

Descriere:

Invenția se referă la domeniul microbiologiei, și anume la crearea mediilor nutritive pentru izolarea și cultivarea microorganismelor din genul *Campylobacter*.

Este cunoscut mediul Blaser (Campy-BAP) pentru cultivarea microorganismelor *Campylobacter* constituit din peptonă (19,9%), extract din carne de bou (9,96%), glucoză (19,9%), clorură de sodiu (9,96%), agar (29,9%), sânge defibrinat de berbec (10,0%) și amestec de antibiotice (0,3%) care include vancomicină (0,087%), trimetoprim (0,043%), polimixină B (0,022%), cefalotină (0,130%) și amfotericină B (0,018%). Cultivarea pe mediul în cauză se realizează prin însămânțarea prelevatului de la pacient, conținând bacteriile menționate, sau a bacteriilor deja izolate, incubarea la termostat la 42-43°C în condiții de microaerofilie, cu evidența rezultatelor la 24-48 de ore prin capacul de sticlă al cutiei Petri sau direct deschizând-o. Rata de creștere pe mediul în cauză variază de la 10^4 la 10^6 microorganisme după indicele Gould, dar 90% tulpini de *Campylobacter* cresc la o rată de 10^5 microorganisme [1].

Dezavantajele mediului sunt: rata de creștere redusă a campilobacteriilor (10^5 după Gould), intransparența, care cauzează dificultăți la însămânțare și la evaluarea rezultatelor, riscul contaminării personalului medical cu agenți infecțioși patogeni, transmiși prin intermediul sângelui și tehnologia complexă de preparare, condiționată de numărul mare de ingrediente.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui mediu înalt productiv (cu o rată sporită de creștere a campilobacteriilor), transparent și lipsit de riscul contaminării personalului medical cu agenți patogeni infecțioși, transmiși prin intermediul sângelui, cât și simplificarea tehnologiei prin reducerea numărului de ingrediente.

Esența invenției constă în aceea că mediul pentru cultivarea campilobacteriilor include bază nutritivă, factor de creștere și antibiotice în care în calitate de bază nutritivă se utilizează geloza peptonată, în calitate de factor de creștere - extractul din alga *Porphyridium cruentum*, iar în calitate de antibiotice se folosesc nizoral, rifampicină, cefazolină și colimicină, în următorul raport al ingredientelor (% de masă):

geloză peptonată - 91,48-97,05; extract din alga *Porphyridium cruentum* - 2,89-8,32; nizoral - 0,012-0,045; rifampicină - 0,010-0,046; cefazolină - 0,022-0,067; colimicină - 0,012-0,044.

Nou în componența mediului propus este includerea (în % de masă) a gelozei peptonate 91,48-97,05, extractului din alga *Porphyridium cruentum* 2,89-8,32 și a antibioticelor nizoral - 0,012-0,045, rifampicină - 0,010-0,046, cefazolină - 0,022-0,067, colimicină - 0,012-0,044. Includerea în componența mediului a extractului din alga *Porphyridium cruentum* permite excluderea sângelui, prin urmare, a riscului contaminării personalului medical cu agenții patogeni transmiși prin intermediul lui, obținerea mediului transparent, facilitarea însămânțării și evaluarea rezultatelor, sporirea ratei de creștere a mediului și a numărului de izolate de campilobacterii din prelevatele examinate. Includerea antibioticelor enumerate permite reducerea numărului de rezultate nespecifice, iar includerea gelozei peptonate în tandem cu extractul din *Porphyridium cruentum* permite simplificarea evidentă a tehnologiei prin reducerea numărului total de ingrediente de la 11 în analogul cel mai apropiat până la 6.

Extractul din alge *Porphyridium cruentum* este obținut prin cultivarea tulpinii algei marine roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 pe mediul nutritiv mineral Upitis la o iluminare constantă de 18-21 mii ergi/cm² x s, temperatura de 22-24°C și agitarea periodică (pH 6,8-7,2). După 6 zile de creștere biomasa de *Porphyridium cruentum* se separă de lichidul cultural prin centrifugare, se spală cu soluție de 1,5% acetat de amoniu pentru eliminarea excesului salin și se centrifughează. Sedimentul se resuspendă în apă distilată până la concentrația de 10,0 g/l substanță uscată, se tratează apoi cu ultrasunet până la dezințegarea celulară completă și se centrifughează încă 30 min la 10.000 g iar supernatantul resuspendat este decantat, turnat în flacoane în condiții sterile, păstrat la temperatura de -20°C timp de 12 luni și utilizat după necesitate, inclusiv la crearea mediului pentru cultivarea campilobacteriilor.

Mediul pentru cultivarea campilobacteriilor este un lichid transparent, neomogen, conținând microparticule de mucoproteide cu D=1-5 μm și are o culoare abia roz. După compoziția biochimică constituie o sursă naturală de proteine și aminoacizi liberi (1,5%); mai conține vitamine din grupurile B, C, E, acizi grași și baze azotate ale acizilor nucleici și alți factori stimulatori de creștere. Cota acizilor aminici liberi "preferențiali" pentru campilobacterii (glutamină, acidul glutamic, glicină, serină, arginină, valină, izoleucină, leucină, prolină și metionină) constituie circa 1,07%, spre deosebire de indicele respectiv din extractul de carne de bou din mediul celui mai apropiat analog, care nu depășește 0,3%, fapt care argumentează cert sporirea evidentă a ratei de creștere pe mediul solicitat.

Setul de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină, colimicină) față de care campilobacteriile sunt rezistente selectat fiind din necesitățile inhibării creșterii diferitelor specii de levuri, a florii gram pozitive și a bacteriilor gram negative permite reducerea numărului de rezultate nespecifice.

Invenția se realizează prin următoarele 3 exemple, realizate respectiv la valori minime, medii și maxime ale ingredientelor.

Exemplul 1

Într-un flacon steril se introduc succesiv (în % de masă) 97,05 geloză peptonată topită și 2,89 extract din alga *Porphyridium cruentum*. Conținutul se amestecă și se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm și temperatura de 112°C timp de 15-20 min. După răcirea conținutului până la 50°C în flacon se adăunează, în condiții aseptice, antibiotice în cantități, reieșind din calculele obținerii următoarelor concentrații finale ale lor în mediul gata (în % de masă): nizoral 0,012; rifampicină 0,010; cefazolină 0,022 și colimicină 0,012. După agitarea flaconului timp de 1-2 min mediul de cultură este gata și se toarnă imediat în cutii Petri sterile. Cutiile se mențin la frigider de la 14 zile până la o lună.

Exemplul 2

Într-un flacon steril se introduc succesiv (în % de masă) 94,77 geloză peptonată topită și 5,15 extract din alga *Porphyridium cruentum*. Conținutul se amestecă și se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm și temperatura de 112°C timp de 15-20 min. După răcirea conținutului până la 50°C în flacon se adaugă, în condiții aseptice, antibiotice în cantități, reieșind din calculele obținerii următoarelor concentrații finale ale lor în mediul gata (în % de masă): nizoral 0,025; rifampicină 0,024; cefazolină 0,037 și colimicină 0,024. După agitarea flaconului timp de 1-2 min mediul de cultură este gata și se toarnă imediat în cutii Petri sterile. Cutiile se mențin la frigider de la 14 zile până la o lună.

Exemplul 3

Într-un flacon steril se introduc succesiv (în % de masă) 91,48 geloză peptonată topită și 8,32 extract din alga *Porphyridium cruentum*. Conținutul se amestecă și se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm și temperatura de 112°C timp de 15-20 min. După răcirea conținutului până la 50°C în flacon se adaugă, în condiții aseptice, antibiotice în cantități, reieșind din concentrațiile lor finale în mediul gata (în % de masă): nizoral 0,045; rifampicină 0,046; cefazolină 0,067 și colimicină 0,044. După agitarea flaconului timp de 1-2 min mediul de cultură este gata și se toarnă imediat în cutii Petri sterile. Cutiile se mențin la frigider de la 14 zile până la o lună.

În mod analog exemplurilor 1,2 și 3 au fost obținute medii de cultură la valori ale ingredientelor superioare celor limită maxime și inferioare celor limită minime. Dependența gradului de transparență a mediului și a ratei de creștere a campilobacteriilor de cota în mediu a extractului din *Porphyridium cruentum*, cât și rata de creștere a mediului celui mai apropiat analog sunt prezentate în tabelul 1. Dependența numărului de izolate de campilobacterii și a numărului de rezultate nespecifice de ingrediente prezente în medii și concentrațiile acestora sunt prezentate în tabelul 2.

După cum rezultă din tabelul 1, micșorarea concentrației extractului din *Porphyridium cruentum* mai jos de concentrația limită minimă echivalează cu micșorarea ratei de creștere până la nivel de analogul cel mai apropiat și mai jos; sporirea concentrației extractului din *Porphyridium cruentum*, cu toate că permite o creștere neînsemnată a transparenței, nu asigură mărirea ratei de creștere a campilobacteriilor, prin urmare, economic nu este avantajoasă.

Din tabelul 2 rezultă că % de izolate obținut pe mediul cu geloză peptonată și extract din alga *Porphyridium cruentum* depășește indicele echivalent pentru ingredientele mediului celui mai apropiat analog. Procentul rezultatelor nespecifice, obținut prin setul de antibiotice din mediul propus este evident inferior indicelui respectiv pentru setul de antibiotice din mediul celui mai apropiat analog. Din tabel mai rezultă că și compoziția mediului propus este mai simplă față de a mediului celui mai apropiat analog asigurând respectiv și o tehnologie mai simplă de preparare.

Rezultatul tehnic al invenției constă în: a) sporirea randamentului biomasei campilobacteriilor (de la 7% până la 15%); b) obținerea mediului transparent ce este mai comod la însămânțări și la evaluarea rezultatelor; c) micșorarea numărului de rezultate nespecifice (de la 31% până la 16%).

La cele expuse se mai poate adăuga, că și sinecostul mediului solicitat este mai redus, tehnologia preparării mai rapidă, fără a impune manipulări multiple cu mănuși de o singură întrebuințare, cu veselă suplimentară, fără baie de apă și necesitatea menținerii unei temperaturi stabile, etc.