

Descriere:

Invenția se referă la domeniul microbiologiei, în special la cultivarea microorganismelor termofile din genul *Campylobacter*.

Este cunoscut un mediu pentru cultivarea microorganismului *Campylobacter jejuni*, care este constituit din geloză simplă, sânge defibrinat de berbec, amestec de aminoacizi cu vitamine, cu sau fără adăugare de antibiotice. Cultivarea pe acest mediu se realizează prin însămânțarea prelevatului de la pacient conținând bacteriile menționate, sau direct a bacteriilor în cauză, incubarea la termostat la 42-43°C în condiții de capnofilie cu evidența rezultatelor la 48-72 ore. Mediul preparat poate fi păstrat la frigider 7-10 zile [1].

Dezavantajele acestui mediu constau în termenul redus de stocare (7-10 zile), termenele tardive de apariție a coloniilor (48-72 ore), tehnologia complexă de preparare a însăși mediului, care include prepararea amestecului dozat din 17 aminoacizi și 10 vitamine în calitate de factori de creștere (cântărirea tuturor ingredientelor în parte, dizolvarea în diferiți solvenți, sterilizarea prin filtrare etc.) și prețul înalt de cost condiționat de gama largă de ingrediente incluse în componența mediului.

Sarcina invenției constă în prelungirea termenelor de stocare a mediului, micșorarea termenelor de apariție a coloniilor de microbi pe el, simplificarea tehnologiei de preparare a mediului și reducerea prețului de cost al lui.

Sarcina se realizează prin aceea că mediul de cultură propus conține geloză peptonată, acid glutamic și suplimentar metabisulfid de sodiu, sulfat de fier și sulfat de cobalt, nizoral, rifampicină și polimixină M sulfat, raportul ingredientelor fiind următorul (% de masă): geloză peptonată 3,4-4,6; acid L-glutamic 0,12-0,25; metabisulfid de sodiu 0,020-0,042; sulfat de fier 0,020-0,042; sulfat de cobalt 0,0005-0,0021; nizoral 0,005-0,05; rifampicină 0,01-0,03; cefazolină 0,02-0,04; polimixină M sulfat 0,01-0,02; apă distilată până la 100,0 ml.

Mediul de cultură propus poate fi obținut prin introducerea succesivă într-un flacon a soluției de acid L-glutamic neutralizat cu o soluție 1N de NaOH, a metabisulfidului de sodiu, a sulfatului de fier și a sulfatului de cobalt, toate trei în formă de praf. Amestecul se agită până la dizolvarea parțială a ingredientelor, după care în flacon se introduce geloză fierbinte proaspăt topită. După sterilizarea în autoclavă și răcirea până la 50°C în flacon se adaugă în condiții sterile amestecul selectiv constituit din nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat.

Mediul de cultură preparat se toarnă urgent în cutii Petri sterile, care după răcire sunt păstrate la frigider și utilizate după necesitate pentru cultivare. Geloză peptonată, conținând agar microbiologic, hidrolizat pancreatic din pește și NaCl, constituie sursa principalelor elemente nutritive (N, C, H) și asigură solidificarea mediului cu o anumită consistență programată.

Acidul L-glutamic se introduce în componența mediului de cultură în calitate de factor de creștere, care, fiind în concentrație optimală, asigură nutriția preferențială, accelerează multiplicarea campilobacteriilor și, prin urmare, micșorează termenele de apariție a creșterii campilobacteriilor în formă de colonii izolate. Datorită satisfacerii necesităților nutritive și de creștere în lipsa altor acizi aminați și vitamine se reduce evident prețul de cost al mediului nutritiv.

Metabisulfidul de sodiu și sulfatul de fier sunt incluși în componența mediului ca reagenți care coboară potențialul oxidoreducător al mediului de cultură și sporesc concomitent aerotoleranța microorganismelor *Campylobacter* sporind posibilitatea cultivării acestora în prezența unui procent nesemnificativ pentru ele de oxigen pe fond de capnofilie.

Sulfatul de cobalt este introdus în mediu în calitate de microelement nutritiv și catalizator, care accelerează procesul de asimilare de către *Campylobacter* a acidului glutamic și, prin urmare, micșorează termenele de apariție a creșterii în formă de colonii izolate pe suprafața mediului.

Cele 4 antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) introduse în mediu au o semnificație dublă pentru el: prelungirea termenului de stocare a mediului ca rezultat al asigurării sterilității lui permanente și reținerea creșterii florei de asociație după însămânțarea prelevatelor pacientului.

Setul de antibiotice este selectat reieșind din necesitățile inhibării creșterii diferitelor specii de levuri (nizoralul cu spectrul antifungic larg), inhibării creșterii microbilor grampozitivi (rifampicina), microbilor gramnegativi (cefazolina, dar care de fapt slab inhibă creșterea *E.Coli*) și mai ales a speciei de *Escherichia coli* (polimixină M sulfat). Astfel, după însămânțare se asigură creșterea doar a campilobacteriilor solicitate, dezvoltarea și multiplicarea cărora este inhibată de remediile antimicrobiene enumerate și concomitent datorită prezenței lor în mediul de cultură măresc termenele de stocare a acestuia.

Exemplu de realizare a invenției propuse:

Într-un balon cu volum nu mai mic de 200 ml se introduc consecutiv 31 mg metabisulfid de sodiu, 31 mg sulfat de fier, 1,1 mg sulfat de cobalt. Într-o eprubetă cu 3-4 ml de apă distilată sterilă se introduc 180 mg acid L-glutamic, care rapid se dizolvă la neutralizarea concomitentă cu 1N sau 2,5N NaOH până la pH 7,2-7,4. Conținutul eprubetei se transferă în balon, agitându-l pentru dizolvarea celorlalte componente solubile în apă. Separat se cântăresc 40 g agar nutritiv uscat și se dizolvă în 1000 ml apă distilată încălzind-ul până la fierbere. 90-95 ml geloză fierbinte se transferă în balonul cu restul ingredientelor, se agită, se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm., 111°C timp de 20-30 min.

După sterilizare conținutul balonului se răcește obligatoriu până la 50°C și se adaugă 2 ml amestec selectiv cu antibioticele dizolvate preventiv, reieșind din necesitățile obținerii concentrației lor finale în 100 ml mediu: a nizoralului - 0,005-0,05%, a rifampicinei 0,01-0,03%, a cefazolinei 0,02-0,04% și a polimixinei M sulfat 0,01-0,02%. Mediul de cultură preparat se toarnă imediat în cutii Petri sterile, se lasă pentru 3-4 ore la temperatura camerei, după care cutiile se păstrează direct sau în pungi de polietilenă închise la frigider și se folosesc după necesitate pentru cultivarea campilobacteriilor. Calitățile inițiale ale mediului se mențin fără modificări nu mai puțin de o lună.

Pentru cultivarea campilobacteriilor în mediul de cultură propus însămânțările se realizează cu ansa bacteriologică, spatula sau tamponul; cutiile Petri însămânțate se incubează la temperatura de 42-43°C în condiții de capnofilie. Evidența apariției coloniilor se face la 24 de ore, apartenența microbilor izolați la genul *Campylobacter* se determină după morfologia coloniilor, morfologia microbilor, testele oxidază și catalază.

Astfel, termenele de păstrare a mediului de cultură propus în stare proaspătă sunt mult mai lungi, termenele apariției coloniilor pe mediu sunt de durată mai scurtă iar tehnologia preparării mediului este mult mai simplă. Mediul propus este mai econom, mai comod în preparare și utilizare.