

Doctora
MARIA JOSÉ LAMUS BECERRA
Directora de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
Bogotá, D.C.

ASUNTO: RESPUESTA REQUERIMIENTO EXAMEN DE FONDO
SOLICITANTE: UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
EXPEDIENTE: NC2017/0005936

De manera respetuosa y atenta nos permitimos dar respuesta a las objeciones realizadas por el Examinador en oficio No. 8025 de 12 de agosto de 2019 respecto al título, a las reivindicaciones, novedad y nivel inventivo con los siguientes argumentos técnicos y modificaciones al capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente NC2017/0005936.

Agradecemos al revisor por las sugerencias realizadas para mejorar la solicitud. A continuación, me permito responder a cada punto del requerimiento correspondiente al examen de fondo de la solicitud:

3.1. Sobre el título:

El examinador establece lo siguiente:

El solicitante en el escrito radicado bajo el N° NC2017/0005936 el 19 de junio de 2017, tituló la invención como: “**PROCEDIMIENTO PARA RECUPERAR QUISTES Y OOQUISTES DE PROTOZOOS A PARTIR DE LÍQUIDOS Y KIT DE DETECCIÓN**”. Este título no se relaciona con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones, por lo cual se sugiere el título siguiente: “**MÉTODO DE RECUPERACIÓN POR CENTRIFUGACIÓN Y CONCENTRACIÓN EN FORMOL-ETER DE PROTOZOOS PARA MUESTRAS DE AGUA POTABLE**”.

Rta: Se hizo el cambio para que el título se relacione con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones, tal y como fue sugerido.

3.2. Sobre las reivindicaciones

Frente a lo establecido por el examinador:

La reivindicación 1 se modifica teniendo en cuenta:

El método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos de la reivindicación 1 caracterizado porque se toman 10 litros de líquido, pues teniendo en cuenta la evaluación de la aplicabilidad de la prueba y validaciones inter e intralaboratorio, encontramos lo siguiente:

a) El método funciona de manera óptima a partir de un volumen exacto de 10 litros. Se puede explicar esta característica del método como el resultado del efecto de la composición bioquímica de la paredes celulares o membranas celulares de los quistes y ooquistes, que tienen densidades muy similares y se precipitan de manera eficiente en este volumen específico

b) Que es necesario centrifugar a una velocidad de 1300 g y por de 10 minutos para obtener resultados óptimos.

La reivindicación 2 “no es clara, ya que caracteriza el método por el lavado previo del recipiente donde se toma la muestra, lo cual no define el método pues la persona versada en la materia conoce los requisitos para lo toma de muestras microbiológicas”.

Rta: la reivindicación 2 se modificó de acuerdo al procedimiento que se desarrolló para la patente. Se debe tener en cuenta que el proceso de toma de muestra se realiza por personal competente y autorizado, además este procedimiento no se incluye en el alcance de la invención presentada

La reivindicación 4 “no es clara, ya que se refiere a un “gas de reacción” sin embargo en la mezcla de reactivos descrita en el método no ocurre ninguna reacción que libera un gas. Se sugiere hacer la aclaración respectiva”.

Rta: Se hizo la corrección y se realizó la aclaración en el método.” El gas de reacción” se genera cuando se mezcla el formol salino con el éter en la solución de Concentración. Con base en lo anterior se modifica la reivindicación 3 para aclarar en cual paso se libera el gas de reacción.

Se modifica la reivindicación 5: “...” ajustándola al método que se pretende reivindicar estableciendo la composición química de la solución de formol salina especificada en el literal d) la reivindicación 5 ahora **se denominada reivindicación 2**. Ya que la solución de formol salino que se utiliza como solución de precipitación, no está compuesta de formol, en esta solución se agregó formaldehído al 37%. Este compuesto químico permite que la morfología del quiste y el ooquiste se mantengan intactos y permite la identificación por microscopía óptica e IFI.

4. Sobre la Unidad de invención

El examinador establece en el requerimiento que:

La solicitud carece de unidad de invención, debido a que reclama más de un grupo inventivo sin la presencia de características o elementos técnicos nuevos e inventivos que son comunes a todas las invenciones, lo anterior, teniendo en cuenta que el concepto común es el método para recuperar quistes y ooquistes, y se encuentra divulgado en el estado de la técnica, específicamente en el documento de Lora-

Suarez, *Water Research* 100 (2016) 377 - 381 (Pág. 378, Sección 2.2). Los grupos inventivos están definidos por las siguientes características esenciales: Grupo inventivo 1: Método para recuperar quistes y ooquistes (reivindicaciones 1 a 4). Grupo inventivo 2: Composición para recuperar quistes y ooquistes (reivindicación 5). Grupo inventivo 3: Kit para recuperar quistes y ooquistes (reivindicación 6). Se sugiere restringir la materia a patentar en un solo concepto común inventivo especificando el avance tecnológico sobre el estado de la técnica.

Rta: Se hizo la corrección y se acepta la sugerencia de restringir la materia a patentar Grupo inventivo 1: Método para recuperar quistes y ooquistes tal y como se observa en el ajuste de las reivindicaciones y demás escrito de la solicitud de patente.

5. Sobre la Determinación del Estado de la Técnica

El documento D1 divulga un método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en agua que hace tratamiento con formol-éter (Pág. 378, Sección 2.2.). **Sin embargo, estos no son iguales** ya que se utilizan diferentes velocidades y tiempos los cuales permiten la precipitación de las formas parasitarias. Esto se puede explicar por la composición bioquímica de la membrana celular que le otorga densidades específicas y el método basado en centrifugación permite recuperar los protozoos en un volumen, velocidad y tiempo específico en la matriz. Adicionalmente la solución de formol éter de nuestro procedimiento no utiliza formol sino formaldehído al 37%, lo cual permite conservar las estructuras y la morfología intacta de los protozoos y así, esto se facilita la identificación a nivel de microscopia, esta es una innovación propia que no ha sido utilizada por ningún otro inventor.

El documento D2 divulga un método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en muestras sólidas fecales que hace una etapa de sedimentación tratamiento con formoletiler y una etapa de flotación (Resumen). Este método es diferente ya que se aplica a muestras sólidas fecales y el procedimiento que nosotros desarrollamos es para muestras líquidas.

6. Sobre el Examen de Patentabilidad.

Rta: Se realizó la revisión de los documentos de acuerdo a la **tabla 1 Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:**

Características esenciales	D1	D2	Respuesta
Método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos, caracterizado porque comprende	Método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en agua, caracterizado porque comprende. (Pág. 378, Sección 2.2.)	Método para recuperar quistes y Ooquistes de protozoos en muestras sólidas (Resumen- Pág. 882, Columna 1, Ln. 17- 27)	Diferencia con D2. Muestras sólidas, y el método a patentar es para muestras líquidas

Tomar entre 1 y 10 litros de líquido de interés;	Tomar 10L de agua (Pág. 378, Sección 2.2.)	Tomar 5 mL de la muestra preservada en formalina (Pág. 882, Columna 2, Ln. 16- 33)	Diferencia con D2. En el método descrito el volumen de la muestra es de 5 ml. En la prueba a patentar se utilizan 10 litros según evaluación de aplicabilidad, puesto que al evaluar volúmenes inferiores a 10 L la sensibilidad del método es inferior, esto se ha confirmado en los ensayos intra e interlaboratorio, en estos últimos realizados de forma semestral hace 3 años se evidencia para las muestras recuperadas con el método presentado en volúmenes inferiores a 10 L una pérdida marcada de las formas quísticas pasando de recuperar el 80% si se hace en 10 L a 20% si se hace en volúmenes de 4 ml. Por lo tanto, es el volumen de 10 L el que permite obtener los resultados óptimos de recuperación.
Centrifugar a una velocidad entre 1700 rpm y 3300 rpm;	Centrifugar a 1600g (4000rpm) (Pág. 378, Sección 2.2.)	Centrifugar a una velocidad de 1500rpm (Pág. 882, Columna 2, Ln. 16- 33)	Diferencia con D1 y D2. La velocidad de centrifugación es de 3500 rpm durante 10 minutos según evaluación de aplicabilidad. De acuerdo a los

			resultados obtenidos en los ensayos de validación del método, el modificar estas velocidades y tiempos disminuye de forma significativa el nivel de sensibilidad del método. Los protozoos en sus formas parasitarias quistes y ooquistes están compuestos en sus membranas celulares de proteínas y polisacáridos los cuales les permiten tener unas densidades químicas que se ven afectadas por la velocidad y los tiempos lo que repercute en el porcentaje de recuperación. Hemos demostrado que la recuperación se ve afectada por la velocidad y el tiempo utilizados.
Tomar una alícuota del concentrado entre 5 y 10 ml;	Tomar pellet y suspenderlo en 5mL de solución salina (Pág. 378, Sección 2.2.)	Tomar pellet y suspenderlo en 10mL de agua destilada	Diferencia con D1. La Alícuota no se resuspende en solución salina. Diferencia con D2 La alícuota no se resuspende en agua destilada puesto que la estabilidad en la estructura de los agentes parasitarios con relación a la temperatura y el tiempo en esta matriz no se mantienen, pues cuando

			transcurren más de 8 días la morfología de los parásitos recuperados se pierde pues se observan amorfos o con ruptura en su pared celular. En el procedimiento validado la alícuota debe ser resuspendida en Formol salino al 5% al resuspender en solución de formol salino, se conserva la morfología del quiste/ooquiste.
Adicionar 5 a 15 ml de solución de formol salino al 10% y de 1 a 5 ml de éter anhidro;	Adicionar 5mL de formol 10% (se forma formol salino al mezclarse con la solución salina del paso anterior) y 3 mL de dietil eter (Pág. 378, Sección 2.2.)	Adicionar 3mL de etil éter (Pág. 882, Columna 2, Ln. 16- 33)	Diferencias con D1. No se utiliza formol al 10 % en nuestro método se utiliza formaldehído al 37% tal y como se observa en el ajuste a la reivindicación 1. Puesto que el formaldehído permite conservar las estructuras y la morfología intacta de los protozoos y así, esto se facilita la identificación a nivel de microscopia, esta es una innovación propia que no ha sido utilizada por ningún otro inventor.
Agitar y centrifugar entre 900 rpm y 1450 rpm;	Agitar y centrifugar a 1000g (2200rpm) (Pág. 378, Sección 2.2.)	Agitar y Centrifugar a una velocidad de 1500rpm o menos	Diferencia con D1 Y D2 Las velocidades en centrifugación son diferentes entre los métodos. Este paso

		(Pág. 882, Columna 2, Ln. 16- 33)	se realiza agitando y centrifugando a 2500 rpm tal como se observa en el ajuste a las reivindicación 1
Descartar sobrenadante y tomar alícuota de precipitado;	Descartar sobrenadante y tomar sedimento (Pág. 378, Sección 2.2.)	Descartar sobrenadante y tomar sedimento Pág. 882, Columna 2, Ln. 16- 33)	En los métodos de concentración este paso es similar. Ya que las formas a observar se encuentran en el sedimento o pellet
Visualizar los quistes y ooquistes con anticuerpos específicos del protozoo por inmunofluorescencia, o métodos de detección equivalentes;	Visualizar por inmunofluorescencia	Hacer conteo por inmunoelectroforesis Pág. 883, Columna 2, Ln. 5)	Diferencia con D2. Utiliza inmunoelectroforesis diferente a la inmunofluorescencia. Además el método a patentar no se limita solo a la identificación por microscopia, sino que puede aplicarse luego de la detección por técnicas moleculares que amplifican ADN o ARN.
donde el método para recuperar quistes y ooquistes no requiere filtración ni ultrafiltración de la muestra de interés.	No requiere filtración (Pág. 379, Sección 4.)	No menciona	El método favorece la relación costo beneficio referente a la concentración de quistes y ooquistes en muestras de agua, puesto que los materiales proceso y reactivos requeridos para el desarrollo de este son mucho más económicos que los avalados por el método de ultrafiltración. Esta relación costo beneficio impacta en gran medida a las

			empresas potabilizadoras de agua de la nación puesto que favorecen la aplicación de monitoreos en puntos críticos de forma constante, situación que no se cumple con el método de ultrafiltración por sus altos costos.
--	--	--	---

En conclusión, para responder la pregunta que realiza el Examinador: ¿Cómo modificar el método conocido en D1, para obtener un método alternativo para recuperar quistes y ooquistes de protozoos de una muestra?, teniendo en cuenta que la velocidad de centrifugación en métodos para recuperar quistes y ooquistes de protozoos de una muestra ya está divulgado en el documento D2, se explica lo siguiente:

Existen dos factores por los cuales el método a patentar es diferente con D1. **El primero** es la solución de precipitación. En D1 se utiliza una solución de formol salino, y en nuestro método utilizamos formaldehído al 37%. Esta modificación permite conservar la estructura y la morfología del quiste/ooquiste para ser visualizados e identificados por diferentes técnicas de microscopía. **La segunda** característica a resaltar son las velocidades y los tiempos, pues en nuestro método se estableció durante los procesos de validación inter e intra laboratorio que se debe utilizar un volumen específico de 10 litros y unas velocidades y tiempo definidas en el invento. Los protozoos en sus formas parasitarias quistes y ooquistes están compuestos en sus membranas celulares de proteínas y polisacáridos los cuales les permiten tener unas densidades químicas que se ven afectadas por la velocidad y los tiempos lo que repercute en el porcentaje de recuperación, el cual pasa de un 80 a 90% a un 20 a 10% cuando se disminuyen volúmenes, velocidad y tiempos diferentes a los de nuestro invento.

Cabe mencionar que:

El método que se requiere patentar **no es obvio**, porque desde 2016 (el año que fue publicado el artículo en *Water Research*) ha tenido más de 15 citaciones en diferentes artículos, pero ninguno de ellos ha reproducido el método ni se han obtenido los mismos resultados. Por ende, el método no es reproducible a partir del artículo.

El método que se requiere patentar **no es obvio** porque desde el 2013 nosotros realizamos validación inter laboratorio con el grupo francés AGLAE y no existe ningún otro laboratorio en el mundo que realice este método y obtenga porcentajes de recuperación aceptables sin utilizar filtración. Esta es una invención de bajo costo y que hace el método accesible a diferentes sectores de la sociedad que requieren este tipo de estudios. A continuación, se relaciona la tabla con los resultados de las validaciones del método en el programa de validación inter laboratorio establecido por el grupo Europeo AGLAE y en el cual participan

21 laboratorios de todo el mundo. Como se puede observar siempre hemos tenido una calificación de A, en comparación con otros laboratorios. Cabe resaltar que somos los únicos que no utilizamos el proceso de filtración.

Fecha	<i>Giardia</i> % recuperación	<i>Score</i>	<i>Cryptosporidium</i> % recuperación	<i>Score</i>
9/04/2015	45%	A	27%	A
24/05/2018	55%	A	63%	A
10/07/2019	64%	A	66%	A

Tabla 1: Reporte de resultados obtenidos durante los años 2015, 2018 y 2019 en los ensayos inter laboratorios con AGLAE para la evaluación de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua recuperados por el método presentado

Anexo al presente oficio

- Copia de la solicitud de patente con los ajustes aquí establecidos.

MÉTODO DE RECUPERACIÓN POR CENTRIFUGACIÓN Y CONCENTRACIÓN EN FORMOL-ETER DE PROTOZOOS PARA MUESTRAS DE AGUA POTABLE

5 Campo Tecnológico

El objeto de la presente invención está relacionado con un método para la recuperación o detección de protozoos en diferentes etapas del ciclo biológico, a partir de líquidos. La presente invención tiene aplicación en el sector de la industria del agua, calidad de agua, y sanidad ambiental.

Antecedentes de la invención

Cada vez es mayor el número de protozoarios patógenos causantes de gastroenteritis en la población humana y el problema aumenta por las diversas rutas ambientales que pueden ser usadas para la transmisión (Plutzer & Karanis, 2016). Los protozoarios implicados en transmisión por agua más importantes son *Giardia* y *Cryptosporidium* (Baldursson & Karanis 2011). Los tratamientos de agua para consumo humano remueven en diferentes grados estos dos protozoarios, pero sin eliminarlos completamente. La filtración lenta en arena es capaz de retirar entre 93% y 100% de *Giardia* (Fogel 1993, desde World Health Organization, 2004). Con *Cryptosporidium*, las remociones han alcanzado entre 99,99% (4 log) y 99,997% (5 log) (Timms 1995, desde World Health Organization, 2004). A pesar de estos aparentemente altos niveles de eliminación, se ha encontrado que varios factores pueden influir sobre la eficacia de estos métodos, tales como la temperatura o la cantidad inicial presente de quistes de *Giardia* o *Cryptosporidium*, lo que puede llevar a que los diversos métodos utilizados tales como ozono o luz ultravioleta no sean completamente eficaces para eliminar el riesgo de infección en los consumidores (Betancourt & Rose 2004).

El agua por sus diversos empleos y calidades juega un papel importante en las vías de transmisión de microorganismos patógenos, por ello en Colombia se ha incluido la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* como indicador de la calidad del agua para consumo humano según la Resolución 2115 del 22 de junio del 2007 del Ministerio de la Protección Social y el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. *Cryptosporidium* y *Giardia* son protozoarios de importancia en la salud pública debido a que son causa de infecciones gastrointestinales en

niños y en población inmunosuprimida. Estos organismos poseen una estructura quística que los rodea y los protege de ciertas condiciones ambientales, los hace resistentes a la desecación, a la carencia de nutrientes, a las altas temperaturas, a la escasez de oxígeno, a la respuesta inmune del huésped y a la desinfección en plantas de tratamiento de agua potable y aguas residuales (Alarcón 2005). *Giardia* se considera el parásito más importante en la industria del agua porque se ha encontrado como agente etiológico responsable de varios brotes epidémicos relacionados con consumo de agua tratada o para uso recreacional, como las piscinas, en diversas partes del mundo (Solarte 2006).

10

Los tratamientos del agua para consumo humano remueven en diferentes grados estos dos protozoarios. La filtración lenta en arena es capaz de retirar entre 93% y 100% (Fogel 1993) de *Giardia*. Con *Cryptosporidium*, las remociones han alcanzado entre 99,99% (4 log) y 99,997% (5 log) (Timms 1995). Se discute con base en la evidencia epidemiológica, que los niveles de quistes de *Giardia* que persisten en el agua potable (0,11 quistes/l) después de los procesos de filtración no son capaces de causar infecciones, pero es necesario realizar vigilancia de sus niveles para garantizar la potabilidad del agua.

20

El primer método que se utilizó para la detección de protozoos en agua fue ICR (Reglas de Colecta de Información) recomendado por la EPA en 1998 (Agencia de Protección Ambiental), pero este método presentó muchos problemas ya que reportaba falsos positivos y falsos negativos además de ser poco preciso y exacto (McCuin *et. al.* 2003). En 1990, hubo un aumento en la infección por *Cryptosporidium* de manera dramática a partir de agua contaminada, lo que propició la evaluación de nuevos métodos de detección de protozoos patógenos en el agua, en 1997 la EPA desarrolla el método 1622 específico para la detección de *Cryptosporidium*, el cual incluyó un filtro que incrementa la captura de ooquistes por dilución, también incorpora la técnica de separación inmunomagnética (IMS) que permite la concentración específica de microorganismo, reduce los falsos positivos, disminuye las interferencias inespecíficas y adiciona un paso de tinción mediante inmunofluorescencia (IF) como prueba confirmatoria (Kazuo *et al* 2001). El método 1622 se modificó y se desarrolló el método 1623 que es la referencia actual para detección de protozoos en agua como control de calidad por parte de las empresas de agua en Estados Unidos y Europa. El método 1623 incluye un nuevo filtro (IDEXX Filta Max) el cual

35

puede filtrar volúmenes más grandes (hasta 2000 Litros) y se adiciona la detección de quistes de *Giardia*.

5 Actualmente, la EPA (Agencia de Protección Ambiental) de Estados Unidos, ha desarrollado ensayos y procedimientos para la purificación y la concentración de los quistes u ooquistes, una de esos métodos es el uso de la separación inmunomagnética (IMS) la cual ha sido implementada en el método 1623 (McCuin R.M *et. al.*,2005) certificado como método para el aislamiento de protozoos, ya sea en volúmenes de alta capacidad (hasta 1.000 litros) o baja capacidad (de 10 a 10 50 litros) ya que su proceso de recuperación de quistes y ooquistes está basado en cuatro pasos o etapas: (1) la filtración de agua, dando como resultado los quistes o ooquistes y materiales extraños que se retienen en el filtro; (2) la elución y proceso de separación, que implica la purificación y concentración de quistes u ooquistes por IMS y el descarte de la material extraño; (3) la tinción con 15 anticuerpos fluorescentes específicos (FA y DAPI) con un porcentaje del 80 al 100%, (Fletcher S.M et al, 2012).

Otras técnicas también pueden ser utilizados para la recuperación de quistes u ooquistes como son: la utilización de sustratos con diferente gradiente de 20 densidad como el proceso de floculación en donde se utiliza carbonato de calcio con un porcentaje de recuperación de 70% (Campbell, 1994), sulfato de férrico con un 68% de recuperación y sulfato de aluminio con un 67,8% (Karanis, 2002).

Una primera desventaja de los métodos anteriores es la necesidad de emplear 25 filtros y membranas, ya que son costosos, no son reutilizables y limitan la velocidad y capacidad de detección. En plantas de tratamiento localizadas en regiones que no tienen recursos no pueden acceder al método 1623, por lo tanto, se dificulta el cumplimiento de la norma.

30 Una segunda desventaja es la limitación que se presenta en matrices de agua con alta turbidez y materia orgánica, donde se pueden obstruir los filtros, dificultando así la recuperación de quistes y ooquistes. Además, este procedimiento requiere altas concentraciones de protozoos y volúmenes altos de muestra para lograr una adecuada detección.

35

Otras formas de detección de parásitos, son divulgadas en los siguientes documentos de patente:

El documento US4081356 divulga un dispositivo denominado “fecalador” con forma de tubo de ensayo alargado, donde en un extremo tiene un filtro de acero inoxidable y en el intermedio una cámara separadora. Este dispositivo está
5 diseñado para trabajar con muestras fecales y logra separar huevos de parásitos, por medio de filtrado de la muestra y separación por fases.

El documento US8614083 enseña un dispositivo que reúne un recipiente de separación centrífuga desechable, comprendiendo el recipiente de centrifugación
10 un material cargado positivamente en su núcleo interno. El método permite concentrar parásitos de tipo protozoos, bacterias, virus y toxinas, presentes en grandes cantidades de líquido, mediante un paso de centrifugación seguido de una aplicación de carga negativa/positiva sobre el líquido en análisis. Este método requiere entonces para su implementación un dispositivo especial y la aplicación
15 de cargas eléctricas.

La invención EP0517154 proporciona métodos para detectar microorganismos, especialmente especies de *Giardia*, en agua y otras muestras. Los métodos se basan en sondas de ácido nucleico y cebadores de amplificación específicos para
20 subsecuencias del gen que codifica giardina. Además, esta invención proporciona un medio para distinguir entre organismos vivos y muertos transmitidos por el agua tales como quistes de *Giardia* basados en la presencia o ausencia de mRNA inducido por calor.

El documento US5770368 proporciona procedimientos y kits para detectar formas encriptadas de protozoos, particularmente *Cryptosporidium* y *Giardia*, que son viables e infecciosas. Para determinar la viabilidad, los quistes u ooquistes se calientan a una temperatura que induce la transcripción de genes de proteína de choque térmico (HSP). Alternativamente, para determinar la infectividad, las
30 formas enquistadas se inoculan sobre cultivos celulares susceptibles. La viabilidad o infectividad de las formas encriptadas se puede determinar sintetizando un ADNc a partir de una plantilla de ARN de HSP inducida usando un cebador que es específico para un género o especie particular de protozoos, seguido por la amplificación enzimática del cDNA.

Estos documentos enseñan métodos de detección que requieren sondas de ácidos nucleicos y procesos de amplificación de DNA, o dispositivos especiales

para lograr la detección de los huevos parasitarios, haciendo complejo, demorado y costoso el proceso de detección de éstos.

Breve descripción de la invención

5

La presente invención desarrolla un procedimiento que recupera quistes y ooquistes de protozoos con el mismo porcentaje del Método 1623 (70-80%), pero no se utilizan filtros o membranas, ni sondas de ácido nucleico especie específica. Por lo tanto, es un procedimiento de bajo costo, rápida aplicación y amplio espectro de detección de especies parasitarias. Además, el aumento de la turbidez y la materia orgánica no afecta el porcentaje de recuperación o detección de los protozoos.

El proceso aquí divulgado es simple de operar, rápido, y robusto. El proceso de concentración de la muestra y elución es completamente automatizado y el concentrado resultante es pequeño en volumen y presentable a una variedad de métodos de detección.

Una modalidad de la invención es un método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos, comprende las siguientes etapas:

- a) Tomar 10 litros de líquido de interés;
- b) Centrifugar;
- c) Tomar una alícuota del concentrado entre 5 y 10 ml;
- d) Adicionar 5 a 15 ml de solución de formaldehído al 37% más cloruro de sodio al 0,8% y 1 a 5 ml de éter anhidro;
- e) Agitar y centrifugar;
- f) Descartar sobrenadante y tomar alícuota de precipitado;
- g) Visualizar con anticuerpos específicos protozoo por inmunofluorescencia o métodos equivalentes donde no se requiere etapa de filtración o ultrafiltración para el desarrollo del proceso.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención permite la recuperación o detección de quistes y huevos
5 parasitarios, especialmente de protozoos, y más especialmente de *Giardia* y *Cryptosporidium* en cualquier tipo de líquido.

Una característica fundamental del método aquí revelado es que no requiere
filtración ni ultrafiltración de la muestra líquida a analizar, por lo que se evita el uso
10 de estos filtros, el tiempo que tomaría esta etapa y los dispositivos empleados
para ello.

El método realizado requiere una preparación inicial para el/los recipientes(s)
empleado(s) para recolectar las muestras a analizar, estos es realizar una limpieza
15 de los recipientes con los métodos tradicionales o métodos de esterilización.
Además, colocar tensoactivo en su interior, de manera que se disminuya la
presencia de residuos y la adhesión de los huevos parasitarios en la superficie
interior.

20 Para ello, se recomienda toma un recipiente plástico estéril de 10 Litros. El frasco
debe lavarse previamente con solución tampón fosfato salino a pH 7,0 más Tween
80 para desprender cualquier residuo y/o contaminante.

El recipiente así tratado, se lleva a la fuente de agua o matriz de agua a analizar.
25 Es importante cerrar herméticamente el recipiente, y transportarlo al laboratorio
procurando mantener sus condiciones estables.

El método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos,
comprende las siguientes etapas:

- 30 a) Tomar entre 1 y 10 litros de líquido de interés;
b) Centrifugar a una velocidad entre 350g (1700 rpm) a 1300g (3300 rpm);
c) Tomar una alícuota del concentrado entre 5 y 10 ml;
d) Adicionar 5 a 15 ml de solución de formaldehído al 37% más cloruro de
sodio al 0,8% y 1 a 5 ml de éter anhidro;
35 e) Agitar y centrifugar entre 100g (900 rpm) a 250g (1450 rpm);
f) Descartar sobrenadante y tomar alícuota de precipitado;

g) Visualizar con anticuerpos específicos del protozoo por inmunofluorescencia o métodos de detección equivalentes.
donde no se requiere etapa de filtración o ultrafiltración de la muestra a analizar para el desarrollo del proceso.

5

La agitación de la etapa e) se realiza preferiblemente en movimientos verticales constantes, por un periodo entre 2 a 5 minutos.

10

Los métodos de detección que pueden ser empleados después de realizar el proceso de detección de formas protozoarias de la presente invención, incluyen inmunofluorescencia, tinción por lugol, observación al microscopio, PCR, iRNA, y otros métodos conocidos por el técnico medio del campo.

Preparación de los reactivos de concentración de los quistes/ooquistes:

15

La preparación de la solución de formalina-éter, comprende 10 ml de formaldehído al 37% (CH_2O) más 90 ml de NaCl al 0.8%. Esta solución final es de formol salino al 10% a la cual luego se le agregan 5 ml de dietiléter (C_2H_5)₂O.

20

La solución de NaCl al 0.8 % empleada en la solución de precipitación y se realiza agregando 0.8 gr de NaCl en 100 ml de agua destilada.

25

La solución de precipitación puede utilizarse en dos presentaciones: en forma de solución formol salino de una parte y dietiléter (C_2H_5)₂O, de otra parte, para ser preparada al momento de realizar la detección, o en una única preparación. Esta se prepara con mínimo 2 horas antes de realizar el procedimiento y se conserva durante 15 días.

30

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Proceso de detección de quistes y ooquistes de protozoos en agua potable

35

A continuación, se describirá paso a paso el procedimiento de recuperación de quistes y ooquistes de protozoos en agua potable.

1. Se toma un recipiente plástico estéril de 10 Litros. El frasco debe lavarse previamente con 100 ml de solución tampón fosfato salino a pH 7,0 más 1,0 ml de Tween 80 para desprender cualquier residuo u/o contaminante. Se deben tomar 10 litros, a volúmenes inferiores se afecta el porcentaje de recuperación, que pasa de 80 a un 90% para volúmenes de 10 Litros a un 20 a 10% si se aplica en volúmenes inferiores a 10 litros de agua. Esta recomendación se ha basado en los procesos de validación intra e interlaboratorio en los cuales se han comparado volúmenes de 4 ml y 10 Litros y se ha encontrado que el método es óptimo sólo para volúmenes superiores a 10 litros.
2. Se lleva a la fuente de agua o matriz de agua a analizar. Se cierra el recipiente, se transporta al laboratorio procurando que quede bien cerrado
3. Se inicia el proceso de concentración del volumen de agua colectado, por centrifugación a una velocidad entre 350 g (1700 rpm) a 1300 g (3500 rpm) por un tiempo entre 5 a 15 minutos, hasta obtener un volumen entre 5 a 10 ml. Específicamente la velocidad utilizada para recuperar los quistes y ooquistes es de 3500 rpm por 10 minutos. la velocidad y el tiempo son importantes para la precipitación de las formas parasitarias debido a su composición bioquímica de la pared de los protozoarios, la concentración proteica y de sus polisacáridos. afectan el proceso de precipitación a velocidades y tiempos inferiores. Durante la validación del método se evaluaron estos aspectos.
4. Al volumen de 5 ml se le adiciona entre 5 a 15 ml de solución de formaldehído al 37% más 90 ml de cloruro de sodio al 0,8%, en un tubo falcón de polipropileno de 50 ml, fondo cónico y de dimensiones 17x120 mm. Se mezclan estos reactivos y se le adiciona de 1 a 5 ml de éter anhidro. El formaldehído al 37% es una innovación con respecto a los otros métodos de concentración en los que se utiliza formol. este cambio se realizó para conservar la morfología del quiste /ooquiste y facilitar su identificación por microscopía óptica o inmufluorescencia.
5. Se agita fuertemente por dos minutos y se destapa el tubo suavemente para que salga el gas que se genera de la mezcla del formol salino con el

éter y luego se centrifuga entre 100g (900 rpm) a 250g (1450 rpm) por un tiempo entre 1 a 5 minutos.

6. Se descarta el sobrenadante dejando un volumen de precipitado entre 250 µl a 1000 µl.

7. Se visualiza por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-*Giardia* o anti-*Cryptosporidium* o se realiza amplificación de ADN para cada protozoo por medio de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (ADN o ARN).

Ejemplo 2. Evaluación de aplicabilidad del método.

Para evaluar la aplicabilidad del método se realizaron 10 repeticiones del se tomaron 10 litros de agua, se le adicionaron 10 quistes/ooquistes de cada protozoo a evaluar. Posteriormente se analizaron los siguientes parámetros a los resultados obtenidos:

Aplicabilidad: se determinan las características generales del método, el tipo de muestras que se van a analizar y el analito a determinar.

Límite de detección: Es la menor cantidad del analito que puede ser detectada en la muestra y se expresa como $LD = X + 3S$ donde X representa el promedio de las mediciones del ensayo y S la desviación estándar de las mediciones (guía AOAC internacional).

Límite de cuantificación: El límite de cuantificación determina la concentración mínima del analito que puede ser determinada cuantitativamente por la prueba y se establece considerando la expresión $LC = X + 10S$, donde X representa el promedio de las mediciones del ensayo y S la desviación estándar de las mediciones (guía AOAC internacional).

Exactitud: Busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y azarosos sobre los resultados. Así, la exactitud se estudia normalmente como **certeza** y **precisión**.

Certeza (de un método): Es una expresión de cuán cerca está la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) del valor verdadero. Normalmente se expresa en términos de **sesgo**, para lo cual se obtiene el valor absoluto de la comparación entre el promedio de los valores obtenidos (X) y el valor de referencia (μ): $s = | X - \mu |$

Incertidumbre: Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (OAA. DCLE- 05).

Generalmente es una desviación estándar o un intervalo de confianza y su estimación toma en cuenta todos los efectos reconocidos que operan sobre el resultado.

Recuperación: Fracción de analito que se agrega a una muestra de ensayo (inoculo artificial o “spiked”) antes del análisis, con el objetivo de evaluar la eficiencia del método para detectar todo el analito presente en una muestra.

Muestra utilizada para el ensayo: Agua de la llave hervida por 20 minutos. Los parásitos utilizados fueron *Giardia duodenalis* sp aislado de humanos y donados (Instituto Pedro Kouri.) *Cryptosporidium* sp (Universidad de Arizona) *Toxoplasma* sp (USDA, Belstville) y cuantificados por hemocitometro

Las características del método validado por el laboratorio son:

Protozoario analizado	Porcentaje de recuperación promedio ± desviación estandar	Incertidumbre (Intervalos de confianza)	Desviación estandar relativa	Límite de detección	Límite de cuantificación
<i>Cryptosporidium parvum</i>	71.3±12.5	70.5-72.1	17.5	5.5	18.4
<i>Giardia duodenalis</i>	63.6±10.9	62.8-64.5	17.2	4.7	15.9
<i>Toxoplasma gondii</i>	91.6±9.5	90.8-92.5	9.8	2.8	9.4

Recuperación: Los porcentajes de recuperación son para *Cryptosporidium* 71.3±12, para *Giardia* 63±10 y para *Toxoplasma* 91.6±9.

Este ensayo permitió conocer el desempeño del método a través de los parámetros evaluados. Los límites de detección y cuantificación alcanzados con el

método propuesto son favorables para la identificación de bajas concentraciones de protozoos en muestras de agua; es decir a partir de formas de parasitarias este método puede detectarlo en un volumen de 10 litros de agua.

5 Ejemplo 3. Preparación de la solución de formalina éter

Se agrega 10 ml de formol salino al 10%. Esta solución se preparará agregando 10 ml formaldehído al 37% (CH_2O) más 90 ml de NaCl al 0,8%; el cloruro de sodio se realiza agregando 0,8 gr de NaCl en 100 ml de agua destilada. Esta solución
10 final es de formol salino al 10%, de esta solución se adiciona 10 ml por cada 5 ml de muestra más 5 ml de dietiléter (C_2H_5)₂O.

El término “líquido” en la presente invención incluye agua potable, aguas residuales, aguas tratadas, aguas no tratadas, bebidas, vinos, y otros líquidos o
15 mezclas de éstos.

El término “parásito” se refiere a cualquier especie de patógeno protozoo transmitido por el agua, tales como especies de *Giardia sp.*, *Cryptosporidium sp.*, *Cyclospora sp.* y *Microsporidia sp.* *Toxoplasma sp.* *Blatocystis sp.*
20

Las "especies de *Giardia*" son miembros de la familia Hexamitidae. Debe tenerse presente que la taxonomía de eucariontes es dinámica y que especies adicionales pueden ser nombradas, o que estas especies algún día pueden ser incorporadas en una familia o género alternativo.
25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
- a) Tomar 10 litros de líquido de interés;
 - b) Centrifugar a una velocidad de 1300 g por diez minutos
 - c) Tomar una alícuota del concentrado entre 5 y 10 ml;
 - 10 d) Adicionar 5 a 15 ml de solución de formol salino al 10% y de 1 a 5 ml de éter anhidro;
 - e) Agitar y centrifugar entre 100 g a 250 g; en esta etapa se produce gas de reacción, como producto de la agitación y mezcla del formol salino al 10% y el éter anhidro.
 - 15 f) Descartar sobrenadante y tomar alícuota de precipitado; visualizar con anticuerpos específicos del protozoo por inmunofluorescencia o métodos de detección equivalentes, el método no requiere filtración ni ultrafiltración de la muestra de interés.
- 20
2. El método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos de la reivindicación 1 **caracterizado porque**, para el desarrollo de este se debe
- a) tomar un volumen de 10 litros en recipientes estériles b) en el proceso de recuperación se Centrifuga a una velocidad de 1300 g y a un tiempo de
- 25 duración 10 minutos.
3. Preparación de la solución para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos de la reivindicación 1 **caracterizada porque**, comprende una solución de formol salino al 10% compuesta de 10 ml de formaldehído al
- 30 37% y 90 ml de solución salina al punto 0.9%.
4. El método para recuperar quistes y ooquistes de protozoos en líquidos de la reivindicación 3 **caracterizado porque** después de agitar se deja liberar el gas de la reacción.

RESUMEN

La presente invención divulga un procedimiento alternativo al método de filtración por membrana para la recuperación de formas parasitaria de protozoos, que requiere un volumen de agua de 10 litros y tiempo de 10 minutos a 1300 g, además de usar el formaldehído al 37% para conservar las estructuras celulares y facilitar su identificación por microscopia. Este protocolo permite detectar la presencia de bajas concentraciones de protozoos (10 quistes/ooquistes), usando etapas sucesivas de centrifugación, concentración, y separación por fases a partir de composiciones de formaldehído al 37%, NaCl y éter anhidro.

15

20

25