



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00387

(22) Data de depozit: 07/07/2020

(41) Data publicării cererii:  
29/01/2021 BOPI nr. 1/2021

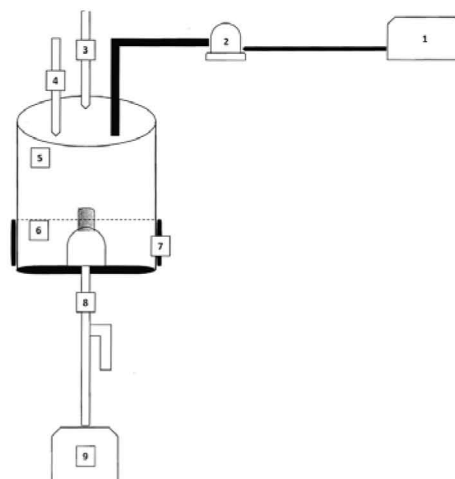
(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE  
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
DIN BUCUREȘTI - USAMVB, BD. MĂRĂȘTI,  
NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• VAMANU EMANUEL,  
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,  
BL.A 10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ DE TESTARE A INFECȚIEI URINARE  
CU ESCHERICHIA COLI ȘI SISTEM *IN VITRO*  
PENTRU APLICAREA ACESTEIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un sistem *in vitro* pentru testarea infecției urinare cu *Escherichia coli* și la o metodă de testare. Sistemul conform invenției este constituit dintr-un vas (1) Duran cu volumul de minim 1 litru, prevăzut cu două orificii, care conține urină artificială sterilizată, o pompă (2) peristaltică, pentru administrarea regulată de urină din vasul (1) cu un debit de 0,4 ml/min controlat printr-o priză cu temporizare, un punct (3) de inoculare cu tulpina testată realizat dintr-un sept din silicon, cultura stoc având o viabilitate minimă de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, în NaCl 0,9% steril, un furtun (4) din silicon cu diametrul de 0,45 μm terminat într-un filtru Millipore, un vas (5) de simulare *in vitro* a vezicii urinare, cu un volum de minim 250 mL, în care se află amestecul (6) de reacție format din urină simulată, produsul testat și tulpina microbiană, un sistem (7) de menținere a temperaturii la 37°C, un cateter (8) urinar și un vas (9) Duram steril prevăzut cu două orificii pentru colectarea probelor. Metoda conform invenției are o etapă inițială de inoculare a mediului din vasul (5) de simulare, după care se adaugă produsul de testat prin septul (3) păstrând temperatura constantă la 37°C, asigurându-se un debit și un timp de interacțiune constant odată cu colectarea probelor în vasul (9) și cu determinarea viabilității.



Revendicări inițiale: 1  
Revendicări amendate: 2  
Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## Metodă de testare a infecției urinare cu *Escherichia coli* și sistem *in vitro* pentru aplicarea acesteia

Sistemul propus, bazat pe o metodă *in vitro*, își propune brevetarea unui simulator al vezicii urinare destinat testării unor produse împotriva infecțiilor recurente cu *Escherichia coli*. Metoda presupune utilizarea unei tulpini control ca agent biologic pentru simularea infecției de la nivelul vezicii urinare umane. Efectul antimicrobian va exprima eficiența clinică a produsului testat *in vitro*, în vederea validării preclinice de la nivel de laborator.

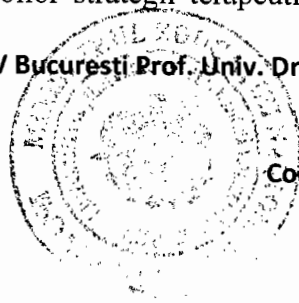
Diverse modele *in vitro* sunt utilizate pentru a determina efectul unor suplimente funcționale sau medicamente asupra infecțiilor recurente cu tulpini uropatogene (*Escherichia coli*, *Candida* sp., *Proteus mirabilis*). Cu toate acestea, formarea biofilmului microbial *in vivo* este dificil de determinat și caracterizat. Pentru a elimina acest obstacol se utilizează modele *in vitro* care pot oferi o imagine a structurii biofilmului ce se formează, dar și a eficienței produsului testat. Pentru a putea corela datele *in vitro*, cu cele *in vivo*, modelele cu o curgere constantă sau regulată sunt acceptate în literatura de specialitate [1].

Pentru astfel de studii se utilizează urină artificială sau poate fi utilizată și urină recoltată de la pacienți, sterilizată. A doua variantă poate fi destinată studiului personalizat, în situația în care se urmărește evoluția infecțiilor bacteriene la grupuri țintă de populație. Infecțiile urinare fac parte din categoria celor nosocomiale din cauza frecvenței ridicate din spitale. Ambele variante de mediu utilizat în simulare susține creșterea bacteriilor deoarece respectă toate cerințele unui mediu de cultură clasic [2].

Astfel, metoda și sistemul *in vitro* au un caracter inovativ prin introducerea unei noi modalități practice de evaluare a potențialului antimicrobian al unor produse biofarmaceutice. Această cerere de brevet propune o modalitate ușor de aplicat la nivel de laborator, în faza de concepere și testare a unui produs din industria biofarmaceutică. Sistemul *in vitro* elimină o problemă majoră, aceea a caracterizării efectului unui produs de tipul suplimentelor funcționale. Se va determina o imagine a eficacității și rolului unor produse noi, cu efect antimicrobian, cu rol în diminuarea formării biofilmului de la nivel urinar.

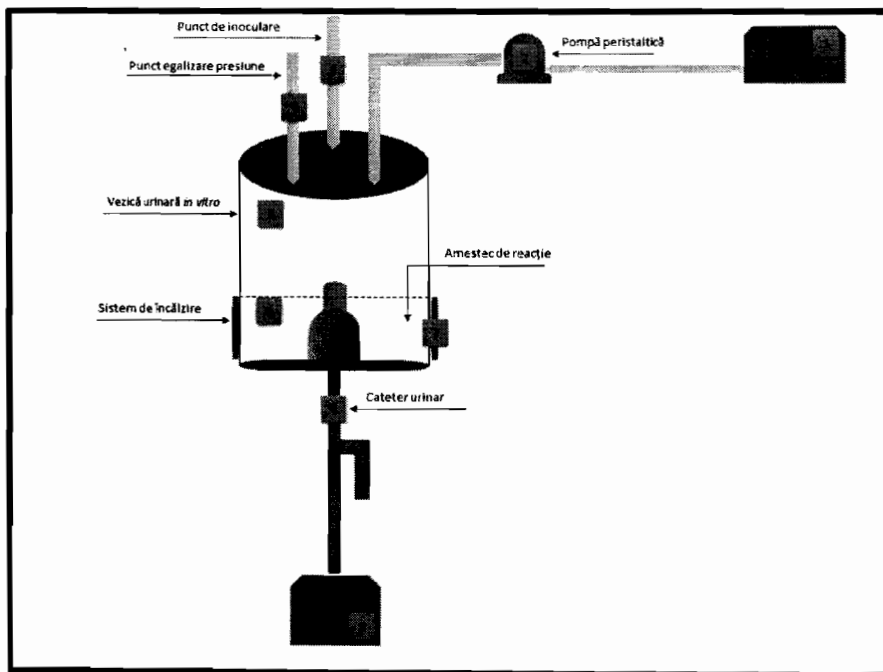
Necesitatea dezvoltării unor sisteme *in vitro* pentru studiul infecțiilor recurente cu *E. coli* rezultă din interpretarea unor factori relevanți pentru evaluarea riscului de infecție prin folosirea unui cateter urinar și din evaluarea noilor strategii terapeutice împotriva creșterii

Rector USAMV București Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



Conf dr. Vermanu Emanuel

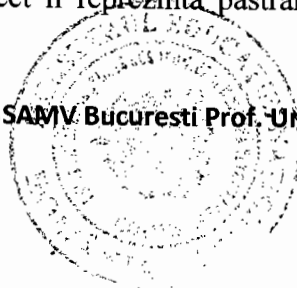
rezistenței la antibiotice. Aceste sisteme respectă condițiile fizico-chimice de la nivelul vezicii urinare și trebuie să simuleze, cât mai exact, interacțiunea cu epiteliul uman, dar să și faciliteze posibilitatea colonizării microbiene. Modelul propus se dorește a fi unul dinamic, care permite o eliminare fiziologică a cantității de urină în 24 de ore [3]. Metoda și sistemul *in vitro* de simulare se bazează pe determinarea viabilității, dar pot fi luate în calcul și alte mecanisme ce pot să influențeze efectul biologic (de exemplu, stresul oxidativ). Această metodă poate fi utilizată, în funcție de scopul cercetărilor efectuate, și pentru alte tulpini microbiene, de exemplu microorganisme eucariote – *Candida albicans*.



**Figura 1.** Reprezentarea schematică a modelului *in vitro* dezvoltat prin cererea de brevet

În plus, aceste sisteme *in vitro* pot realiza și o testare a unor catetere inovative care să prevină formarea biofilmului, având în compoziția lor materiale cu proprietăți antimicrobiene (de exemplu, nanoparticule). La ora actuală nu există biomateriale utilizate pentru catetere urinare care să fie în totalitate biocompatibile cu epiteliul uman. Proprietățile materialului vor imprima și valoarea biologică. Acest aspect este important și în realizarea simulatorului care va trebui să permită colonizarea. Un alt aspect îl reprezintă păstrarea temperaturii fiziologice

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



Conf dr. Vamanu Emanuel

deoarece aceasta influențează dinamica microbiană, dar și efectul moleculelor de interes farmaceutic.

Punctul critic îl reprezintă montarea cateterului deoarece orice suprainfecție schimbă structura biofilmului, dar și răspunsul pe care îl vom avea la produsul administrat. Consumul resurselor disponibile nu va permite înțelegerea dinamicii tulpinii țintă *in vivo*, determinarea factorilor cheie, dar și a concentrației optime din produsul testat. Soluția tehnică propusă prin acest procedeu presupune activități uzuale de laborator și permite o cultivare în condiții de laborator. Nu implică materii prime dăunătoare pentru mediu și crește gradul de valorificare a unor molecule valoroase, provenite din surse naturale.

În **Figura 1**, este prezentată schema noului sistem *in vitro*. Etapele metodei și realizarea sistemului *in vitro* au următoarea succesiune:

1. Vas Duran (volum minim 1L) prevăzut cu 2 orificii ce conține urină artificială sterilizată;
2. Pompă peristaltică pentru administrarea regulată de urină din vasul de punctul 1, debit 0.4 mL/min controlat printr-o priză cu temporizare;
3. Punctul de inoculare cu tulpina testată – sept din silicon (cultură stoc cu o viabilitate minimă  $1 \times 10^5$  UFC/mL, în NaCl 0.9% steril);
4. Furtul din silicon terminat într-un filtru Millipore, diametru 0.45  $\mu$ m;
5. Vasul de simulare *in vitro* a vezicii urinare (volum minim 250 mL);
6. Amestecul de reacție (urină simulată, produsul testat, tulpina microbiană);
7. Sistem de menținere a temperaturii – 37°C;
8. Cateter urinar;
9. Vas steril de colectare probe – vas Duram prevăzut cu două orificii).

Sistemul de încălzire este bazat pe recircularea apei printr-un circuit ce înconjoară vasul principal de simulare. Sistemul cuprinde o plită cu încălzire și senzor de temperatură, o pompă peristaltică ce asigură un debit constant de 1 mL/min și un vas de adaos prevăzut cu un capac, cu trei orificii.

Sistemul propus spre brevetare are următoarele avantaje:

- Poate fi utilizat și pentru teste ce folosesc tulpini patogene, deoarece poate fi complet sterilizat după fiecare utilizare;

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf dr. Vamanu Emanuel



- Determinare *in vitro* a capacității antimicrobiene a unui produs fără utilizarea de teste *in vivo*;
- Parametrii simulării pot fi modificați fără a afecta structura sistemului;
- Inițierea unor studii interdisciplinare și multidisciplinare ce vizează microbiota de la nivelul tractului urinar.

### Experiment 1.

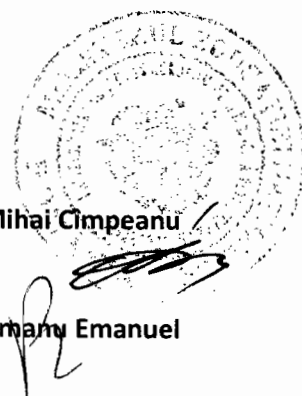
S-a utilizat ciprofloxacina (în ser fiziologic steril), care a reprezentat proba martor pentru verificarea inițială a funcționalității sistemului. Viabilitatea determinată la 24 de ore de funcționare a fost de  $8.20 \pm 0.03$  UFC/mL. Pe ansamblu, scăderea determinată în 24 de ore de funcționare a fost de  $\approx 1.00$  UFC/mL. Nu s-a observat formarea de biofilm, celulele bacteriene fiind eliminate treptat odată cu urina artificială.

### Experiment 2.

S-a utilizat un extract realizat din petale de crizantemă (în alcool etilic 50%), a reprezentat proba test pentru stabilirea parametrilor de funcționare generală în cazul testării unor produse naturale. Viabilitatea determinată la 24 de ore de funcționare a fost de  $8.20 \pm 0.05$  UFC/mL. Pe ansamblu, scăderea determinată în 24 de ore de funcționare a fost de  $\approx 0.40$  UFC/mL. În schimb, s-a observat formarea parțială de biofilm, celulele bacteriene nefiind complet eliminate. Diferențele au fost interpretate și prin existența unor compuși ce stimulează proliferarea celulară. Prezența lor este determinată de compoziția eterogenă a unui extract natural.

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf dr. Vamanu Emanuel



**Revendicare:**

Metoda și sistemul *in vitro* de aplicare, conform revendicării 1, utilizează o biomasă de *Escherichia coli* în NaCl 0.9% steril. Utilizarea sistemului *in vitro* presupune: realizarea urinei artificiale, realizarea sistemului de alimentare cu urină artificială, realizarea vasului de simulare a vezicii urinare, realizarea sistemului bazat pe recircularea apei pentru menținerea temperaturii constante pe durata simulării.

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cimpeanu

Conf dr. Vamanu Emanuel



**Sistem *in vitro* pentru testarea infecției urinare cu *Escherichia coli* și  
metodă de testare**

Sistemul propus, bazat pe o metodă *in vitro*, își propune brevetarea unui simulator al vezicii urinare destinat testării unor produse împotriva infecțiilor recurente cu *Escherichia coli*. Metoda presupune utilizarea unei tulpini control ca agent biologic pentru simularea infecției de la nivelul vezicii urinare umane. Efectul antimicrobian va exprima eficiența clinică a produsului testat *in vitro*, în vederea validării preclinice de la nivel de laborator.

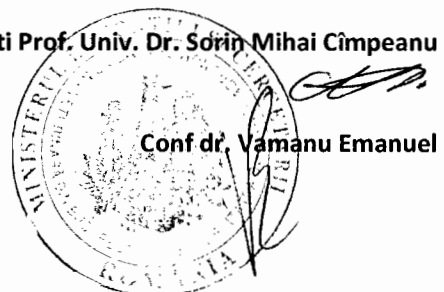
Diverse modele *in vitro* sunt utilizate pentru a determina efectul unor suplimente funcționale sau medicamente asupra infecțiilor recurente cu tulpini uropatogene (*Escherichia coli*, *Candida* sp., *Proteus mirabilis*). Cu toate acestea, formarea biofilmului microbial *in vivo* este dificil de determinat și caracterizat. Pentru a elimina acest obstacol se utilizează modele *in vitro* care pot oferi o imagine a structurii biofilmului ce se formează, dar și a eficienței produsului testat. Pentru a putea corela datele *in vitro*, cu cele *in vivo*, modelele cu o curgere constantă sau regulată sunt acceptate în literatura de specialitate [1].

Pentru astfel de studii se utilizează urină artificială sau poate fi utilizată și urină recoltată de la pacienți, sterilizată. A doua variantă poate fi destinată studiului personalizat, în situația în care se urmărește evoluția infecțiilor bacteriene la grupuri țintă de populație. Infecțiile urinare fac parte din categoria celor nosocomiale din cauza frecvenței ridicate din spitale. Ambele variante de mediu utilizat în simulare susține creșterea bacteriilor deoarece respectă toate cerințele unui mediu de cultură clasic [2].

Astfel, metoda și sistemul *in vitro* au un caracter inovativ prin introducerea unei noi modalități practice de evaluare a potențialului antimicrobian al unor produse biofarmaceutice. Această cerere de brevet propune o modalitate ușor de aplicat la nivel de laborator, în faza de concepere și testare a unui produs din industria biofarmaceutică. Sistemul *in vitro* elimină o problemă majoră, aceea a caracterizării efectului unui produs de tipul suplimentelor funcționale. Se va determina o imagine a eficacității și rolului unor produse noi, cu efect antimicrobian, cu rol în diminuarea formării biofilmului de la nivel urinar.

Necesitatea dezvoltării unor sisteme *in vitro* pentru studiul infecțiilor recurente cu *E. coli* rezultă din interpretarea unor factori relevanți pentru evaluarea riscului de infecție prin folosirea unui cateter urinar și din evaluarea noilor strategii terapeutice împotriva creșterii rezistenței la antibiotice. Aceste sisteme respectă condițiile fizico-chimice de la nivelul vezicii

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



urinare și trebuie să simuleze, cât mai exact, interacțiunea cu epiteliul uman, dar să și faciliteze posibilitatea colonizării microbiene. Modelul propus se dorește a fi unul dinamic, care permite o eliminare fiziologică a cantității de urină în 24 de ore [3]. Metoda și sistemul *in vitro* de simulare se bazează pe determinarea viabilității, dar pot fi luate în calcul și alte mecanisme ce pot să influențeze efectul biologic (de exemplu, stresul oxidativ). Această metodă poate fi utilizată, în funcție de scopul cercetărilor efectuate, și pentru alte tulpini microbiene, de exemplu microorganisme eucariote – *Candida albicans*.

În plus, aceste sisteme *in vitro* pot realiza și o testare a unor catetere inovative care să prevină formarea biofilmului, având în compoziția lor materiale cu proprietăți antimicrobiene (de exemplu, nanoparticule). La ora actuală nu există biomateriale utilizate pentru catetere urinare care să fie în totalitate biocompatibile cu epiteliul uman. Proprietățile materialului vor imprima și valoarea biologică. Acest aspect este important și în realizarea simulatorului care va trebui să permită colonizarea. Un alt aspect îl reprezintă păstrarea temperaturii fiziologice deoarece aceasta influențează dinamica microbiană, dar și efectul moleculelor de interes farmaceutic.

Punctul critic îl reprezintă montarea cateterului deoarece orice suprainfecție schimbă structura biofilmului, dar și răspunsul pe care îl vom avea la produsul administrat. Consumul resurselor disponibile nu va permite înțelegerea dinamicii tulpinii țintă *in vivo*, determinarea factorilor cheie, dar și a concentrației optime din produsul testat. Soluția tehnică propusă prin acest procedeu presupune activități uzuale de laborator și permite o cultivare în condiții de laborator. Nu implică materii prime dăunătoare pentru mediu și crește gradul de valorificare a unor molecule valoroase, provenite din surse naturale.

În **Figura 1**, este prezentată schema figurativă a noului sistem *in vitro*, în care: la 1 este un vas Duran (volum minim 1L) prevăzut cu 2 orificii ce conține urină artificială sterilizată, la 2 o pompă peristaltică pentru administrarea regulată de urină din vasul de punctul 1, debit 0.4 mL/min controlat printr-o priză cu temporizare, la 3 punctul de inoculare cu tulpina testată – sept din silicon (cultură stoc cu o viabilitate minimă  $1 \times 10^5$  UFC/mL, în NaCl 0.9% steril), la 4 un furtul din silicon terminat într-un filtru Millipore, diametru 0.45  $\mu\text{m}$ , la 5 este vasul de simulare *in vitro* a vezicii urinare (volum minim 250 mL), 6 reprezintă amestecul de reacție (urină simulată, produsul testat, tulpina microbiană); la 7 se află sistemul

Rector USAMV București Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



Conf. dr. Vamanu Emanuel



de menținere a temperaturii – 37<sup>0</sup>C, 8 este cateterul urinar, iar 9 este vasul steril de colectare probe –vas Duram prevăzut cu două orificii).

Sistemul de încălzire 7 este bazat pe recircularea apei printr-un circuit ce înconjoară vasul principal de simulare 5, format dintr-o plită cu încălzire și senzor de temperatură, o pompă peristaltică ce asigură un debit constant de 1 mL/min și un vas de adaos prevăzut cu un capac, cu trei orificii.

Sistemul propus spre brevetare are următoarele avantaje:

- Poate fi utilizat și pentru teste ce folosesc tulpini patogene, deoarece poate fi complet sterilizat după fiecare utilizare;
- Determinare *in vitro* a capacității antimicrobiene a unui produs fără utilizarea de teste *in vivo*;
- Parametrii simulării pot fi modificați fără a afecta structura sistemului;
- Inițierea unor studii interdisciplinare și multidisciplinare ce vizează microbiota de la nivelul tractului urinar.

Metoda de testare a infecției cu *E. coli*, în vederea testării unor suplimente funcționale, conform invenției, constă în inocularea vasului de simulare 5 prin intermediul punctului de inoculare 3 cu o seringă sterilă, în raport de 1% cultură microbiană (viabilitate minimă  $1 \times 10^5$  UFC/mL), temperatura se păstrează constantă la 37<sup>0</sup>C, cu ajutorul sistemului de încălzire 7, iar produsul de testat (extract funcțional sau antibiotic – martor) se adaugă tot prin punctul de inoculare 3 cu o seringă sterilă în raport de 1 mg/mL la 12 ore. Probele se recoltează în timp real, atunci când nivelul amestecului de reacție 6 trece peste nivelul balonului cateterului urinar 8, iar probele se recoltează în vasul steril de colectare 9 și se analizează după minim 24 de ore. Pentru analiză se determină viabilitatea și se utilizează mediu McConkey turnat în plăci Petri. Plăcile inoculate se introduc la 32<sup>0</sup>C, timp de 24 – 48 de ore și se determină viabilitatea (UFC/mL).

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



Conf dr. Vamanu Emanuel

**Experiment 1.**

S-a utilizat ciprofloxacină (în ser fiziologic steril), care a reprezentat proba martor pentru verificarea inițială a funcționalității sistemului. Viabilitatea determinată la 24 de ore de funcționare a fost de  $8.20 \pm 0.03$  UFC/mL. Pe ansamblu, scăderea determinată în 24 de ore de funcționare a fost de  $\approx 1.00$  UFC/mL. Nu s-a observat formarea de biofilm, celulele bacteriene fiind eliminate treptat odată cu urina artificială.

**Experiment 2.**

S-a utilizat un extract realizat din petale de crizantemă (în alcool etilic 50%), a reprezentat proba test pentru stabilirea parametrilor de funcționare generală în cazul testării unor produse naturale. Viabilitatea determinată la 24 de ore de funcționare a fost de  $8.20 \pm 0.05$  UFC/mL. Pe ansamblu, scăderea determinată în 24 de ore de funcționare a fost de  $\approx 0.40$  UFC/mL. În schimb, s-a observat formarea parțială de biofilm, celulele bacteriene nefiind complet eliminate. Diferențele au fost interpretate și prin existența unor compuși ce stimulează proliferarea celulară. Prezența lor este determinată de compoziția eterogenă a unui extract natural.



Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu

Conf dr. Vamanu Emanuel

**Bibliografie**

1. M. NEGRI, S. SILVA, M. HENRIQUES, J. AZEREDO, T. SVIDZINSKI, R. OLIVEIRA. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. *Medical Mycology* 2011, 49, 739–747.
2. T. Brooks, C.W. Keevil A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 1997, 24, 203–206.
3. M. Maierl, M. Jörger, P. Rosker, A. Reisner *In vitro* dynamic model of a catheterized bladder and biofilm assay. *Bio-protocol* 2015, 5, 2.

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



Conf dr. Vamanu Emanuel

**Revendicare:**

Sistemul *in vitro* și metode de testare propusă reprezintă o modalitate practică de evaluare în cadrul unui laborator a unor produse. Utilizarea sistemului *in vitro* presupune:

1. Sistem *in vitro* pentru testarea infecției urinare cu *Escherichia coli*, caracterizat prin aceea că, este constituit dintr-un vas (1) Duran cu volumul minim 1L, prevăzut cu 2 orificii, care conține urină artificială sterilizată, o pompă (2) peristaltică pentru administrarea regulată de urină din (1), debit 0.4 mL/min controlat printr-o priză cu temporizare, un punctul de inoculare (3) cu tulpina testată – sept din silicon (cultură stoc cu o viabilitate minimă  $1 \times 10^5$  UFC/mL, în NaCl 0.9% steril), un furtul (4) din silicon terminat într-un filtru Millipore, diametru 0.45  $\mu$ m, un vas (5) de simulare *in vitro* a vezicii urinare (volum minim 250 mL), unde se află amestecul de reacție (6 - urină simulată, produsul testat, tulpina microbiană), Sistem (7) de menținere a temperaturii – 37°C, Cateter urinar (8), Vas steril (9) de colectare probe –vas Duram prevăzut cu două orificii).
2. Metoda conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că, în etapa inițială se inoculează mediul din vasul de simulare (5), se adaugă produsul de testat prin septul (3) și se păstrează temperatura constantă la 37°C, asigurându-se un debit și un timp de interacțiune constant, odată cu colectarea probelor în vasul (9) și determinarea viabilității.

Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Sorin Mihai Cîmpeanu



Conf dr. Vamanu Emanuel

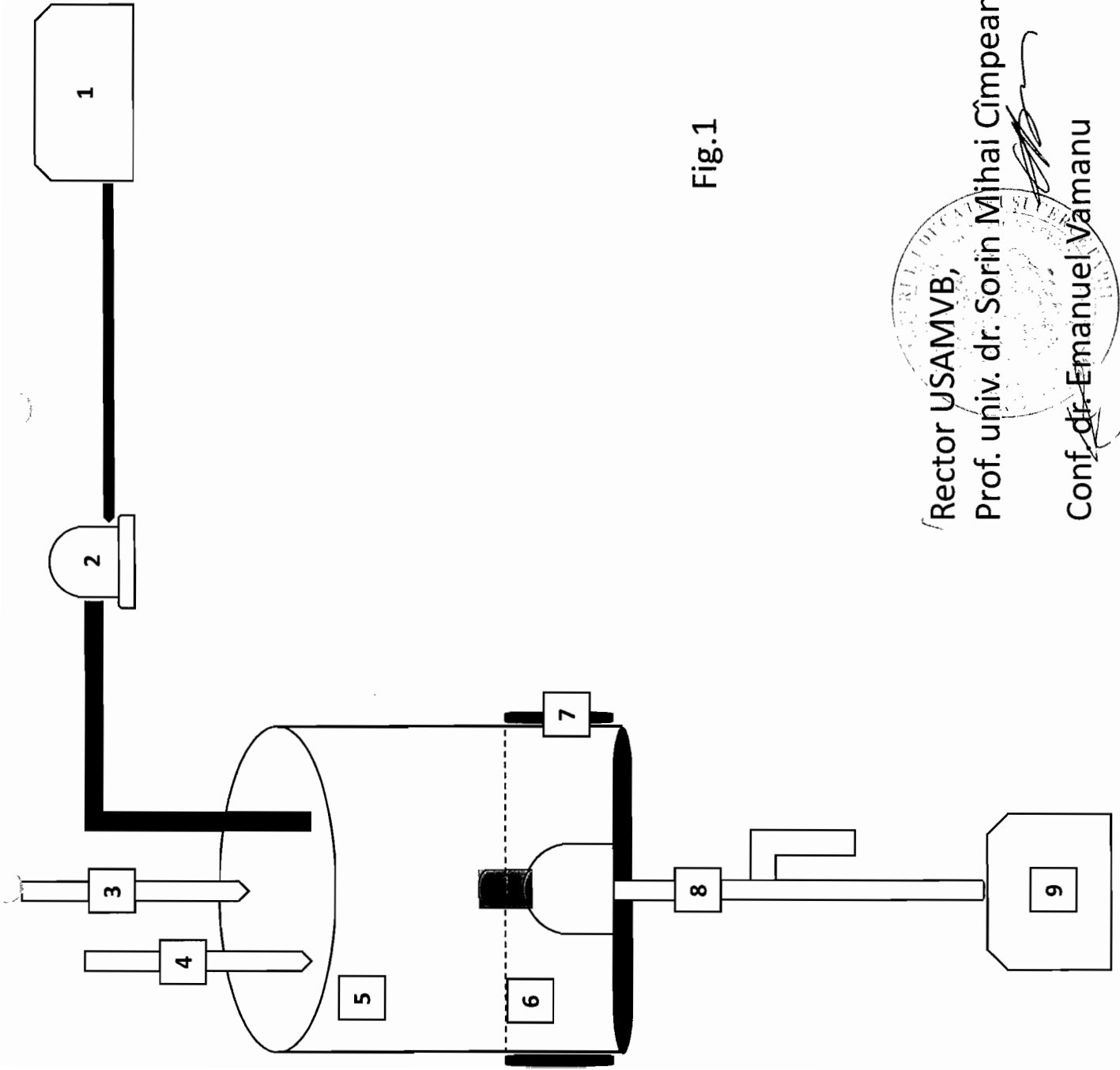


Fig.1

Rectoꝛ USAMVB,  
Prof. univ. dr. Sorin Mihai Cîmpeanu  
Conf. dr. Emanuel Vamanu