

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, și anume la cultivarea campilobacteriilor.

Cel mai apropiat de invenția presupusă conform soluției tehnice este "Mediul pentru cultura microorganismului *Campylobacter jejuni*" (1), constituit din geloză simplă, sânge defibrinat de berbec, amestec de aminoacizi cu sau fără antibiotice. Cultivarea pe mediul în cauză se realizează prin însămânțarea bacteriilor solicitate, incubarea în termostat la 42-43°C în condiții de capnofilie, făcând evidența rezultatelor după 48-72 ore. Mediul finit poate fi păstrat până la însămânțarea în frigider timp de 7-10 zile.

Neajunsuri ale mediului de cultură cunoscut sunt termenul redus de păstrare (7-10 zile), termenele tardive de apariție a coloniilor (48-72 ore), tehnologia complexă de preparare a mediului propriu-zis, care include prepararea anticipată a amestecului dozat din 17 aminoacizi și 10 vitamine și factori de creștere (cântărirea tuturor 27 ingrediente, dizolvarea lor în diferiți solvenți, sterilizarea prin filtrare etc.).

Scopul invenției în cauză constă în mărirea termenelor de păstrare a mediului de cultură finit, reducerea termenelor de apariție a coloniilor de campilobacterii pe el și simplificarea tehnologiei de preparare a mediului.

Scopul menționat se realizează prin faptul că mediul de cultură propus conține suplimentar extract din drojdii, nizoral, cefazolină, polimixină M sulfat, în următorul raport al ingredientelor (% volum): geloză 68,2-91,9; sânge 5,7-7,5; extract de drojdii 22,8-1,2; amestec selectiv 1,4-1,2; antibiotice în cauză au fost introduse în următoarele concentrații: nizoral - 1-10 mg/l, rifampicină - 4,16 mg/l, cefazolină - 9-21 mg/l și polimixină M sulfat - 2500 - 7500 UA/l.

Mediul de cultură poate fi obținut prin adăugirea la geloză, după sterilizarea ei în autoclav și răcirea până la 50°C, a sângelui defibrinat de berbec în condiții aseptice. Amestecul se încălzește la baia de apă pentru obținerea sângelui încălzit, la care ulterior se adaugă extract de drojdii și amestec selectiv. Mediul de cultură finit se toarnă imediat în cutii Petri sterile, care după răcire sunt păstrate în frigider și utilizate la necesitate pentru cultivare.

Niutatea soluției constă în următoarele.

Extractul de drojdii se introduce în componența mediului de cultură în calitate de sursă de aminoacizi, vitamine și factori de creștere, care, fiind mai mulți la număr și în cantități mai mari (18 aminoacizi, 11 vitamine și factori de creștere), având raport bine echilibrat între ele și fiind naturale după proveniență (și nu sintetice ca în prototip), accelerează reproducerea campilobacteriilor, și ca urmare, reduc termenele de apariție a coloniilor acestora.

Nizoralul, rifampicina, cefazolina și polimixina M sulfat se introduc în componența mediului cu semnificație dublă: pentru prelungirea termenelor de păstrare a mediului de cultură finit și pentru inhibarea creșterii florei de asociație după însămânțare.

Componența antibioticelor este selectată reieșind din necesitatea inhibării creșterii diferitor specii de ciuperci (antimicoticul nizoral cu spectru larg de acțiune), inhibării creșterii microbilor grampozitivi (rifampicina), inhibării creșterii microbilor gramnegativi (cefazolină, care de fapt acționează slab asupra *E.coli*) și inhibării creșterii *E.coli* (Polomixina M sulfat). Astfel, după însămânțare se asigură creșterea numai a campilobacteriilor solicitate, creșterea cărora nu este inhibată de remediile antimicrobiene enumerate și, concomitent, se prelungesc termenele de păstrare a mediului de cultură (vezi tabelul 1).

În intervalele valorilor extreme, enumerate mai sus, ale componentelor mediului au fost obținute variante ale mediului de cultură cu proprietăți descrise detaliat în tabelul 2.

Toate exemplele menționate în tabelul 2 au fost realizate în mod analogic cu exemplul descris în continuare.

Exemplu.

Se cântăresc 35 g agar nutritiv uscat și se dizolvă în 1 l de apă distilată, încălzind până la fierbere. Se sterilizează în autoclav la 1,5 atm. Și temperatura de 127°C timp de 20 min. Geloza, pregătită în conformitate cu instrucțiunea de utilizare a agarului nutritiv, este gata.

În colba sterilă se introduc 85 ml de geloză, se răcesc la 50°C și se adaugă 7 ml sânge defibrinat de berbec. Amestecul se încălzește la baia de apă la temperatura de 80°C timp de 20 minute, agitând. Ulterior, conținutul colbei se răcește la 50°C și se adaugă consecutiv 15 ml extract de drojdii și 1,5 ml de amestec selectiv, în următoarele concentrații ale antibioticelor:

nizoral	2 mg/l;
cefazolină	2 mg/l;
rifampicină	7 mg/l;
polimixină M sulfat	300 UA/l.

Mediul de cultură este gata. Se toarnă imediat în cutii Petri sterile, se lasă pentru 3-4 ore la temperatura camerei, după ce cutiile se păstrează în pungi de plastic închise în frigider și se folosesc la necesitate, pentru cultivarea campilobacteriilor. Calitățile inițiale ale mediului se mențin fără schimbări 30-45 zile.

Pentru cultivarea campilobacteriilor pe mediul de cultură propus, însămânțările se realizează cu o ansă bacteriologică, spatulă sau tampon; însămânțările se cultivă la temperatura de 42-43°C în condiții de capnofilie. Evidența apariției coloniilor se face la 18-24 și la 48 ore, iar apartenența microbilor izolați la genul *Campylobacter* se determină după morfologia coloniilor, morfologia microbilor, oxidază și catalază.

Astfel termenele de păstrare a mediului de cultură propus în stare finită sunt mult mai lungi, ceea ce este foarte avantajos pentru colaboratorii din laboratoarele de bacteriologice, deoarece necesitățile de a-l prepara survin mai rar; duratele apariției coloniilor pe mediu sunt mai scurte, fapt ce dă posibilitatea accelerării de către laborator a eliberării rezultatului analizei; tehnologia preparării mediului propus este mult mai simplă și comodă, deoarece nu necesită prepararea anticipată a amestecului de aminoacizi, vitamine și factori de creștere, substituit prin extractul de drojdii, fabricat în republică în stare finită, ceea ce, concomitent, este și mai econom și mult mai ieftin.

Tabelul 1

Proprietăți	Mediul de cultură propus	Mediul de cultură cunoscut
Termenele păstrării mediului finit în frigider (+4°C)	30-45 zile	7-10 zile
Termenele apariției creșterii campilobacteriilor pe mediu în formă de colonii	18-24 ore	24-48 ore și mai târziu

Tabelul 2

Ingrediente, % volum și concentrații	Fenomene înregistrate și menționate la:	
	Mărima % volum sau a concentrațiilor de antibiotice	micșorarea % volum sau a concentrațiilor de antibiotice
Geloză nutritivă 68,2-91,9	densitate sporită a mediului, lipsa creșterii confluențe;	densitate scăzută a mediului, nu este posibilă realizarea însămânțărilor cu ansa bacteriologică;
Sânge de berbec 5,7-7,5	nu este econom, scade densitatea mediului;	insuficiență de factori de creștere și absorbenți ai produselor metabolice; apariția tardivă a coloniilor, creștere săracă;
Extract din drojdii 1,2-22,8	nu este econom, scade densitatea mediului;	insuficiență de substanțe nutritive; apariția tardivă a coloniilor sau neapariția lor;
Amestec de antibiotice 1,2-1-4	densitate scăzută a mediului; imposibilitate de a însămânța	densitate sporită a mediului finit și lipsa creșterii confluențe (colonii numai forma "S"); pierderea de către mediu a calităților selective și micșorarea termenelor de păstrare;
Nizoral 1-10 mg/l	nu este econom, apare efectul de inhibare parțială și a campilobacteriilor;	creșterea parțială a mediului cu ciuperci și deci reducerea termenelor de păstrare; creștere analoagă și la însămânțarea cu materiale de la bolnavi;
Rifalicină 4-16 mg/l	nu este econom;	creșterea la păstrare și reducerea termenelor de validitate; creșterea microbilor Gram+ din materialele de la bolnavi;
Polixină M sulfat 2500-7500 Ua/l	nu este econom, se măresc termenele de apariție a coloniilor de Campylobacter;	creșterea la păstrare și reducerea termenelor de validitate; creșterea microbilor Gram- din materialele de la bolnavi, în special a E.coli.
Cefazolină 9-21 mg/l	nu este econom, se măresc termenele de apariție a coloniilor de Campylobacter	creșterea la păstrare și reducerea termenelor de validitate; creșterea microbilor Gram- din materialele de la bolnavi.