

Descriere:

Invenția se referă la medicină, anume la microbiologie și poate fi utilizată pentru diagnosticul microbiologic al tuberculozei. La etapa actuală o largă utilizare în diagnosticul de laborator al tuberculozei o au mediile nutritive Levenștein-Iensen și Fin-2.

Mediul Levenștein-Iensen conține următoarele componente:

fosfat monopotasic, sulfat de magneziu, citrat de magneziu, glicerol, ou, verde de malahit [1].

Însă acest mediu este puțin sensibil, deoarece nu permite de a depista o mare parte de tulpini cu un metabolism diminuat, eliminate de bolnavii cu tuberculoză cronică sau după un curs îndelungat de tratament cu chimioterapie antituberculoasă.

Mediul Fin-2 conține următoarele componente: fosfat monopotasic, sulfat de magneziu, citrat de sodiu, citrat de fier amoniacal, citrat de amoniu, glutaminat de sodiu, glicerină, verde de malahit, masă de ou, apă distilată [2]. Pe acest mediu nu în toate cazurile se obțin rezultatele așteptate, nu se dezvoltă unele tulpini cu o capacitate vitală diminuată.

Totodată, pregătirea acestor medii devine tot mai dificilă. Aceasta se lămurește prin faptul că mediile în cauză conțin componente deficitare și foarte costisitoare, cum sunt asparagina și glutaminatul de sodiu.

În contextul acesta se presupune că utilizarea unui amestec de aminoacizi, căpătați prin hidroliza proteinelor, poate crea unele condiții mai prielnice pentru dezvoltarea micobacteriilor de tuberculoză, mai ales pentru unele tulpini cu un metabolism diminuat.

În afară de aceasta pentru pregătirea mediilor sus-numite se utilizează 2 părți de ou și o parte de soluție de săruri. Acest fapt face ca mediile în cauză să fie destul de costisitoare. Cantitatea de ou întrebuițată pentru pregătirea mediilor nutritive poate fi micșorată, folosind ca element de solidificare agarul.

Problema pe care o rezolvă invenția este majorarea sensibilității mediului și sporirea eficacității procedurii de depistare a micobacteriilor de tuberculoză.

Problema formulată se realizează prin aceea că în calitate de sursă de azot pentru nutriția micobacteriilor la pregătirea mediului se utilizează un amestec de aminoacizi hidrolizat, iar ca element de solidificare se întrebuițează agarul. În cazul dat ca amestec de aminoacizi a fost folosit preparatul obținut prin metoda de hidroliză a deșeurilor de la combinatul de prelucrare a cărnii, ce are un conținut de azot aminic la nivelul de 13,2%.

Plus la aceasta, la pregătirea mediului amestecul de ou se utilizează în mod nativ, fără a fi coagulat, pe când la pregătirea mediilor cunoscute amestecul de ou se coagulează, ceea ce duce la denaturarea proteinelor, precum și la inactivarea unor factori de creștere, cum ar fi unele vitamine ș.a., prezente aici. Totodată se micșorează de 2 ori cantitatea de ou, ceea ce face ca mediul să fie cu mult mai ieftin față de mediile deja cunoscute.

Esența invenției constă în aceea că mediul agarizat pentru cultivarea micobacteriilor de tuberculoză conține, în g/l:

dihidrofosfat de potasiu	0,5 - 0,83
monohidrofosfat de sodiu	0,5 - 0,83
sulfat de magneziu	0,03 - 0,036
citrat de sodiu	0,3 - 0,36
citrat de fier amoniacal	0,017 - 0,023
sulfat de amoniu	0,3 - 0,36
amestec de aminoacizi hidrolizat	1,3 - 2,7
glicerol	5,3 - 8,0 ml/l
agar	10,0
masă de ou	333,3 ml/l
verde de malahit, soluție 2%	6,6 ml/l
apă distilată	restul.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea gradului de depistare a tulpinilor de micobacterii de tuberculoză cu un metabolism diminuat.

Cu scopul studierii unor parametri mai principali, cum ar fi sensibilitatea, viteza de creștere, intensitatea creșterii, care caracterizează calitatea mediului, s-au efectuat 1093 însămânțări paralele pe mediul propus, mediul Levenștein-Iensen și mediul Fin-2.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Mediul	Nr. de tulpini	% de izolare
Agarizat (propus)	172	93
Levenștein-Iensen	122	66
Fin-2	158	85

*** Ca 100% a fost luat numărul de tulpini de micobacterii obținute în total pe toate mediile în urma însămânțării a 1093 produse patologice, și care constituie 185 de culturi.

Așadar, pe mediul propus au fost obținute cu 50 culturi mai mult decât pe mediul Levenștein-Iensen și cu 14 culturi mai mult decât pe mediul Fin-2. Deci, folosind mediul propus s-au depistat cu 27% mai mulți eliminatori de germeni de tuberculoză decât pe mediul Levenștein-Iensen și cu 8,0% mai mulți decât pe mediul Fin-2.

După viteza și intensitatea de creștere a micobacteriilor mediul propus se află la un nivel cu mediul Fin-2 și are un avantaj față de mediul Levenștein-Iensen. După 14 zile de incubație pe mediul propus și mediul Fin-2 s-au evidențiat câte 10 tulpini, pe mediul Levenștein-Iensen numai 2 tulpini. După a 3-a și a 4-a săptămână de incubație pe mediile sus-numite s-a evidențiat creșterea micobacteriilor în 34 și 66 cazuri; pe mediul Levenștein-Iensen în 11 și 40 cazuri corespunzător. Așadar, analizând termenii de creștere a micobacteriilor pe diferite medii nutritive s-a constatat că mediul propus se află la un nivel cu mediul Fin-2 și are un avantaj de 1-2 săptămâni față de mediul Levenștein-Iensen.

După intensitatea de creștere mediul propus este superior mediului Levenștein-Iensen și mediului Fin-2. Pe mediul propus creșterea confluentă (mai mult de 100 de colonii) s-a evidențiat în 40 de cazuri (23,3%); pe mediul Fin-2 și mediul analog în 34(21,5%) și 22(18,0%) cazuri corespunzător.

Analizând cele expuse mai sus, se poate de făcut concluzia că mediul nutritiv agarizat pentru cultivarea micobacteriilor de tuberculoză este superior după toți parametri studiați față de mediul Levenstein-Iensen și se află la același nivel sau după unii parametri este superior față de mediul Fin-2.

În plus, mediul elaborat dă posibilitatea de a evidenția unele tulpini care pe alte medii cercetate în acest studiu nu au dat creștere.

Exemplu de realizare a invenției

Pregătirea mediului în cauză include 2 părți: 1. pregătirea soluției de săruri și 2. pregătirea amestecului de ou. Deoarece amestecul de ou în toate cazurile se pregătește la fel, descrierea o facem o singură dată.

Pregătirea amestecului de ou

Ouăle se spală cu săpun cu o perie, se usucă pe un tifon curat, apoi se prelucrează cu o soluție de 0,05% de clorhexidină timp de 10 minute. Se usucă pe un tifon steril, după aceea se sparg și se toarnă într-o colbă sterilă cu bile de sticlă. După fiecare ou, colba se agită bine. La 500 ml amestec de ou se adaugă 10 ml soluție de 2% verde de malahit și se filtrează prin câteva straturi de tifon steril.

Exemplul 1 (concentrație optimă).

Soluția de săruri se pregătește astfel. Ingredientele se dizolvă în apă distilată la o baie de apă în ordinea următoare: fosfat monopotasice - 1,0 g, fosfat disodic - 1,0 g, sulfat de magneziu 0,05 g, citrat de sodiu - 0,5 g, citrat de fier amoniacal - 0,03 g, sulfat de amoniu - 0,5 g, amestec de aminoacizi hidrolizați - 3,0 g, glicerină - 10,0 ml, agar - 15,0 g, apă distilată - până la 1000 ml. Soluția de săruri se sterilizează în autoclavă la 1 atm. timp de 30 min.

După autoclavare soluția de săruri se răcește până la 65 - 70°C și se adaugă amestecul de ou, se agită bine, se toarnă în eprubete sterile a câte 5,0 ml și se așază sub un unghi de 45° pentru formarea unei suprafețe oblice.

Mediul astfel pregătit se folosește pentru cultivarea micobacteriilor de tuberculoză.

S-au efectuat 1093 de însămânțări paralele ale diferitelor produse patologice, folosind mediul agarizat pregătit conform ex. 1, precum și mediile Levenstein-Iensen și Fin-2.

Fiecare probă a fost însămânțată pe 6 tuburi (câte 2 tuburi de fiecare mediu luat în studiu), care se incubau la 37°C timp de 90 de zile, fiind examinate regulat la un interval de 7 zile.

La finele studiului au fost constatate următoarele rezultate.

Din 1093 de însămânțări au fost obținute 185 tulpini de micobacterii de tuberculoză, dintre care pe mediul agarizat 172 (93%), pe mediul Levenstein-Iensen - 122(66%) și pe mediul Fin-2 - 158(85%) culturi.

Așadar, datele enumerate mai sus confirmă o prioritate a mediului agarizat, pregătit conform ex.1, față de mediul-cel mai apropiat analog și mediul-analog.

Exemplul 2 (ingredientele se folosesc în concentrație minimă).

Soluția de săruri se pregătește astfel: fosfat monopotasice - 0,75 g, fosfat disodic - 0,75 g, sulfat de magneziu - 0,045 g, citrat de sodiu - 0,45 g, citrat de fier amoniacal - 0,025 g, sulfat de amoniu - 0,45 g, amestec de aminoacizi - 2,0 g, glicerină - 8,0 ml, agar - 15,0 g, apă distilată - până la 1000,0 ml. Mai departe se procedează la fel ca în ex.1.

Ca produse biologice pentru însămânțări au fost folosite aceleași probe și în același număr ca în ex.1.

La finele studiului au fost înregistrate următoarele rezultate.

Din 185 tulpini de micobacterii de tuberculoză obținute în total pe toate mediile, pe mediul agarizat au fost evidențiate 170(91,9%), pe mediul Levenstein-Iensen - 122(66%) și pe mediul Fin-2 - 158(85%) culturi.

În cazul dat rezultatele primite pe mediul agarizat sunt de asemenea superioare față de rezultatele obținute pe celelalte medii studiate.

Exemplul 3 (concentrație maximă)

La pregătirea soluției de săruri ingredientele se utilizează în următoarele proporții: fosfat monopotasice - 1,25 g, fosfat disodic 1,25 g, sulfat de magneziu - 0,055 g, citrat de sodiu - 0,55 g, citrat de fier amoniacal - 0,033 g, sulfat de amoniu - 0,55 g, amestec de aminoacizi - 4,0 g, glicerină - 12,0 ml, agar - 15,0 g, apă distilată - până la 1000,0 ml. Mai departe se procedează la fel ca în ex.1.

Au fost efectuate de asemenea 1093 de însămânțări paralele pe mediul dat și pe mediile sus-numite studiate.

Au fost obținute următoarele rezultate: din 185 culturi de micobacterii de tuberculoză înregistrate în total pe mediul agarizat propus au fost evidențiate 172(93%), pe mediile Levenstein-Iensen și Fin-2-122(66%) și 158(85%) corespunzător.

Așadar, mărirea concentrației de săruri în mediul agarizat nu sporește sensibilitatea mediului (a fost obținut același număr de tulpini ca în ex. 1).

Exemplul 4 (concentrația sărurilor nu depășește concentrația minimă).

Soluția de săruri se pregătește astfel: fosfat monopotasice - 0,5 g, fosfat disodic - 0,5 g, sulfat de magneziu - 0,04 g, citrat de sodiu - 0,4 g, citrat de fier amoniacal - 0,02 g, amestec de aminoacizi hidrolizat - 1,0 g, sulfat de amoniu - 0,4 g, glicerină - 6,0 ml, agar - 15,0 g, apă distilată - până la 1000,0 ml.

Procedurile de mai departe, atât la pregătirea mediului, cât și la însămânțare se efectuează la fel ca în ex. 1.

Au fost înregistrate următoarele rezultate. Din 1093 probe efectuate au fost înregistrate 185 cazuri pozitive, dintre care pe mediul agarizat în 155(83,8%) cazuri, pe mediul Levenstein-Iensen - în 122(66%) și pe mediul Fin-2 în 158(85%) cazuri.

Deci micșorarea concentrației sărurilor ce nu depășește concentrația minimă duce la scăderea sensibilității mediului agarizat.

Exemplul 5 (concentrația sărurilor mai înaltă decât cea maximă)

Soluția de săruri se pregătește astfel: fosfat monopotasice - 1,5 g, fosfat disodic - 1,5 g, sulfat de magneziu - 0,06 g, citrat de sodiu - 0,6 g, citrat de fier amoniacal - 0,04 g, sulfat de amoniu - 0,6 g, amestec de aminoacizi - 5,0 g, glicerină - 14,0 ml, agar - 15,0 g, apă distilată - până la 1000,0 ml.

Mai departe se procedează la fel ca în ex.1.

În cazul dat au fost înregistrate următoarele rezultate: pe mediul Levenstein-Iensen și mediul Fin-2 au fost înregistrate 122(66%) și 158(85%) culturi corespunzător, din 185 cazuri pozitive. Pe mediul agarizat, pregătit conform ex. 5 s-au evidențiat 167(90,3%) culturi, ceea ce e cu 5 culturi mai puțin ca în ex. 1.

Deci mărirea concentrației sărurilor până la limitele indicate în ex. 5 nu duce la o sporire a sensibilității mediului agarizat, ci la diminuarea acesteia.