

Descriere:

Invenția se referă la domeniul microbiologiei, și anume la identificarea biochimică a speciilor de campilobacterii termofile *Campylobacter jejuni/coli*.

Sunt cunoscute teste de utilizare a carbon-substraturilor pentru identificarea biochimică a campilobacteriilor cu ajutorul galeriilor API-System [1], care sunt constituite din godeuri cu 49 de acizi organici în formă deshidratată, inclusiv și cu D-malat și propionat, și permit diferențierea speciilor de *Campylobacter*, inclusiv a *C. jejuni* de *C. coli*, prin însămânțarea culturii examinate de campilobacterii în godeurile respective, incubarea pentru 2 zile la 42°C în condiții de microaerofilie, lectura rezultatelor prin aprecierea opacifierii și identificarea speciei, conform Catalogului API-System. Apariția creșterii (opacifierea) campilobacteriilor este apreciată ca rezultat pozitiv, iar lipsa creșterii ca rezultat negativ. De obicei specia *C. jejuni* este D-malat pozitivă, iar specia *C. coli* este propionat pozitivă.

Dezavantajul testelor asimilării D-malatalui și a propionatului ca teste de diferențiere a acestor 2 specii este utilizarea lor obligatorie doar în complex cu restul 47 de teste din componența galeriilor API-System și aprecierea speciei în baza rezultatelor celor 49 de teste în ansamblu, prin suprapunere cu informația comparată a Catalogului analitic API-System, ceea ce este complicat, cu multe manipulări tehnice și nu întotdeauna necesar și argumentat economic în condițiile necesității diferențierii doar a 2 specii de *Campylobacter*. În afară de aceasta, exactitatea identificării pentru *C. jejuni* în testul asimilării D-malatalui este de 95,4%, iar pentru *C. coli* în testul asimilării propionatului este doar de 75,6%.

Mai este cunoscut procedeul de identificare a *Campylobacter jejuni* și a *Campylobacter coli* prin montarea și lectura testului hidrolizei hipuratului de sodiu [2], conform căruia cultura izolată de campilobacterii se suspendă în 0,4 ml soluție de 1% de hipurat de sodiu, se incubează pentru 2 ore la 37°C, se suplimentează cu 0,2 ml de soluție de 3,5% de ninhidrină, se incubează repetat pentru 10 min la 37°C apoi se face lectura rezultatelor. În cazul reacției pozitive manifestată prin modificarea culorii în violet cultura este identificată drept *C. jejuni*, iar în cazul reacției negative apreciată prin nemodificarea culorii sau apariția unei culori ușor roze cultura este identificată drept *C. coli* [2].

Dezavantajul esențial al procedurii hidrolizei hipuratului de sodiu este nivelul redus al exactității, deoarece permite identificarea corectă a speciilor *C. jejuni/coli* doar în 79,5-82,1%. Astfel, erorile de diagnostic ating 18-20,5%. Procentul sporit de erori diagnostice este condiționat de rezultatele fals pozitive și fals negative ale testului, precum și de existența tulpinilor de *C. jejuni* hipurat negative apreciate inițial drept *C. coli*.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este sporirea nivelului de exactitate a identificării speciilor *C. jejuni/coli* și reducerea cotei erorilor de apreciere incorectă a speciilor în cauză.

Procedeul, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că identificarea campilobacteriilor se face prin montarea și lectura testului hidrolizei hipuratului de sodiu pozitiv pentru *C. jejuni* și negativ pentru *C. coli* și concomitent prin montarea și lectura doar a testelor asimilării D-malatalui (pozitiv pentru *C. jejuni* și negativ pentru *C. coli*) și a propionatului (negativ pentru *C. jejuni* și pozitiv pentru *C. coli*) din componența galeriilor test-sistemelor API-System. Identificarea complexă a tulpinilor de campilobacterii în baza rezultatelor a trei teste permite simplificarea procedurii diferențierii, relevarea rezultatelor fals pozitive și fals negative ale hidrolizei hipuratului de sodiu, reieșind din datele asimilării D-malatalui și propionatului și astfel sporirea exactității identificării, manifestată prin sporirea procentajului de tulpini *C. jejuni/coli*, identificate corect.

Esența invenției constă în testarea concomitentă a culturii de campilobacterii în testele hidrolizei hipuratului de sodiu, asimilării D-malatalui și a propionatului, și identificarea definitivă a speciei în baza analizei complexe a rezultatelor celor 3 teste, astfel încât drept *C. coli* sunt apreciate culturile la care testele hidrolizei hipuratului de sodiu și asimilării D-malatalui sunt negative, iar testul asimilării propionatului este pozitiv, drept *C. jejuni* sunt apreciate culturile, la care testul hidrolizei hipuratului de sodiu este pozitiv sau negativ, iar testul asimilării D-malatalui este pozitiv și testul asimilării propionatului este negativ.

Testarea și identificarea concomitentă a tulpinilor de campilobacterii prin hidroliza hipuratului de sodiu, a asimilării D-malatalui și a propionatului permite: excluderea rezultatelor fals pozitive ale hipuratului prin apariția creșterii pe mediul cu propionat, cultura identificându-se drept *C. coli* și nu *C. jejuni*; excluderea rezultatelor fals negative ale hipuratului de sodiu prin apariția creșterii pe mediul cu D-malat, cultura identificându-se drept *C. jejuni* și nu drept *C. coli*; excluderea rezultatelor incorecte, condiționate de existența tulpinilor de *Campylobacter jejuni* hipurat negative, acestea din urmă apreciindu-se corect numai în baza asimilării D-malatalui și neasimilării propionatului. Ca rezultat exactitatea procedurii de identificare a speciilor *C. jejuni/coli* sporește evident, cota erorilor de apreciere incorectă a speciilor în cauză micșorându-se practic până la zero.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea exactității identificării *Campylobacter jejuni/coli* de la 79-81% până la 97-98% și micșorarea respectivă a erorilor diagnostice.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

Cultura examinată de campilobacterii se suspendă cu ansa în 0,4 ml soluție de 1% de hipurat de sodiu și se incubează la 42°C pentru 2 ore. Concomitent cultura se mai însămânțează cu ansa și în 2 tuburi cu geloză simplă înclinată, suplimentată separat cu D-malat și propionat în concentrații 2 g C/l, care se incubează și ele la 42°C, în condiții de microaerofilie pentru 24-48 ore. La expirarea a 2 ore în tubul cu 0,4 ml soluție de 1% de hipurat de sodiu și cultură de campilobacterii se mai adaugă 0,2 ml soluție de 3,5% de ninhidrină, tubul se reincubează încă 10 min și apoi se face lectura. La apariția culorii violete rezultatul este considerat pozitiv și cultura este identificată orientativ (până la obținerea rezultatelor asimilării D-malatalui și a propionatului) drept *C. jejuni*. În cazul nemodificării culorii sau a apariției unei culori ușor roze (dubioase) rezultatul este apreciat drept negativ, iar cultura este identificată orientativ drept *C. coli*.

La expirarea a 48 de ore se face lectura testelor asimilării D-malatalui și a propionatului. Prezența creșterii pe geloză înclinată este apreciată ca rezultat pozitiv, lipsa creșterii - ca rezultat negativ.

Stabilirea definitivă a speciei de campilobacterii (identificarea) se face în complex, în baza rezultatelor hidrolizei hipuratului de sodiu, asimilării D-malatalui și a propionatului, după cum urmează din schemă:

hidrolizei hipuratului de sodiu	Rezultatele asimilării		Identificarea speciei
	asimilării		
	D-malatului	propionatului	
+	+	-	C. jejuni
-	+	-	C. jejuni
-	-	+	C.coli

În mod analog exemplului descris - prin procedeul solicitat, precum și prin procedeul celui mai apropiat analog au fost identificate 17, 39 și 41 de tulpini de campilobacterii izolate respectiv în anii 1993, 1994 și 1995 de la pacienții cu campilobacterioze.

În paralel tulpinile au mai fost identificate și prin unul din cele mai avansate procedee din domeniu - reacția de amplificare genică (RAG-control). Rezultatele identificării sunt prezentate în tabelul 1. După cum rezultă, exactitatea identificării (% tulpinilor pentru care specia a fost identificată corect) prin procedeul solicitat a fost mult mai apropiată de rezultatele procedurii de control (RAG) și evident superioară rezultatelor procedurii celui mai apropiat analog, atât separat pentru fiecare an (excepție 1993) cât și sumar ($P < 0,01$).

Tabelul 1

Rezultatele comparative ale identificării culturilor de campilobacterii prin procedeul celui mai apropiat analog, procedeul solicitat și procedeul de control

Numărul de tulpini examinate în anul	Cota tulpinilor (abs/ %) pentru care specia a fost identificată corect (exactitatea procedurii)			Autenticitate a rezultatelor	
	prin procedeul celui mai apropiat analog (1)	prin procedeul solicitat (2)	prin procedeul de control (3)	t	P
1993 - 17	14/82,3	17/100	17/100	1,91	>0,05
1994 - 39	32/82,1	38/97,4	39/100	2,3	<0,05
1995 - 41	35/85,3	40/97,5	41/100	2,02	<0,05
total - 97	81/83,5	95/97,9	97/100	3,6	<0,01

Rezultatele comparative ale identificării tulpinilor apreciate divergent în anul 1994 prin procedeul celui mai apropiat analog și prin cel solicitat, care explică erorile posibile ale diagnosticului prin procedeul celui mai apropiat analog sunt prezentate în tabelul 2. După cum rezultă, procedeul solicitat, identificând tulpinile în mod complex - în baza rezultatelor concomitente ale testelor hidrolizei hipuratului de sodiu, asimilării D-malatului și a propionatului, a permis relevarea a 2 rezultate fals pozitive (tulpinile 3 și 5), a 4 rezultate incorect apreciate drept C.coli, datorită circulației tulpinilor C.jejuni hipurat negative (tulpinile 1,2,4 și 6). Prin urmare, procedeul solicitat a permis identificarea corectă a acestor 6 tulpini (15,4%), ceea ce este imposibil de a realiza prin procedeul celui mai apropiat analog (hidroliza hipuratului de sodiu). Procentul tulpinilor exact identificate a sporit de la 83,5% până la 97,9%, diferența erorilor lichidate (15,4%) fiind statistic semnificativă ($P < 0,01$).

Tabelul 2

Rezultatele identificării tulpinilor de Campylobacter apreciate divergent prin procedeul celui mai apropiat analog și prin procedeul solicitat. Erorile posibile ale procedurii celui mai apropiat analog

Tulpinile identificate divergent	Rezultatele aprecierii speciei prin					
	Procedeul celui mai apropiat analog		Procedeul solicitat			
	hidroliza hipuratului de sodiu rezultat	specia	hidroliza hipuratului de sodiu	asimilarea		Specia
				D-malatului	propionatului	
1	-	C.coli	-	+	-	C.jejuni
2	-	C.coli	-	+	-	C.jejuni
3	+	C.jejuni	+	-	+	C.coli
4	-	C.coli	-	+	-	C.jejuni
5	+	C.jejuni	+	-	+	C.coli
6	-	C.coli	-	+	-	C.jejuni

* + indică creșterea tulpinilor pe mediile cu acizi organici ca rezultat al asimilării lor; - indică lipsa creșterii.