes según lo descrito en el ejemplo anterior (MCS).

5 El resto de la preparación de los dispositivos y de la inoculación se efectuó según lo descrito en el ejemplo 9, con la diferencia que al experimento se le incorporó la inoculación en los dispositivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

10 El diseño experimental abarcó las siguientes variantes de ensayo:

Tipos de soporte		
	Composición nutritiva	MCS
HAP-S	V18	V21
HAP-56	V19	V22
TSC	V20	V23

Los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla, declarando el período en horas:min de la respuesta positiva a la fluorescencia.

15

Dispositivos con mezcla + marcadores + otros componentes			Microorganismo	Dispositivos con MCS		
HAP-S (V18)	HAP-56 (V19)	TSC (V20)		HAP-S (V22)	HAP-56 (V23)	TSC (V24)
3:00	24:00	-	<i>P. aeruginosa</i>	-	3:00	-
-	-	-	<i>E. faecalis</i>	-	-	-

Se observó de manera inesperada la aparición de fluorescencia verdosa de *Pseudomonas* en las estructuras cerámicas tridimensionales en sólo 3 h en la variante V18, efecto antes nunca logrado en los diagnosticadores conocidos.

20 En segundo lugar se demuestra cómo para detectar determinados microorganismos e identificarlos en un período mínimo de tiempo es de vital importancia la superficie específica y la talla de las cavidades (3 h para la V18 y

24 h para la V19). Además la dependencia del tipo de arcilla específica en combinación con una mezcla que pueda eliminar el efecto inhibitor de estas arcillas o cerámicas (se detecta en V18 y no se detecta en V20 o V21).

Se demuestra que la combinación de 2 estructuras con composiciones diferentes  
5 unidas en un solo dispositivo (V19 + V22) conllevan finalmente a la identificación de los microorganismos diana.

Una vez más se corrobora que las composiciones nutritivas específicas seleccionadas entre las que recortan la fase lag de crecimiento a unos minutos garantizan la detección, identificación y recuperación en sólo minutos (280 min).

10 Se comprobó el carácter selectivo del dispositivo al inhibir *E. faecalis*, pues la composición embebida en la estructura arcillosa, en conjunto con ésta lograron inhibirlo incluso a concentraciones tan elevadas del orden  $10^7$  UFC/ml.

#### Ejemplo 11

15 Evaluación de tres tipos de estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales (HAP-S, HAP-56 y TSC) con dos composiciones nutricionales para la identificación de bacterias Gram positivas.

Se tomaron para la prueba de promoción de crecimiento de bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) varias mezclas de bases  
20 nutritivas, entre ellas extracto de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido por hidrólisis enzimática según se describe en el Certificado de Autor de Invención de Cuba 22221, hidrolizado enzimático de sangre bovina (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22208), hidrolizado enzimático de caseína (Certificados de Autor de Invención de Cuba 22089, hidrolizados enzimáticos de soya comercial y extracto  
25 de carne comercial.

La primera mezcla (M1) contenía: extracto de *Saccharomyces cerevisiae* - 3,24 g/l; hidrolizado enzimático de sangre bovina - 6,37 g/l; hidrolizado enzimático de caseína - 9,97 g/l; peptona de soya comercial - 3,24 g/l y extracto de carne comercial - 2,43 g/l.

30 La segunda mezcla (M2) contenía: extracto de *Saccharomyces cerevisiae* - 5,0 g/l; hidrolizado enzimático de sangre bovina - 5,0 g/l; hidrolizado enzimático de caseína - 5,0 g/l; peptona de soya comercial - 6,0 g/l y extracto de carne comercial - 3,0 g/l.

La tercera mezcla (M3) contenía: extracto de *Saccharomyces cerevisiae* - 6,0 g/l;  
35 hidrolizado enzimático de sangre bovina - 6,0 g/l; hidrolizado enzimático de

caseína – 3,0 g/l; peptona de soya comercial – 6,0 g/l y extracto de carne comercial – 4,0 g/l.

Los productos a ensayar se inocularon con 0,1 ml de una suspensión de los microorganismos diana a concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml.

- 5 Se incubaron las bases por separado y la mezcla por 8 h a 37 °C en atmósfera aerobia y se monitoreó el incremento de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 680 nm.

Todas las variantes acortaron la fase lag a sólo 1 h para el *S. pyogenes* y para *S aureus* la duración de ésta fase fue de sólo 2 h. Se escogió entre ellas la M3,  
10 pues el crecimiento de *S. pyogenes* fue algo más intenso en ella.

Se ensayaron las composiciones nutricionales siguientes:

- composición nutritiva (STR-STAP) compuesta por: hidrolizado enzimático de caseína según el Certificado de Autor de Invención de Cuba 22166  
15 (3,0 g/l), extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* según el Certificado de Autor de Invención de Cuba 22221 (6,0 g/l) y el hidrolizado enzimático de sangre según el Certificado de Autor de Invención de Cuba 22208 (6,0 g/l). Además se incorporó el extracto de carne comercial (4,0 g/l); digerido papaínico de proteínas de soya (6,0 g/l). Se adicionaron  
20 además otros componentes, tales como el talio acetato (0,014 g/l); ácido nalidíxico sal sódica (0,008 g/l); DL-fenilalanina (1,0 g/l); citrato férrico amónico (0,5 g/l); sodio cloruro (0,2 g/l), dextrosa (0,1 g/l) y como marcador fluorogénico se adicionó 0,2 g/l de MU-fos;
- composición adicional sintética sin hidrolizados ni extractos (MCS según  
25 ejemplo anterior) con la adición de 4-metilumbeliferil fosfato (MU-fos) en cantidad de 0,2 g.

Las composiciones se disolvieron en proporción con un primer solvente (agua desionizada) y se ajustó su pH a 7,3. Se esterilizaron por filtración a través de unidades de filtración desechables de 0,2 µm.

- 30 La preparación de los dispositivos se realizó siguiendo la metodología descrita en el ejemplo 10 y el diseño experimental abarcó las siguientes variantes de ensayo:

Estructura	Composición	
	MU-fosfato	MU-fosfato
	STR-STAP	MSC
HAP-S	V26	V29
TSC	V27	V30
Sin estructura tridimensional	V28	

Para el ensayo se seleccionaron las especies diana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. La preparación de las diluciones, su inoculación e incubación se ejecutó como en el ejemplo 10.

- 5 En las tablas siguientes se muestra el periodo (en h:min) del desarrollo de la fluorescencia una vez para las especies microbianas evaluadas frente a cada marcador enzimático empleando solamente las composiciones de las variantes de la 24 a la 27, o sea solamente las que contienen la mezcla nutritiva.

Dispositivo			Microorganismo
HAP-S	TSC	Sin estructura tridimensional	
3:00	5:00	24:00	<i>S. aureus</i>
4:00*	24:00*	-	<i>S. pyogenes</i>

- 10 \*: fluorescencia débil pero perceptible

La evaluación realizada con este sustrato fluorogénico demostró que las variantes más satisfactorias en cuanto a rapidez en la respuesta fueron las combinaciones STR-STAP con HAP-S (variante 24) que en sólo 3 - 5 h de incubación permitió la  
15 detección de *S. aureus* y de *S. pyogenes*.

La variante 25 posibilitó la detección de microorganismos de muy alta exigencia nutritiva, como *S. aureus* en sólo 5 h y para *S. pyogenes* se logró en 24 h.

Una vez más se demostró que sólo la combinación de las mezclas nutritivas con los marcadores enzimáticos y las estructuras cerámicas tridimensionales (V24–  
20 V25) son capaces de acelerar la detección microbiana con respecto a las composiciones solas (V26) o incluso lograr su detección (V26 negativa para *S. pyogenes*).

Otras combinaciones se ejecutaron para conformar dispositivos compuestos de 2 estructuras con dos composiciones diferentes, una conteniendo los hidrolizados y extractos u otra sintética:

$$V24 + V27 = V29$$

5  $V25 + V28 = V30$

$$V24 + V28 = V31$$

$$V25 + V27 = V32$$

La combinación de las estructuras de las variantes estudiadas arrojó mejores resultados en cuanto al tiempo de detección para uno de los dispositivos  
10 combinados y no fue necesaria la combinación para el resto, tal y como se describe a continuación:

- la combinación de la HAP-s con la composición nutritiva original con esa misma estructura tridimensional, pero con la composición sintética (V32), redujo el tiempo de detección de *S. aureus* de 5 h a 3 h y para *S. pyogenes*  
15 de 24 h a 4,30 h.

#### Ejemplo 12

Estudio de la respuesta de diferentes dispositivos y del método frente a una muestra de orina. La conformación de los dispositivos se realizó utilizando cuatro  
20 tipos de estructuras tridimensionales de arcillas naturales y artificiales y cerámicas (HAP-S, HAP-56) combinadas cada una con la composición descrita en la variante 1 del ejemplo 1 y ejecutando el método como se describe en el ejemplo 9.

El inóculo utilizado fue de 0,2 ml de la muestra para cada variante.

25 En paralelo la muestra fue evaluada por el procedimiento tradicional utilizando los medios agarizados CromoCen CC y agar azul bromotimol lactosa (ABL).

En ambos esquemas de ensayo (nuevo método con el dispositivo arcilloso y método tradicional) las muestras inoculadas fueron incubadas a 35 °C. La lectura del ensayo con la aplicación del dispositivo se realizó cada 30 min utilizando  
30 lámpara UV de 366 nm.

En la siguiente tabla se indica el período (en h:min) en que se detectó la fluorescencia, lo que demostró la presencia de infección en la muestra clínica, relacionada con una especie positiva al marcador enzimático empleado.

HAP-S + CCL (V33)	HAP-56 + CCL (V34)
3:00	2:30

La combinación CCL con HAP-56 fue la variante que respondió con mayor rapidez 2 h con 30 min, seguida de la combinación con la estructura HAP-S que fue en 3 h. Este resultado indica que *E. coli* es el germen causante de la infección, teniendo en cuenta la selectividad de la composición nutritiva y del dispositivo y que en la mayoría de los casos registrados en este tipo de muestras responde a esta especie.

Por los procedimientos convencionales sólo se detectó *E. coli* en ambos medios (CromoCen CC y ABL) a las 24 h.

De esta manera se demostró lo acertado del nuevo método y del dispositivo y que se aceleró el procedimiento en al menos 8 veces.

### Ejemplo 13

Estudio de la relación entre la capacidad nutricional de las composiciones y el desarrollo de la actividad enzimática microbiana sobre un marcador enzimático.

Para ello, se seleccionó como referencia el nano-compuesto CCL con HAP-S, conformado según lo descrito en el ejemplo 9. Por otro lado, se preparó una variante que utilizó como soporte HAP-S, la cual se embebió en una solución acuosa de MUG en concentración de 0,2 g/l (p/v) y posteriormente se deshidrató siguiendo la misma metodología detallada en el ejemplo 9.

Como microorganismo de ensayo se utilizó un cultivo puro de *E. coli*, a partir del cual se preparó una suspensión del orden de las  $10^8$  UFC/ml. Para el estudio se tomó un volumen de 0,2 y 0,4 ml, logrando inóculos a aplicar en las estructuras del orden de hasta  $10^7$  y se inoculó en paralelo en ambos dispositivos: CCL con HAP-S (V35) y MUG con HAP-S (V36).

Las variantes se incubaron a 35 °C y cada 30 min se observó la respuesta a fluorescencia utilizando UV de 366 nm.

Los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla, destacando el tiempo en h:min en que se apreció la respuesta positiva a fluorescencia.

30

Volumen de inóculo (ml)/densidad final	0,2 ml/10 <sup>7</sup>	0,4 ml/10 <sup>8</sup>
CCL/HAP-S	2:00	1:30
MUG/HAP-S	4:00	3:30

Este experimento demostró la significativa influencia que tiene la combinación de los hidrolizados o extractos obtenidos a partir de sustancias nutritivas de naturaleza proteica presentes en la composición nutritiva utilizada. Ello posibilitó que la especie microbiana se adaptó con mayor rapidez a las condiciones del dispositivo y expresó durante su desarrollo, dentro de la fase lag (2 h) la actividad enzimática que permitió, en este caso, su identificación frente al marcador enzimático utilizado en un período mínimo de 1 h con 30 min.

Sin embargo, para la estructura que contenía sólo el sustrato fluorogénico la respuesta se encontró 2 h más tarde, pues esta se basa no en la activación de mecanismos enzimáticos, sino en detectarlos a muy elevadas concentraciones, que es el método empleado en las soluciones descritas anteriormente en el estado del arte.

#### 15 Ejemplo 14

Estudio de la influencia del pH de la composición sobre la acción del sustrato fluorogénico para revelar la actividad enzimática microbiana.

Utilizando la composición CCL descrita en el ejemplo 9, se prepararon cuatro variantes experimentales a diferentes valores de pH (6,6 - 6,8 - 7,0 - 7,2). Cada variante se esterilizó por filtración y de forma independiente se embebieron en la cerámica HAP-S (variante 37) y se inocularon e incubaron siguiendo el procedimiento referido en el ejemplo 9.

En la siguiente tabla se recogen los resultados del tiempo (h:min) de respuesta positiva a la fluorescencia, como indicador de la actividad enzimática microbiana sobre el marcador utilizado.

pH de la composición	6,6	6,8	7,0	7,2
CCL/HAP-S	1:30	1:30	2:00	1:30

Los resultados demuestran que no existe una influencia significativa del pH de la composición sobre la detección de la actividad enzimática del microorganismo

(*E. coli*) con el marcador enzimático seleccionado (MUG). La respuesta positiva se detectó en el período comprendido entre 1 h y 30 min a las 2 h de cultivo.

#### Ejemplo 15

- 5 Evaluación de cuatro estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales (HAP-S, HAP-56 y TSC) utilizando dos composiciones nutricionales y dos marcadores enzimáticos por independientes para la identificación de especies del género *Candida*.

Para seleccionar el o los compuestos nutritivos se estudió la reducción de la duración de la fase lag con el extracto vegetal de *Ipomoea batatas* desarrollado  
10 anteriormente por los autores de la presente invención, el hidrolizado enzimático de caseína, la peptona de soya, una mezcla de peptonas e hidrolizado enzimático de levadura, todos en cantidades de 0,2 g/l. Se monitoreó la densidad óptica cada 1 h en un espectrofotómetro a 380 nm. Como resultado se observó que para  
15 *C. albicans* el extracto de *Ipomoea batatas* acortaba la fase lag en al menos 1 h con respecto a los demás componentes, llegando sólo a 16 h.

Las primeras variantes experimentales se prepararon utilizando como primer marcador enzimático el sustrato fluorogénico MU-fos. El sustrato se adicionó en cantidad de 0,2 g a la composición CND constituida por: extracto de *Ipomoea*  
20 *batatas* 20,0 g; extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* 10,0 g; fosfato monopotásico 1,0 g; magnesio sulfato 0,5 g; sodio desoxicolato 0,5 g y ácido nalidíxico 0,03 g, para un litro de agua desionizada.

La otra composición utilizada fue el medio MCS, al cual se le adicionó MU-fos en igual cantidad (0,2 g/l).

- 25 En paralelo se prepararon variantes similares empleando como marcador enzimático el sustrato L-prolina metilcoumarina (L-Pro), adicionado en cantidad de 0,2 g a las composiciones CND y MCS, respectivamente.

Las composiciones nutritivas preparadas con los marcadores enzimáticos y demás ingredientes preparados para cada variante experimental se disolvieron en  
30 proporción con un litro de agua desionizada como primer solvente y se les ajustó el pH a 6,6. Se esterilizaron por filtración a través de unidades de filtración desechables de 0,2 µm.

La preparación de las estructuras se realizó siguiendo la metodología descrita en el ejemplo 9 y el diseño experimental abarcó las siguientes variantes de ensayo:

Estructura	Marcador enzimático y medio de cultivo			
	MU-fosfato		L-prolina	
	CND	MCS	CND	MCS
HAP-S	V38	V41	V44	V47
HAP-56	V39	V42	V45	V48
TSC	V40	V43	V46	V49

La evaluación microbiológica se realizó con las cepas de referencia: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida glabrata* ATCC 15126, recién cultivadas en agar dextrosa de Sabouraud durante 36 h. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones en tubos de 9 ml de una disolución salina estéril al 0,85% (p/p), hasta alcanzar una densidad microbiana del orden de  $10^8$  UFC/ml.

Se inoculó un volumen de 0,2 ml a cada variante de los dispositivos según el método y se incubó a 35 °C. Utilizando lámpara UV de 366 nm se realizó la lectura de la respuesta fluorescente cada 30 min.

Los resultados obtenidos se muestran de forma independiente para cada marcador enzimático en las tablas siguientes reflejando el período (h:min) en que detectó la respuesta positiva a la reacción fluorescente.

Sustrato fluorogénico: MU-fos						
Medio CND			Microorganismo	Medio MCS		
HAP-S (V38)	HAP-56 (V39)	TSC (V40)		HAP-S (V41)	HAP-56 (V42)	TSC (V43)
-	NU	-	<i>C. albicans</i>	-	NU	-
15:00*	NU	-	<i>C. parapsilosis</i>	15:00*	NU	-
15:00*	NU	-	<i>C. glabrata</i>	15:00*	NU	-

\*: fluorescencia perceptible, NU: no útil, - respuesta negativa

Ante todo, es importante resaltar que las tres especies de *Candida* evaluadas poseen actividad fosfatasa, por lo que en todos los casos las variantes fueron examinadas con el propósito de detectar la respuesta positiva a la fluorescencia frente al sustrato Mu-fos.

Por otro lado, la evaluación de este sustrato fluorogénico (MU-fos), una vez más, demostró su degradación frente a la cerámica HAP-56, ya que desde que se

hidrató el nano-compuesto, reveló la aparición de una respuesta positiva a fluorescencia, la cual no está relacionada con la acción enzimática de la especie microbiana. Ello invalida la lectura desde el inicio reportándose como no útil.

Por otro lado, la arcilla TSC, de algún modo bloquea la respuesta ya sea de la actividad enzimática de los microorganismos de ensayo o la del sustrato fluorogénico en específico, ya que no se aprecia durante todo el período de cultivo la funcionalidad biológica del nano-compuesto.

Con respecto a la cerámica HAP-S se detectó una respuesta similar para cada composición ensayada pero variable para cada especie de *Candida*.

Con *C. albicans* se detectó que la especie no fue capaz de manifestar su actividad sobre el sustrato MU-fos, en cambio las especies *C. parapsilosis* y *C. glabrata* a pesar de resultar con una baja intensidad se observó la aparición de la fluorescencia a las 15 h de cultivo, indicador que no aumentó su intensidad durante un período mayor de incubación.

En general, la respuesta obtenida al utilizar este marcador enzimático (MU-fos) como parte de las composiciones nutricionales, está estrechamente vinculada con la estructura utilizada como soporte nano-estructurado, resultando entre todas las variantes la de Z la más conveniente.

La siguiente tabla refleja los resultados encontrados con el sustrato fluorogénico L-Pro.

Sustrato fluorogénico: L-Pro						
Medio CND			Microorganismo	Medio MCS		
HAP-S (V44)	HAP-56 (V45)	TSC (V46)		HAP-S (V47)	HAP-56 (V48)	TSC (V49)
15:00	15:00	15:00	<i>C. albicans</i>	15:00	15:00	15:00
15:00	15:00 <sup>a</sup>	15:00	<i>C. parapsilosis</i>	15:00*	15:00 <sup>a</sup>	15:00
-	-	-	<i>C. glabrata</i>	-	-	-

\*: fluorescencia débil pero perceptible, <sup>a</sup>: fluorescencia con mayor intensidad

De acuerdo con otros estudios realizados por los autores de la presente invención para la detección de la actividad enzimática de varias especies de *Candida* es conocido que las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis* poseen actividad enzimática L-prolina amidasa. En cambio *C. glabrata* carece de la acción de dicha enzima. Partiendo de este conocimiento previo, se realizó la lectura

particularizando la búsqueda de una respuesta positiva a la fluorescencia para las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Se detectó que las variantes fabricadas con las estructuras HAP-S, HAP-56 y TSC para ambos medios de cultivo (CND y MCS), manifestaron resultados satisfactorios al permitir la detección de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en sólo 15 h. No obstante, de manera original se resalta la mayor intensidad de la respuesta fluorescente, al utilizar la cerámica HAP-56.

Con respecto a la utilización de la zeolita, como soporte con este sustrato fluorogénico, se encontró una incompatibilidad, ya que no reflejó la actividad microbiana o de algún modo bloqueó la degradación del sustrato L-Pro, resultando no idónea la funcionalidad microbiológica del nano-compuesto.

#### Ejemplo 16

Similar a la variante 1 del ejemplo 1, con la diferencia que se conforman las siguientes variantes:

V50 – conjunto de arcillas de zeolita natural comprimidas en forma de gragea con un peso total de 0,2 g, con una superficie específica de  $3 \times 10^5 \text{ m}^2/\text{m}^3$  impregnada con la composición nutritiva según la V1 del ejemplo 1.

V51 carbonatoapatita [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ] en polvo colocada en un pocillo de 1 cm de altura y 1 cm de alto, con un peso de 0,5 g, con una superficie específica de  $4 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  y talla de las cavidades de 700  $\mu\text{m}$ , impregnada en la composición nutritiva según la V2 del ejemplo 1.

V52 - cubos de zeolita con un peso total de 0,2 g, con una superficie específica de  $7,0 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , impregnada con la composición nutritiva según la V44 del ejemplo 15.

Se absorbieron las estructuras por 1 h con las composiciones nutritivas y se secaron al vacío por 3 h a 60 °C.

Se inoculan con inóculo de  $10^6$  UFC/ml de *E. coli* (V50 y V51) y de *C. albicans* (V52) en un volumen de 0,2 ml (1 ml/g).

La fluorescencia de *E. coli* se observa a los 180 min en la V50 y 210 min en V51 y la de *C. albicans* en la V52 a las 18 h.

#### Ejemplo 17

Se toman para la prueba de promoción de crecimiento de bacterias tales como *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus avium* y el hongo

filamentoso *Aspergillus niger*. Cada uno de los microorganismos se ensaya con varias bases nutritivas, entre ellas, hidrolizado papainico de músculo de corazón, según el Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22442 en cantidad de 0,2 g/l de agua desionizada, extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* según el Certificado de Autor de Invención de Cuba No. 22221, en cantidad de 0,2 g/l, hidrolizado enzimático de caseína (Certificados de Autor de Invención de Cuba 22166), 0,2 g/l de extracto de *Ipomoea batatas*, según se divulga en la patente de Cuba 23507; extracto de tomate en cantidad de 0,2 g/l (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22308); e hidrolizado enzimático de sangre bovina (Certificado de Autor de Invención de Cuba 22208) en cantidad de 0,2 g/l. Igualmente se conformó una mezcla de ellas en cantidades de 0,2 g/l cada una de ellas.

Se incuban las bases por separado y la mezcla por 8 h a 37 °C en atmósfera aerobia y se monitorea el incremento de la densidad óptica en un espectrofotómetro a 680 nm.

De todas las variantes, la mezcla nutritiva muestra una reducción de la fase lag de crecimiento de todos los microorganismos de 90 min, a excepción de *Aspergillus* mientras que las bases individuales muestran una duración de esa fase variable, y en algunos casos superior a las 2 h, por lo que se selecciona la mezcla para los experimentos.

Esta mezcla se disuelve en una solución salina (NaCl a 9,5 g/l) en cantidad de 10 g/l.

Una vez preparada la composición nutritiva, a ésta se le adicionan varios marcadores enzimáticos, uno cromogénico [2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>)], en cantidades de 1 g/l y tres fluorogénicos (4-metilumbelliferil-β-D-glucurónido, 4-metilumbelliferil-β-D-galactósido y 4-metilumbelliferil-β-D-glucósido) en cantidades de 0,2 g/l cada uno.

A las mezclas de las composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos se les adicionaron otras sustancias, tales como promotores de crecimiento, específicamente glucosa (10 g/l); sales inorgánicas, específicamente fosfato monobásico de potasio (5,5 g/l) y fosfato dibásico de potasio (5,5 g/l). La composición nutritiva seleccionada, conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes se encuentran disueltas en el primer solvente en cantidades de 32,6 g/l.

Conformada la mezcla nutritiva y conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes disueltos en el primer solvente, se esterilizan por filtración.

Las mezclas nutritivas conjuntamente con los marcadores enzimáticos y demás componentes disueltos en el primer solvente se ponen en contacto con una y  
5 varias estructuras tridimensionales de cerámicas artificiales, específicamente la hidroxiapatita calcinada y previamente esterilizada a 180 °C por 60 min.

El tiempo de contacto de la composición es de 30 min.

Esta estructura cuenta con una superficie específica de  $5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$  y está conformada por una pluralidad de nano, micro- y macro- cavidades.

10 La estructura tridimensional presenta dimensiones de las cavidades correspondientes a combinaciones de todos los diámetros u holguras de las cavidades correspondientes a nano- semimicro- y micro- cavidades con diámetros u holguras de 5 nm a 10  $\mu\text{m}$  en forma de poros. Estas estructuras presentan forma de cilindro de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2 cm de altura.

15 Al concluir la etapa de absorción, se elimina el primer solvente sometiendo las estructuras tridimensionales a secado a temperatura de 60 °C en horno de vacío, por un período de 3 h.

Se comprueba la capacidad de recuperar los microorganismos diana, demostrando que las estructuras poseen límites de detección de menos de  
20 1 UFC/100 ml filtrando 1 l de una suspensión de *E. coli* artificialmente inoculada hasta concentración de 6 UFC, o sea por 100 mililitros se tienen 0,6 UFC y se logra detectar por fluorescencia y coloración amarillosa de la estructura.

Para el ensayo, se ponen en contacto las suspensiones de los microorganismos diana en solución isotónica salina en concentración de  $3 \times 10^6$  UFC/ml con las  
25 estructuras tridimensionales en cantidades de 1 ml y se distribuyen en la superficie.

A continuación se mantienen las estructuras tridimensional a temperaturas de  $35 \pm 2$  °C, en condiciones aerobias por un período de hasta 4 h coincidente con la duración de la fase lag de crecimiento de *E. coli*.

30 Al concluir la incubación por un máximo de 4 h se detecta la presencia de los microorganismos objeto en todas las variantes, en un caso inoculadas individualmente con cada microorganismo y en otro caso con la mezcla de ellos. En el caso de *E. coli*, se observa fluorescencia y cambio de color en la estructura a amarillento; para *E. coli* O157:H7 y *Aeromonas hydrophila*, sólo se observa el  
35 cambio de color de la estructura. Para todos ellos la detección se ejecuta en 2 h.

En el caso de *Enterococcus avium* se observa fluorescencia azul sin cambio de color en la estructura a las 3 h y hongo filamentoso crece como una estructura negra en la superficie del dispositivo, pero antes se aprecia coloración amarilla en la zona de crecimiento. En el caso en que se inocula la muestra con la mezcla de microorganismos se aprecian todas las reacciones.

#### Ejemplo 18

La cepa de *S. aureus* se ensaya como se describe en el ejemplo 11, y se conforma, según la V26 de ese ejemplo, una composición nutritiva y dispositivo con la diferencia que la estructura tridimensional está conformada en forma de un disco de 0,1 mm de altura y 60 cm de diámetro. Un volumen de aire de 3 m<sup>3</sup> se hace pasar por todo el volumen con ayuda de un dispositivo para filtración de aire que lo succiona por presión negativa. Se simula la contaminación con la cepa de ensayo a concentración de 10<sup>5</sup> UFC/m<sup>3</sup> antes de filtrar el aire, para comprobar si su flujo influye en la desecación de la estructura o en su funcionamiento. Expuesto el dispositivo al aire éste se humedece con el segundo solvente, consistente en agua destilada y se coloca a incubar a la temperatura y condiciones descritas en el ejemplo 11. *S. aureus* se logra identificar a los 240 min.

#### Ejemplo 19

Similar al ejemplo 1, con la diferencia que se elaboran dos dispositivos según la V1 del ejemplo 1. A un dispositivo se le adiciona ciprofloxacina en cantidad de 0,003 µg y en otra gentamicina en cantidad de 0,2 µg. Se inoculan 0,2 ml de la suspensión microbiana de una cepa de *E. coli* aislada de urocultivo con una concentración de 3 x 10<sup>8</sup> UFC/ml y se incuba por 4 h. Se observa ausencia de crecimiento de *E. coli* a las 4 h en el dispositivo que contiene ciprofloxacina y fluorescencia en el dispositivo que contiene gentamicina.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la detección, recuperación, identificación y/o enumeración simultánea de microorganismos caracterizado por: disolver o suspender una mezcla nutritiva estimuladora del crecimiento microbiano, en un solvente en cantidades de 1 a 50 g/l y uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes disueltos en un solvente, absorber los componentes en una o varias estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales o artificiales; eliminar el solvente; poner en contacto las células microbianas o las muestras que las contienen con la estructura tridimensional en presencia de un segundo solvente; mantener las estructuras en condiciones tales que garantice un crecimiento e identificación de la pluralidad de los m.o. por la degradación de los marcadores en el interior de los nano-, micro- y macro- cavidades y en la superficie de las estructuras manteniéndolas a a temperatura de 20 a 50 °C por un período coincidente con la mayor duración de la fase lag y del final de la fase de aceleración del crecimiento del microorganismo de más lento desarrollo y detectar, identificar y enumerar la pluralidad de microorganismos.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por una mezcla nutritiva que se selecciona entre los hidrolizados enzimáticos de alga *Spirulina platensis*; extracto de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido por hidrólisis enzimática e hidrolizado enzimático de levadura forrajera *Torula*; extracto de *Ipomoea batatas*, extracto de tomate; hidrolizados enzimáticos de tejido de corazón de res, de sangre bovina y de hígado de res; hidrolizados enzimáticos de lactoalbúmina obtenida de suero de queso, hidrolizados enzimáticos o ácidos de caseína de suero de mantequilla, e hidrolizado o autolizado de *Eudrillus eugeniae*.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado por estructuras tridimensionales de arcillas y cerámicas naturales o artificiales, que se seleccionan entre la caolinita, halloisita, dickita, nacrita, crisolita, antigorita, lizardita, vermiculita, mica, hectorita, saponita, hidrotalcita, muscovita, clorita, la tierra de diatomea, bentonitas (montmorillonita, sauconita, beidellinita, nontrolita), clinoptilotitas, hidroxiapatitas, zeolitas y fosfatos de calcio, o sus combinaciones con una superficie específica de  $2 \times 10^3$  a  $6 \times$

- $10^8 \text{ m}^2/\text{m}^3$  conformadas por una pluralidad de nano-, micro- o macro-cavidades o sus combinaciones;
4. Método según la reivindicación 1, caracterizado por adicionar al primer solvente uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes en cantidades de 0,01 a 2 g/l.
  5. Método según la reivindicación 1, caracterizado por la adición a la mezcla nutritiva de otros hidrolizados enzimáticos, hidrolizados químicos o extractos de proteínas de algas, microorganismos, partes vegetales, tejidos animales superiores y sus combinaciones en cantidades de 1 a 10 g/l.
  - 10 6. Método según las reivindicaciones 1, caracterizado porque los fosfatos de calcio son: metafosfato  $[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]$ , fosfato monocálcico mono-hidratado  $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ , di-hidrógeno fosfato tetracálcico  $(\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20})$ , fosfato heptacálcico  $[\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2]$ , pirofosfato de calcio  $(\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  y  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , fosfato dicálcico  $[\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ , tricálcico  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , fosfato octacálcico  $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ , hidroxapatita deficiente en calcio  $[\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}]$ , hidroxapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , fosfato tetracálcico  $[\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2]$ , apatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F},\text{Cl},\text{Br})_2]$ , carbonatoapatita  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4,\text{CO}_3)_3(\text{OH},\text{F})]$  o combinaciones indistintamente de dos o mas de cualquiera de ellos.
  - 15 7. Método según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar como primer solvente el agua destilada; o agua desionizada; o soluciones acuosas de sales tales como de cloruro de sodio, de fosfatos; alcoholes y soluciones alcohólicas, como la solución de fucsina básica al 10% p/v en alcohol etílico, u otras sustancias que aumenten la solubilidad de los marcadores enzimáticos o la permeabilidad de las células de los microorganismos, tales como el dimetil sulfóxido.
  - 20 8. Método según la reivindicación 1, caracterizado por disolver el conjunto de la composición nutritiva, los marcadores enzimáticos y demás componentes en el primer solvente en relación de 1 a 150 g/l.
  - 30 9. Método según la reivindicación 1, caracterizado por la eliminación del primer solvente, sometiendo la estructura tridimensional a secado a temperatura ambiente con circulación forzada de aire por convección, o temperatura de 25 a 110 °C a presión atmosférica o a presión menor que la atmosférica, por un período de 30 min a 3 h o eliminándolo por sublimación, o por secado por aspersión a temperatura de 90 a 180 °C.
  - 35

10. Método según la reivindicación 1, caracterizado por poseer un límite de detección y de cuantificación de menos de 1 UFC/10 l para las muestras líquidas, menos de 1 UFC/250 g para las muestras sólidas o menos de 1 UFC/10 m<sup>3</sup> de aire y un límite máximo de hasta 10<sup>9</sup> UFC/ml ó 10<sup>9</sup> UFC/g ó 10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup>.
11. Método según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar como segundo solvente el agua, una solución de sales, para la mayoría de las bacterias y hongos, hipotónica o isotónica y para los extremófilos y microorganismos que viven en las aguas marinas, hipertónica, o la propia muestra.
12. Método según la reivindicación 1, caracterizado por poner en contacto la pluralidad de microorganismos o la muestra que los contiene en una relación de 0,05 a 13 ml/g, o de 0,1 a 10 m<sup>3</sup>/g de estructura tridimensional.
13. Método según la reivindicación 1, caracterizado por poner en contacto la pluralidad de células microbianas que pueden estar conformadas por una diversidad de los microorganismos a detectar, recuperar, identificar y/o enumerar, pertenecientes a una especie, un género, un grupo o combinaciones de ellas, e incluye a las nanobacterias, bacterias, mohos y levaduras y las esporas, hifas u otros propágulos a identificar o las muestras que las contienen en contacto con la superficie de una o varias estructuras tridimensionales o pasándola a través de ellas, o hasta una determinada profundidad; estando las células o las muestras que las contienen en forma de una suspensión en fase gaseosa o en fase líquida, o en forma de gel o con consistencia semisólida o sólida, aplicándola directamente sobre la estructura, o mediante un dispositivo de aplicación.
14. Método según la reivindicación 1, caracterizado por mantener la estructura tridimensional durante la fase de detección de los microorganismos en atmósferas con tensión de oxígeno que puede variar, desde condiciones aerobias para los m.o. aerobios y aerobios facultativos, hasta la ausencia total de este elemento para los anaerobios o anaerobios facultativos.
15. Método según la reivindicación 1, caracterizado por la identificación de la pluralidad de células por la detección visual u automática de la fluorescencia; por el cambio de color de la estructura tridimensional o de su consistencia, textura, brillantez, opacidad, tonalidad, homogeneidad, o transparencia; o por los cambios de color, de brillantez, tonalidad, transparencia, o fluorescencia del segundo solvente o de la muestra; o por

la aparición de bioluminiscencia, tanto en el interior de las cavidades, como en la superficie de la estructura; o por la observación de otras estructuras morfológicas; o reacciones metabólicas en la estructura tridimensional, en el segundo solvente o en la muestra; o por una combinación de varias o de todas las formas de identificación.

5

16. Método según la reivindicación 1, caracterizado por la detección o la determinación de la concentración de células en la muestra, mediante la enumeración visual o automática de las mismas en la superficie de la estructura tridimensional, o mediante la medición de la intensidad de la señal fluorogénica, colorimétrica o bioluminiscente, bajo luz en el rango del espectro ultravioleta, visible o infrarrojo, de señales eléctricas, térmicas, magnéticas, por el cambio de pH, o por la cuantificación de la emisión o consumo de gases derivados de la actividad de los microorganismos durante la fase lag o del período de aceleración del crecimiento, tales como dióxido de carbono, oxígeno, sulfuro de hidrógeno, amonio, hidrógeno.

10

15

17. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque se puede determinar la resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos, tales como bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, soluciones de limpieza, adicionando a la mezcla de la composición nutritiva y de los marcadores enzimáticos dichas sustancias y observando la inhibición total o parcial del crecimiento, la desaceleración del mismo, la prolongación de la fase lag, o por la ausencia de reacción de degradación de los sustratos.

20

18. Método según la reivindicación 1, caracterizado por emplear estructuras tridimensionales seleccionadas entre aquellas cuyas dimensiones de las cavidades o partículas responden a:

25

- nano- cavidades o partículas, con diámetros u holguras de hasta 200 nm para nano- y micro- bacterias;
- nano- y submicro- cavidades con diámetros u holguras de 5 nm a 1000 nm para bacterias de diferentes tallas;
- micro- cavidades con diámetros u holguras de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$  para bacterias y células de levaduras;
- micro- y macro- cavidades con diámetros u holguras de más de 1  $\mu\text{m}$  y hasta 2 mm para bacterias, levaduras y hongos filamentosos;
- combinaciones con todos los diámetros u holguras de las cavidades desde nano- hasta macro- de 2 mm para la pluralidad de microorganismos.

30

35

19. Método según la reivindicación 1, caracterizado por el empleo de las estructuras arcillosas o cerámicas tridimensionales descritas que poseen sustituciones isomórficas de los iones por cationes o son previamente funcionalizadas con diferentes iones, que actúan como catalizadores enzimáticos, tales como Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, formando capas superficiales o distribuidas en toda su estructura.
20. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque en el primer o segundo solvente pueden ser adicionadas otras sustancias promotoras o inhibidoras del crecimiento de microorganismos, pertenecientes a determinados géneros, especies o grupos de microorganismos, en cantidades de 0,01 hasta 40 g/l.
21. Método según la reivindicación 1, caracterizado por adicionar a la composición nutritiva seleccionada sales, resinas, extractos naturales de plantas, ácidos grasos, ésteres, bactericidas, bacteriostáticos, alcoholes, sustancias con actividad de superficie o sus mezclas en cantidades de 0,01 a 2 g/l del primer o segundo solvente o antibióticos o antifúngicos en cantidades de 10 a 100 µg/l del primer o segundo solvente.
22. Método según la reivindicación 1, caracterizado por la adición a la estructura tridimensional de sustancias que coadyuvan la fijación de la composición nutritiva y los marcadores enzimáticos seleccionados entre los alginatos, polisacáridos naturales; pectina, quitina, goma arábica y otras gomas, almidones, dextrana y carboximetilcelulosa y otros polímeros derivados de ellos; carragenina, agar, agarosa y polímeros artificiales derivados, derivados del alcohol vinílico, del polibutileno, polietileno y polipropileno, polivinilpirrolidona en cantidades de 0,01 a 0,5 g/g de estructura tridimensional.
23. Método según la reivindicación 1, caracterizado por la adición a la estructura tridimensional de sustancias que aumentan su capacidad de absorción, tales como el carbón activado y la celulosa en cantidades de 2 a 4 mg/g.
24. Método según la reivindicación 1, caracterizados por el empleo de una estructura tridimensional con capacidad de "hinchazón" al absorber la muestra que contiene los microorganismos, o al segundo solvente que contiene los microorganismos y aumentar su volumen.

25. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la estructura tridimensional puede conformar una película o capa de 5 nm a 1 mm de espesor; o una columna de hasta 10 cm de altura; o esferas o perlas de diámetro de 5 nm a 10 mm; hexágonos o cubos; o cilindros o tubos de 5 nm a 10 cm de diámetro y de 5 nm a 10 cm de altura; o fibras, redes; o adoptar la forma del recipiente que la contenga.
26. Método según la reivindicación 1, caracterizado por el empleo de una estructura tridimensional que presenta diferentes zonas, distintas porosidades y diferentes diámetros u holguras de las nano-, micro- y macro- cavidades a través de su volumen, o de su longitud, o de su diámetro, distribuyendo dichas zonas en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.
27. Método según la reivindicación 1, caracterizado por el empleo de una estructura tridimensional que contiene diferentes composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos a través de su volumen, longitud o diámetro, distribuyendo dichas composiciones en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.
28. Método según la reivindicación 1, caracterizado por mantener la estructura tridimensional sobre soportes en forma de láminas, capas o cilindros permeables a gases o líquidos o impermeables a los mismos; o rodeadas por materiales impermeables en al menos el 90 % de su superficie.
29. Dispositivos para la ejecución del método descrito en las reivindicaciones de la 1 a la 29 caracterizados por conformarse de una o varias estructuras tridimensionales de arcillas o cerámicas naturales o artificiales, seleccionadas entre la caolinita, halloisita, dickita, nacrita, crisolita, antigorita, lizardita, vermiculita, mica, hectorita, saponita, hidrotalcita, muscovita, clorita, la tierra de diatomea, bentonitas (montmorillonita, sauconita, beidellinita, nontrolita), clinoptilotitas, hidroxiapatitas, zeolitas y fosfatos de calcio, o sus combinaciones con una superficie específica de  $2 \times 10^3$  a  $6 \times 10^8$  m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> en una pluralidad de nano-, micro- o macro-cavidades o sus combinaciones y contener en su interior o en la superficie una mezcla nutritiva seleccionada entre los hidrolizados enzimáticos de alga *Spirulina platensis*; extracto de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido por hidrólisis enzimática e hidrolizado enzimático de levadura forrajera *Torula*; extracto de *Ipomoea batatas*, extracto de tomate; hidrolizados

- enzimáticos de tejido de corazón de res, de sangre bovina y de hígado de res; hidrolizados enzimáticos de lactoalbúmina obtenida de suero de queso, hidrolizados enzimáticos o ácidos de caseína de suero de mantequilla; e hidrolizado o autolizado de *Eudrillus eugeniae* y sus combinaciones y uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes.
- 5
30. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener uno o varios marcadores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o bioluminiscentes en cantidades de 0,0033 a 0,66 mg/g de estructura tridimensional.
- 10
31. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener, otros hidrolizados enzimáticos, hidrolizados químicos o extractos de proteínas de algas, microorganismos, partes vegetales, tejidos animales superiores y sus combinaciones en cantidades de hasta 0,33 a 4 mg/g de estructura tridimensional.
- 15
32. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener la mezcla de composiciones nutritivas, marcadores enzimáticos y demás ingredientes selectivos, inhibidores o promotores de crecimiento en cantidades de 0,33 mg/g hasta 60 mg/g de estructura tridimensional.
- 20
33. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados porque la estructura tridimensional está conformada por arcillas o cerámicas con sustituciones isomórficas de los iones por cationes o previamente funcionalizadas con diferentes iones que actúan como catalizadores enzimáticos, tales como Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, formando capas superficiales o distribuidas en toda su estructura.
- 25
34. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizado porque los fosfatos de calcio que conforman su estructura tridimensional se seleccionan entre: metafosfato  $[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]$ , fosfato monocálcico mono-hidratado  $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ , di-hidrógeno fosfato tetracálcico  $(\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20})$ , fosfato heptacálcico  $[\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2]$ , pirofosfato de calcio  $(\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  y  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , fosfato dicálcico  $[\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ , tricálcico  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , fosfato octacálcico  $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ , hidroxiapatita deficiente en calcio  $[\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}]$ , hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , fosfato tetracálcico  $[\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2]$ , apatita
- 30

[Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH,F,Cl,Br)<sub>2</sub>], carbonatoapatita [Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>,CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(OH,F)] o combinaciones indistintamente de dos o más de cualquiera de ellos.

35. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por poseer un límite de detección y de cuantificación de menos de 1 UFC/10 l para las muestras líquidas, menos de 1 UFC/250 g para las muestras sólidas o menos de 1 UFC/10 m<sup>3</sup> de aire y un límite máximo de hasta 10<sup>9</sup> UFC/ml ó 10<sup>9</sup> UFC/g ó 10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup>.
36. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por estructuras tridimensionales que presentan cavidades en forma de poros, canales, tubos, bolsas regulares o irregulares, de diferentes formas geométricas o sus combinaciones; o se disponen en forma de capas o láminas.
37. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por estructuras tridimensionales seleccionadas entre aquellas cuyas dimensiones de las cavidades o partículas responden a:
- nano- cavidades o partículas, preferiblemente de superficies rugosas, con diámetros u holguras de hasta 200 nm para nano- y micro-bacterias;
  - nano- y submicro- cavidades con diámetros u holguras de 5 nm a 1000 nm para bacterias de diferentes tallas;
  - micro- cavidades con diámetros u holguras de 1 µm a 1000 µm para bacterias y células de levaduras;
  - micro- y macro- cavidades con diámetros u holguras de más de 1 µm y hasta 2 mm para bacterias, levaduras y hongos filamentosos;
  - combinaciones con todos los diámetros u holguras de las cavidades desde nano- hasta macro- de 2 mm para la pluralidad de microorganismos.
38. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener agentes selectivos del crecimiento microbiano, seleccionados entre las sales, otras como resinas, extractos naturales de plantas, ácidos grasos, ésteres, bactericidas, bacteriostáticos, alcoholes, sustancias con actividad de superficie o sus mezclas en cantidades de 0,0033 a 0,8 mg/g de las estructuras tridimensionales de las arcillas o cerámicas y antibióticos o antifúngicos en cantidades de 0,033 a 0,33 µg/g.
39. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener sustancias que coadyuvan la fijación de la composición nutritiva y los

5 marcadores enzimáticos seleccionados entre los alginatos, polisacáridos naturales; pectina, quitina, goma arábiga y otras gomas, almidones, dextrana y carboximetilcelulosa y otros polímeros derivados de ellos; carragenina, agar, agarosa y polímeros artificiales derivados, derivados del alcohol vinílico, del polibutileno, polietileno y polipropileno, polivinilpirrolidona en cantidades de 0,01 a 0,5 g/g de estructura tridimensional.

10 40. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener sustancias que aumentan su capacidad de absorción, tales como el carbón activado y la celulosa en cantidad de 2 a 4 mg/g.

15 41. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por tener la forma de una película o capa de 5 nm a 1 mm de espesor; o de una columna de hasta 10 cm de altura; o de esferas o perlas de diámetro de 5 nm a 10 mm; de hexágonos o cubos; o de cilindros o tubos de 5 nm a 10 cm de diámetro y de 5 nm a 10 cm de altura; o de fibras, redes; o adoptar la forma del recipiente que la contenga.

20 42. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por poseer diferentes zonas de distintas porosidades y diferentes diámetros u holguras de las nano-, - micro- y macro- cavidades a través de su estructura total, o de su longitud, o de su diámetro, distribuyendo dichas zonas en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.

25 43. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por contener diferentes composiciones nutritivas y marcadores enzimáticos a través de su volumen, longitud o diámetro, distribuyendo dichas composiciones en forma de gradiente o en zonas diferenciadas.

30 44. Dispositivos según la reivindicación 29, caracterizados por mantener la estructura tridimensional sobre soportes en forma de láminas, capas o cilindros permeables a gases o líquidos o impermeables a los mismos; o rodeadas por materiales impermeables en al menos el 90 % de su superficie.

35