



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

# UIBM

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| <b>DOMANDA NUMERO</b>     | <b>101995900446386</b> |
| <b>Data Deposito</b>      | <b>08/06/1995</b>      |
| <b>Data Pubblicazione</b> | <b>08/12/1996</b>      |

|                |               |                    |               |                    |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| <b>Sezione</b> | <b>Classe</b> | <b>Sottoclasse</b> | <b>Gruppo</b> | <b>Sottogruppo</b> |
| A              | 61            | B                  |               |                    |

Titolo

TERRENO DI COLTURA SELETTIVO- DIFFERENZIALE PER L'ISOLAMENTO E LA  
TIPIZZAZIONE DEGLI ENTEROCOCCHI.

MCR.001

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.



Descrizione dell'Invenzione Industriale dal titolo :

"Terreno di coltura selettivo-differenziale per l'isolamento e la tipizzazione degli enterococchi"

a nome di : Microbiol di Sergio Murgia & C. S.n.c.

con sede in : Sestu (Cagliari)

inventore designato : POMPEI Raffaello

depositato il con il n°

\* \* \* \* \*

#### 1. Campo del trovato

La presente invenzione si riferisce a un nuovo terreno di coltura per l'isolamento selettivo e il riconoscimento di vari gruppi di enterococchi abitualmente responsabili di infezioni cliniche. La presente invenzione si riferisce inoltre a un processo per tale isolamento e all'inserimento di tale sistema in un kit per la conta e l'isolamento di microrganismi nelle urine.

#### 2. Stato dell'arte

Gli enterococchi sono microorganismi gram-positivi commensali dell'intestino dell'uomo e di altri animali. Essi sono importanti nella patologia infettiva in quanto sono responsabili di cistiti, infezioni di ferite, endocarditi, setticemie e altre importanti malattie. Sono inoltre la seconda causa riconosciuta di infezioni ospedaliere, dopo gli enterobatteri.

Gli enterococchi presentano spesso una elevata resistenza agli antibiotici, per cui necessitano di una terapia mirata e specifica.

Rag. Franco Carboni



DP

MCR.001

Notarbartolo &amp; Gervasi s.r.l.

Attualmente esistono in commercio alcuni terreni per la coltura selettiva degli streptococchi. Essi sono per lo più basati sulla presenza di sodioazide o di antibiotici come sostanze selettive; a queste viene spesso aggiunto del cloruro di sodio in concentrazione elevata per aumentare il potere selezionante (brodo azide-destrosio, un terreno selettivo per streptococchi o bile esculina agar. Questi terreni sono dotati di un potere selettivo limitato, in quanto consentono la crescita di molte specie di streptococchi e di stafilococchi, o anche di altri gram-positivi, come pure di alcuni batteri gram-negativi. Inoltre, esse hanno scarso potere differenziante, perché non contengono substrati colorati o altri metodi specifici per riconoscere singoli gruppi di microorganismi o singole specie.

Le considerazioni sopra esposte, nel loro insieme, rendono evidente l'importanza e la necessità di terreni per l'isolamento e il riconoscimento rapido delle diverse specie di enterococchi nelle piastre di coltura.

### 3. Sommario dell'invenzione

Le necessità sopra esposte sono soddisfatte dalla presente invenzione. Essa rende disponibile un nuovo terreno selettivo-differenziale per l'isolamento e la tipizzazione degli enterococchi in materiali patologici.

Il terreno secondo la presente invenzione permette di isolare e riconoscere rapidamente gli enterococchi nelle urinocolture e in altri materiali patologici clinici e inoltre

Rag. Franco Carboni



consente di differenziare con notevole precisione alcune delle specie di enterococchi più comuni, quali l'*Enterococcus faecalis* e l'*Enterococcus faecium-durans*.

In conclusione il presente terreno risulta maggiormente selettivo rispetto ai terreni noti, permette di separare gli enterococchi da tutti gli altri microorganismi gram-positivi e distingue all'interno degli enterococchi varie specie.

La presente invenzione si riferisce inoltre alla preparazione di detto terreno, al processo per l'isolamento e il riconoscimento degli enterococchi mediante il terreno secondo l'invenzione e infine a un kit diagnostico per l'esecuzione di detto processo.

#### 4. Descrizione dettagliata dell'invenzione

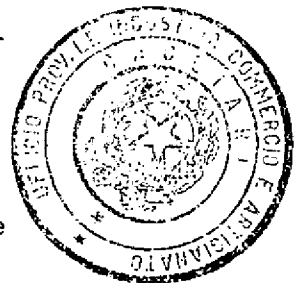
Il terreno secondo l'invenzione comprende essenzialmente almeno i seguenti componenti:

- a) una base nutritiva adatta alla crescita degli enterococchi;
- b) una sostanza selettiva, che inibisce i gram-negativi e i gram-positivi diversi dagli enterococchi;
- c) un sistema per differenziare gli enterococchi da tutti gli altri gram-positivi che possano crescere su tale terreno;
- d) uno o più substrati capaci di separare gli enterococchi in diverse specie o gruppi.

Secondo una soluzione preferita, il o i substrati presenti nel componente d) sono colorati.

Il presente terreno può inoltre contenere come componenti

Rag. Franco Carboni



Handwritten signature or initials.

aggiuntivi, e qui elencati con le lettere e), f) g) e h), quanto segue:

- e) sali per creare un ambiente osmolare idoneo;
- f) un agente tamponante;
- g) sostanze gelificanti;
- h) acqua distillata.

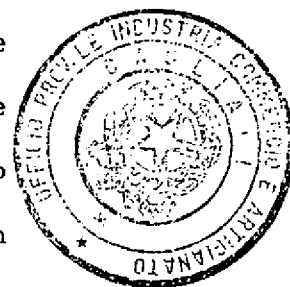
Come componente a) dovrà essere scelta una base nutritiva che sia in grado di favorire la crescita ottimale degli enterococchi nel minor tempo possibile. Inoltre, deve essere semplice da preparare. Tra le basi nutritive note risulta preferito il terreno brodo Tood-Hewitt commerciale. Come

componente b) possono essere utilizzati sodioazide oppure un sale di tallio, ma risulta preferito il sale di tallio, ad esempio acetato di tallio, che è più stabile della sodioazide e ha un potere selettivo maggiore. Per quanto riguarda il punto c),

la differenziazione degli enterococchi viene ottenuta con l'incorporazione nel terreno di coltura ad esempio di cellule di *Micrococcus luteus* uccise al calore e lavate ripetutamente. Questo substrato serve a mettere in evidenza l'attività batteriolitica tipica degli enterococchi e non condivisa da altre specie di microorganismi in grado di crescere su tale terreno.

Il terreno solido si presenta di colorito giallino e opaco; quando su di esso crescono enterococchi che hanno attività batteriolitica, si forma un alone trasparente di lisi intorno alla colonia.

Reg. Franco Carloni



SP

Per quanto riguarda il punto d), il riconoscimento di diverse specie o gruppi di enterococchi può essere realizzato con l'uso di:

- i) tellurito di potassio;
- ii) fermentazione di glicerolo o altri zuccheri;
- iii) analisi dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi;
- iv) tetrazolio.

L'esame della  $\beta$ -galattosidasi o l'utilizzazione del tetrazolio si sono dimostrati i metodi più efficienti. In conclusione, la composizione preferita del terreno secondo l'invenzione comprenderà i seguenti componenti:

- a) una base nutritiva costituita da terreno brodo Todd-Hewitt commerciale;
- b) tallio acetato come agente selettivo;
- c) una sospensione di cellule di *Micrococcus luteus*, per la differenziazione degli enterococchi;
- d) un substrato colorato per distinguere diverse specie o gruppi di enterococchi;
- e) sali per creare un ambiente osmolare idoneo;
- f) un agente tampone;
- g) una sostanza gelificante, quale l'agar;
- h) acqua distillata.

Preferito risulta il terreno comprendente:

- a) terreno brodo Todd-Hewitt da 5 a 50 g, particolarmente preferito 10 g;

Rag. Franco Carboni



*Handwritten signature*

- b) tallio acetato da 0,3 a 3 g. particolarmente preferito 1 g;
- c) Micrococcus luteus (ucciso al calore) da 0,3 a 3 di densità ottica finale, particolarmente preferito 0,5;
- d) tetrazolio oppure substrato per  $\beta$ -galattosidasi da 0,05 a 0,3 g. particolarmente preferito 0,1 g;
- e) sale cloruro da 0,5 a 5 g preferito 2 g;
- f) tampone fosfato pH  $7.2 \pm 0.7$ ;
- g) agar da 10 a 20 g, particolarmente preferito 15 g;
- h) acqua 1 litro; il pH sarà compreso tra 6,5 e 7,5.

Il terreno secondo l'invenzione può essere preparato nel modo seguente.

Nel caso in cui al punto c) venga utilizzata una sospensione di cellule di Micrococcus luteus, per la differenziazione degli enterococchi, allora si prepara una sospensione di cellule di Micrococcus, uccise al calore. Quindi si miscela detta sospensione con la base nutritiva, l'agente selettivo, agar, acqua distillata.

La composizione ottenuta viene messa ad incubare per 3-5 giorni, quindi si raccoglie lo strato di cellule batteriche, lavato in soluzione fisiologica e centrifugato per 3 volte. La sospensione ottenuta viene fatta sterilizzare in autoclave, preferibilmente alla temperatura di  $121^{\circ}\text{C}$  ad 1 atmosfera.

Quindi si fa raffreddare il terreno fino a circa  $45-50^{\circ}\text{C}$ , viene aggiunto il componente utilizzato al punto d), precedentemente sterilizzato, per filtrazione.

Rag. Franco Carboni



RF

Il terreno viene distribuito in capsule di Petri e conservato, preferibilmente in frigorifero alla temperatura di 4-8 °C fino al momento dell'uso.

La preparazione del terreno, la sua composizione, il processo per l'isolamento degli enterobatteri e la loro tipizzazione risulteranno maggiormente chiari dagli esempi seguenti.

#### Esempio 1

##### Preparazione del Micrococcus luteus

Micrococcus luteus di ceppo Cal, è stato coltivato su piastre di agar triptosio addizionate con  $MgCl_2$  0,003M. Il tutto è stato quindi messo ad incubare per 3 giorni. Quindi, è stato raccolto lo strato di cellule batteriche, lavato in soluzione fisiologica e centrifugato per 3 volte. La sospensione ottenuta è stata sterilizzata a 121°C per 15 min in autoclave. I batteri sono stati quindi sospesi in soluzione fisiologica alla densità ottica di 200 unità ottiche.

##### Preparazione del terreno

Il terreno brodo Todd-Hewitt, l'agar, l'acqua distillata, l'acetato di tallio, il tampone fosfato, il sale cloruro di sodio e la sospensione di micrococcus sono state miscelate e sterilizzate in autoclave per 15 min a 121°C. Il terreno è stato fatto raffreddare fino a 45°C e quindi è stato aggiunto il tetrazolio, e precedentemente sterilizzato per filtrazione. Il terreno è stato quindi distribuito in capsule Petri e conservato

Rag. Franco Carboni



in frigorifero a 4-8 °C fino all'uso.

Dopo semina del campione, la differenziazione degli enterococchi viene eseguita direttamente sulla capsula Petri di coltura primaria, mediante semplice osservazione delle caratteristiche e del colore delle colonie batteriche cresciute su di esse.

#### Esempio 2

Viene seguita la procedura come per l'Esempio 1, con la differenza che nella preparazione del terreno è stato usato il substrato per la  $\beta$ -galattosidasi al posto del tetrazolio.

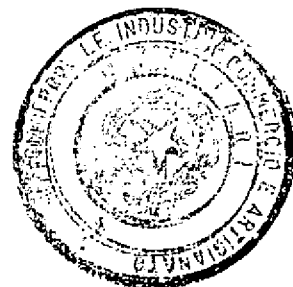
#### Lettura dei risultati

In presenza di tetrazolio o di un substrato per la  $\beta$ -galattosidasi, le colonie di enterococchi crescono e si colorano come indicato in Tabella 1. Nel terreno con tetrazolio le colonie di *Enterococcus faecalis* sono litiche e di colore marrone. Le colonie di *E. faecium* ed *E. durans* sono litiche e incolori o rosa. Il gruppo *E. casseliflavus*-*E. mundtii* dà origine a colonie con lisi più modesta, colorata di rosa o rosso, mentre il gruppo *E. solitarius*-*E. raffinosus* forma colonie poco litiche incolori.

Su substrato per la  $\beta$ -galattosidasi, *E. faecalis* forma colonie incolori con lisi abbondante, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae* colonie verdi con lisi netta, *E. casseliflavus*-*E. mundtii* colonie verdi con lisi modesta, *E. avium* e simili colonie incolori con lisi modesta.

La lettura delle piastre avviene dopo 24 ore dalla coltura.

Rag. Franco Carboni



28

Eventualmente la presenza della lisi viene confermata dopo 48 ore dalla coltura.

Tabella 1: Aspetto di colonie di enterococchi su diversi terreni selettivo-differenziati.

| Specie (No)                  | TERRENO MTT1         |                             | TERRENO MTT2         |                             | TERRENO MTX3   |          | TERRENO MTX4   |                  |
|------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------|----------|----------------|------------------|
|                              | tetratzolio - pH 7.0 |                             | tetratzolio - pH 9.6 |                             | X-Gal - pH 7.0 |          | X-Gal - pH 9.6 |                  |
|                              | lisi                 | colore                      | lisi                 | colore                      | lisi           | colore   | lisi           | colore           |
| <i>E. faecalis</i> (100)     | ++                   | rosso scuro                 | +++                  | rosso scuro                 | ++             | incolore | +++            | incolore         |
| <i>E. faecium</i> (43)       |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. durans</i> (6)         | ++                   | rosa<br>(o incolore)        | -(+)                 | rosa<br>(o incolore)        | ++             | verde    | -(+)           | verde<br>pallido |
| <i>E. hirae</i> (9)          | ++                   | rosso scuro<br>(o incolore) | +                    | rosso scuro<br>(o incolore) | ++             | verde    | +              | verde            |
| <i>R. avium</i> (8)          |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. raffinosus</i> (3)     |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. solitarius</i> (1)     |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. pseudoavium</i> (5)    | -(+)                 | rosso scuro<br>o incolore   | -                    | rosso scuro o<br>incolore   | -(+)           | incolore | -(+)           | incolore         |
| <i>E. casseliflavus</i> (10) |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. flavescens</i> (4)     |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. malodoratus</i> (2)    |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |
| <i>E. mundtii</i> (2)        | +                    | rosso scuro                 | +                    | rosso scuro                 | +              | verde    | +              | verde            |
| <i>E. gallinarum</i> (3)     |                      |                             |                      |                             |                |          |                |                  |

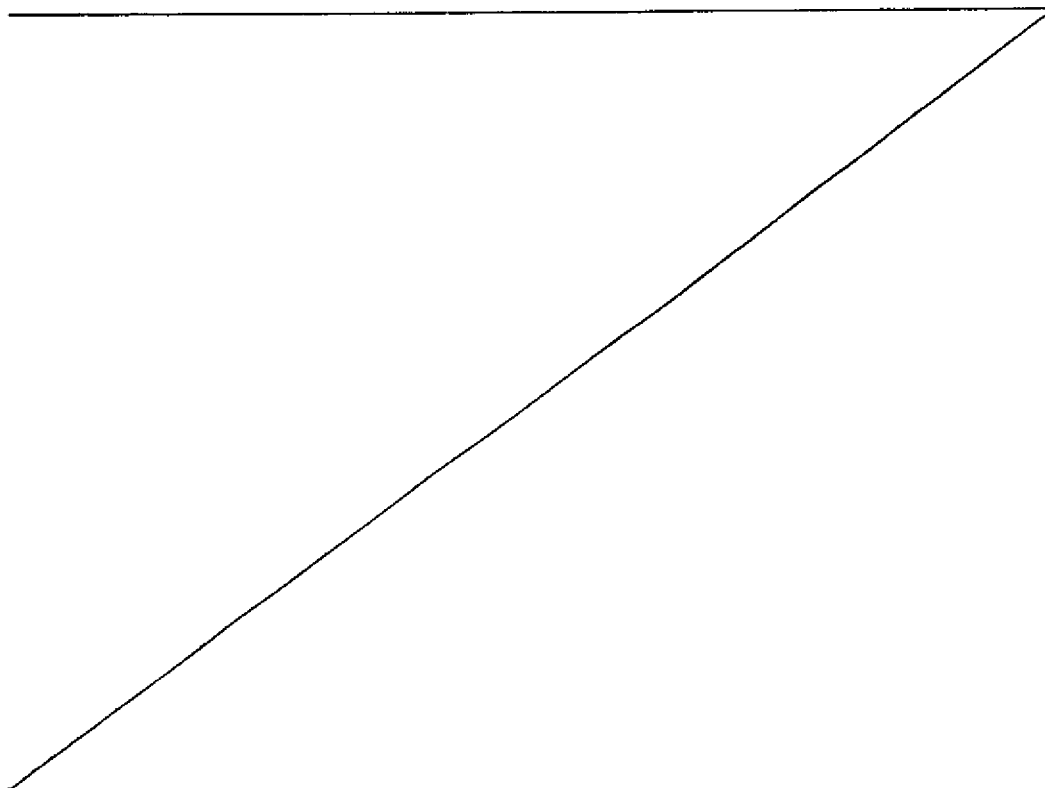


*PP*

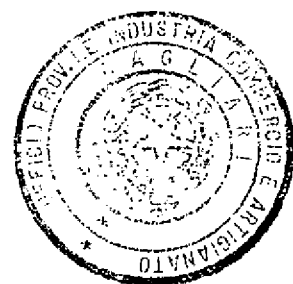
E' evidente dai risultati ottenuti che il substrato  $\beta$ -galattosidasi consente una differenziazione più precisa degli enterococchi rispetto al tetrazolio. Tuttavia la  $\beta$ -galattosidasi è più costosa del tetrazolio.

La presente invenzione può essere inserita in un sistema diagnostico per la conta e l'isolamento dei microrganismi nell'urina.

Detto kit comprende un supporto (un contenitore) e il terreno oggetto dell'invenzione e può contenere inoltre altri, ad esempio 3 o 5, terreni di coltura come esemplificato in figura, ad esempio per la semina di enterobatteri (agar Mac Conkey), per miceti (agar sabourad) e stafilococchi (agar sale mannite).



Rag. Franco Carboni



## RIVENDICAZIONI

1. Terreno di coltura selettivo-differenziale per l'isolamento e la tipizzazione di Enterococchi comprendente almeno i seguenti componenti:

- a) una base nutritiva adatta alla crescita degli enterococchi;
- b) una sostanza selettiva, che inibisce i gram-negativi e i gram-positivi diversi dagli enterococchi;
- c) un sistema per differenziare gli enterococchi da tutti gli altri gram-positivi che possano crescere su tale terreno;
- d) uno o più substrati capaci di separare gli enterococchi in diverse specie o gruppi.

2. Terreno di coltura secondo la rivendicazione 1, comprendente inoltre:

- e) sali per creare un ambiente osmolare idoneo;
- f) un agente tamponante;
- g) sostanze gelificanti;
- h) acqua distillata.

3. Terreno di coltura secondo la rivendicazione 1, in cui come componente d) sono usati uno o più substrati colorati.

4. Terreno secondo la rivendicazione 3, in cui il substrato colorato è  $\beta$ -galattoside o tetrazolio.

5. Terreno di coltura secondo le rivendicazioni 1 e 3, in cui al punto d), il substrato è scelto nel gruppo costituito da tellurito di potassio, glicerolo o altri zuccheri.

6. Terreno secondo la rivendicazione 1, in cui la sostanza

Rag. Franco Carboni



RP

selettiva b) è sale di tallio.

7. Terreno di coltura secondo le rivendicazioni 1 e 2 le cui componenti sono: a) una base nutritiva costituita da terreno brodo Todd-Hewitt commerciale;

b) tallio acetato;

c) una sospensione di cellule di *Micrococcus luteus*;

d) un substrato colorato;

e) sale cloruro;

f) tampone fosfato;

g) agar;

h) acqua distillata.

8. Terreno di coltura secondo la rivendicazione 7, le cui componenti sono: a) terreno brodo Todd-Hewitt da 5 a 50 g;

b) tallio acetato da 0,3 a 3 g;

c) *Micrococcus luteus*, ucciso al calore, da 0,3 a 3 di densità ottica finale;

d) tetrazolio oppure  $\beta$ -galattoside da 0,05 a 0,3 g;

e) sale cloruro da 0,5 a 5 g;

f) tampone fosfato a pH  $7,2 \pm 0,7$ ;

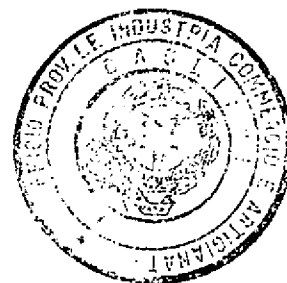
g) agar da 10 a 20 g; e

h) acqua 1 litro;

pH compreso tra 7,2 e 7,4.

9. Processo per la preparazione del terreno di coltura secondo le rivendicazioni da 1 a 8, comprendente le seguenti fasi: i) si prepara una sospensione miscelando la base nutritiva, l'agente

Reg. Brevetto Carboni



OP

selettivo, l'agar, l'acqua distillata e eventualmente le cellule di Micrococcus, uccise al calore;

ii) la miscela ottenuta viene messa ad incubare per 3-5 giorni, quindi si raccoglie lo strato di cellule batteriche, che lavato in soluzione fisiologica e centrifugato per 3 volte;

iii) la sospensione ottenuta alla fase ii) viene sterilizzata in autoclave, quindi si fa raffreddare il terreno fino a circa 45-50°C, viene aggiunto il tetrazolio o il substrato per la  $\beta$ -galattosidasi sterilizzati per filtrazione;

iv) il terreno viene distribuito in capsule Petri e conservato a 4-8 °C fino all'uso.

10. Processo per l'isolamento e la tipizzazione di enterococchi comprendente le seguenti fasi:

I) preparazione di un terreno di coltura secondo la rivendicazione 9;

II) semina del campione sul terreno ottenuto nella fase I);

III) esecuzione della differenziazione degli enterococchi direttamente sulla coltura primaria, mediante osservazione delle caratteristiche e del colore delle colonie batteriche cresciute su di esse.

11. Kit diagnostico per l'isolamento e la tipizzazione di enterococchi comprendente un terreno di coltura secondo le rivendicazioni da 1 a 8 e un supporto per detto terreno di coltura.

(MAT/lm)

*Handwritten signature*



*Handwritten signature*