

Invenția se referă la industria microbiologică și poate fi aplicată pentru indicarea rapidă a levurilor genului *Candida* în diagnosticul candidozelor, precum și pentru efectuarea controlului microbiologic al materiei prime, a preparatelor medicamentoase și a diverselor obiecte ale mediului ambiant.

După esență mai aproape este mediul Sabourand glucozat [1], care conține peptonă și glucoză în apă purificată, utilizat pentru izolarea și cultivarea levurilor genului *Candida* timp de 48...72 ore la temperatura de 37°C.

Dezavantajul mediului cunoscut este durata îndelungată de cultivare a levurilor genului *Candida* (48...72 ore). Mediul își păstrează proprietățile până la 2 săptămâni la temperatura de 4...7°C. La fel mediul cunoscut are o sensibilitate, selectivitate și specificitate reduse, deoarece permite creșterea altor specii de microorganisme.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui mediu de cultură care să permită accelerarea, sporirea sensibilității, selectivității și a specificității de indicare a levurilor genului *Candida*.

Esența invenției constă în aceea că mediul de cultură pentru indicarea levurilor genului *Candida* include o bază nutritivă, glucoză, gelatină, dihidrogenofosfat de sodiu, hidrogenofosfat de potasiu, mediul 199, roșu de fenol, ciprofloxacina. În calitate de bază nutritivă mediul solicitat conține bulion peptonat. Ingredientele sunt luate în următorul raport, în % de masă:

bulion peptonat uscat	30,41...30,74
glucoză	35,86...39,10
gelatină	14,77...15,37
dihidrogenofosfat de sodiu	11,60...13,58
hidrogenofosfat de potasiu	2,26...2,56
mediul 199	0,56...0,57
roșu de fenol	0,74...0,77
ciprofloxacina	0,56...0,57

Rezultatul invenției constă în accelerarea indicării (cultivării) levurilor genului *Candida*. Aceasta se datorește mediului de cultură de o sensibilitate sporită în care amestecul nutritiv din bulion peptonat, glucoză, gelatină și mediul 199 include practic toate substanțele necesare care favorizează creșterea și multiplicarea levurilor genului *Candida*. Ciprofloxacina este factorul de selectivitate deoarece inhibă creșterea și multiplicarea altor microorganisme cu microfloră asociată, astfel asigurând și specificitatea mediului de cultură. Indicarea levurilor genului *Candida* are loc în condițiile pH-ului format de dihidrogenofosfatul de sodiu, hidrogenofosfatul de potasiu și substanțele scindării glucozei cu ajutorul indicatorului roșu de fenol.

Compoziția și raportul optim al ingredientelor creează mediul în formă de micropeliculă uscată fixată la fundul flaconului, care servește ca veselă pentru păstrarea mediului și totodată pentru efectuarea analizei.

Noutatea invenției constă în aceea că mediul de cultură conține dihidrogenofosfat de sodiu, hidrogenofosfat de potasiu, roșu de fenol și ciprofloxacina, iar în calitate de bază nutritivă – bulion peptonat, glucoză, gelatină și mediul 199 în următorul raport cantitativ al ingredientelor, în % de masă: bulion peptonat uscat – 30,41...30,74; glucoză – 35,86...39,10; gelatină – 14,77...15,37; dihidrogenofosfat de sodiu – 11,60...13,58; hidrogenofosfat de potasiu – 2,26...2,56; mediul 199 – 0,56...0,57; roșu de fenol – 0,74...0,77; ciprofloxacina 0,56...0,57.

Mediul permite indicarea levurilor genului *Candida* în materialul de examinat în concentrațiile 101...102 c.m./ml numai în cazul în care conține toate ingredientele (tab. 1). În limitele indicate ale ingredientelor (tab. 2) au fost obținute medii cu caracterele descrise (tab. 2; exemplele 2, 3, 4). Toate variantele (exemplele 2, 3, 4) de preparare a mediului indicate în tabelul 2 se efectuează analogic exemplurilor descrise.

Pentru prepararea mediului în prealabil se pregătesc soluțiile de dihidrogenofosfat de sodiu și hidrogenofosfat de potasiu pentru obținerea soluției tampon fosfatic cu Ph-ul 7,38...7,4, bulion peptonat 20%, gelatină 10% și roșu de fenol 1%.

Exemplul 1

Într-o retortă chimic curată și sterilă se introduc: soluție de dihidrogenofosfat de sodiu – 55,78 ml, soluție de hidrogenofosfat de potasiu – 13,77 ml, bulion peptonat 20% – 9,38 ml, gelatină 10% – 9,38 ml, apoi se adaugă glucoză – 1750 mg și soluție de roșu de fenol 1% – 3,5 ml. Amestecul obținut în retortă se agită și se sterilizează pe baia cu apă timp de 45 min, apoi după răcire se adaugă mediul 199 – 4,5 ml și soluția de ciprofloxacina 2,5 ml. Astfel se obține mediul de cultură lichid care cu pipeta de dozare se distribuie câte 0,4 ml în 250 flacoane sterile cu volumul de 10,0 ml, se usucă la temperatura de 45°C timp de 48 ore, obținând mediul de cultură pelicular fixat la fundul flaconului, care conține ingredientele, în % masă: bulion peptonat uscat – 30,74; glucoză – 35,86; gelatină – 15,37; dihidrogenofosfat de sodiu – 13,58; hidrogenofosfat de potasiu – 2,56; mediul 199 – 0,56; roșu de fenol – 0,77; ciprofloxacina – 0,56. Apoi se sterilizează cu raze ultraviolete timp de 120 min, flacoanele se închid cu dop de cauciuc steril și cu capac metalic.

Exemplul 2

Într-o retortă chimic curată și sterilă se introduc: soluție de dihidrogenofosfat de sodiu – 56,0 ml, soluție de hidrogenofosfat de potasiu – 14,0 ml, bulion peptonat 20% – 10,0 ml, gelatină 10% – 10,0 ml, apoi se adaugă glucoză – 2000 mg și soluție de roșu de fenol 1% – 4,0 ml. Amestecul obținut în retortă se agită și se sterilizează pe baia cu apă timp de 45 min, apoi după răcire se adaugă mediul 199 – 5,0 ml și soluția de ciprofloxacina – 3,0 ml. Astfel se obține mediul de cultură lichid care cu pipeta de dozare se distribuie câte 0,4 ml în 250 flacoane sterile cu volumul de 10,0 ml, se usucă la temperatura de 45°C timp de 48 ore, obținând mediul de cultură pelicular fixat la fundul flaconului, care conține ingredientele, în % masă: bulion peptonat uscat – 30,23; glucoză – 37,79; gelatină – 15,11; dihidrogenofosfat de sodiu – 12,56; hidrogenofosfat de potasiu – 2,41; mediul 199 – 0,57; roșu de fenol – 0,76; ciprofloxacina – 0,57. Apoi se sterilizează cu raze ultraviolete timp de 120 min; flacoanele se închid cu dop de cauciuc steril și cu capac metalic.

Exemplul 3

Într-o retortă chimic curată și sterilă se introduc: soluție de dihidrogenofosfat de sodiu – 56,2 ml; soluție de hidrogenofosfat de potasiu – 14,32 ml, bulion peptonat 20% – 10,9 ml, gelatină 10% – 10,6 ml, apoi se adaugă glucoză – 2250 mg și soluție de roșu de fenol 1% – 4,5 ml. Amestecul obținut în retortă se agită și se sterilizează pe baia cu apă timp de 45 min, apoi după răcire se adaugă mediul 199 – 5,51 ml și soluția de ciprofloxacina – 3,5 ml. Astfel se obține mediul de cultură lichid care cu pipeta de dozare se distribuie câte 0,4 ml în 250 flacoane sterile cu volumul de 10,0 ml, se usucă la temperatura de 45°C timp de 48 ore, obținând mediul de cultură pelicular fixat la fundul flaconului, care conține ingredientele, în % masă: bulion peptonat uscat – 30,41; glucoză – 39,10; gelatină – 14,77; dihidrogenofosfat de sodiu – 11,60; hidrogenofosfat de potasiu – 2,26; mediul 199 – 0,56; roșu de fenol – 0,74; ciprofloxacina – 0,56. Apoi se sterilizează cu raze ultraviolete timp de 120 min; flacoanele se închid cu dop de cauciuc steril și capac metalic.

Mediul de cultură obținut în formă de micropeliculă uscată, fixată la fundul flaconului, se păstrează la temperatura de 4...7°C timp de 2 ani (termen de observare) fără să-și schimbe proprietățile inițiale (tab. 3). La necesitate se utilizează pentru indicarea levirilor genului *Candida* în diagnosticul candidozelor, determinarea calității microbiologice a materiei prime, preparatelor medicamentoase și a diverselor obiecte ale mediului ambiant.

Pentru aceasta în flaconul cu mediu se introduc 2,04...4,0 ml de apă purificată sterilă și materialul de examinat se agită și se incubează la temperatura de 37°C până la 9...24 ore. În cazul prezenței levirilor genului *Candida* în materialul examinat culoarea amestecului din flacon se schimbă din roșu în galben. Timpul indicării levirilor depinde de concentrația lor inițială într-un ml/g de material. Indicarea celulelor unice de levuri ale genului *Candida* este posibilă peste 9...24 ore de incubare, iar a concentrației de 103...104 c.m./ml/g timp de 4...5 ore (tab. 4).

Mediul este selectiv, deoarece practic permite numai indicarea levirilor genului *Candida* (tab. 5). Este simplu în aplicare, econom și poate fi utilizat în laboratoarele microbiologice de diverse niveluri.

Tabelul 1

Influența ingredientelor mediului de cultură la indicarea levirilor genului *Candida*

Nr.	Ingredientele mediului	Variantele compoziției mediului și rezultatele indicării								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Bulion peptonat uscat	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2.	Glucoză	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3.	Gelatină	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4.	Dihidrogenofosfat de sodiu	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5.	Hidrogenofosfat de potasiu	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6.	Mediul 199	+	+	+	+	+	+	-	+	+
7.	Roșu de fenol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9.	Ciprofloxacina	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Indicarea peste 9 ore	Da	Nu	Nu	Var.	Nu	Nu	Var.	Nu	Da

Notă: "+" – prezența ingredientului;

"-" – lipsa ingredientului;

"Da" – permite indicarea levirilor *Candida*;

"Nu" – nu permite indicarea levirilor *Candida*;

"Var." – rezultatele indicării levirilor *Candida* sunt variabile.

Tabelul 2

Sensibilitatea mediului de cultură la indicarea levirilor genului *Candida* în funcție de componența cantitativă a ingredientelor

Exemplu	Raportul cantitativ al ingredientelor, în % de masă								Concentrația inițială a levirilor și indicarea lor peste 9 ore de incubare la 37°C					
	Bulion peptonat uscat	Glu-coză	Gela-tină	Dihidrogenofosfat de sodiu	Hidrogenofosfat de potasiu	Mediul 199	Roșu de fenol	Cipro-floxa-cină	109	105	104	103	102	101
1	30,86	37,04	12,35	15,43	2,47	0,62	0,62	0,62	+	+	-	-	-	-
2	30,74	35,86	15,37	13,58	2,56	0,56	0,77	0,56	++	++	++	++	++	++
3	30,23	37,79	15,11	12,56	2,41	0,57	0,76	0,57	++	++	++	++	++	++
4	30,41	39,10	14,77	11,60	2,26	0,56	0,74	0,56	++	++	++	++	++	++
5	30,95	38,68	15,47	10,44	2,32	0,77	0,77	0,58	++	+	+	-	-	-

Notă: "++" – reacția pozitivă (culoarea galbenă evidențiată);

"+" – reacția slab pozitivă (culoarea gălbuie slab evidențiată);

"-" – reacția negativă (culoarea roșie).

Tabelul 3. Durata păstrării proprietăților nutritive ale mediului de cultură pentru indicarea levurilor genului *Candida*

Intervalul observărilor	Timpul indicării levurilor genului <i>Candida</i> în concentrațiile inițiale 1...10 c.m./ml, g, în ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
30 zile	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
3 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
6 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
1 an	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
1,5 ani	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
2 ani	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++

Notă: "-" – culoare inițială roșie (rezultat negativ);

"+" – culoare galben deschis (rezultat slab pozitiv);

"++" – culoare galbenă (rezultat pozitiv);

"+++" – culoare galben închis (rezultat pozitiv evidențiat).

Tabelul 4. Indicarea levurilor genului *Candida* în funcție de concentrația inițială a lor în materialul de examinat

Concentrația (c.m./ml, g)	Timpul indicării, în ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
101	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
102	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
103	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
104	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++
105	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++
106	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
107	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
108	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
109	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notă: "-" – culoare inițială roșie (rezultat negativ);

"+" – culoare galben deschis (rezultat slab pozitiv);

"++" – culoare galbenă (rezultat pozitiv);

"+++" – culoare galben închis (rezultat pozitiv evidențiat).

Tabelul 5. Selectivitatea și specificitatea mediului de cultură pentru indicarea levurilor genului *Candida*

Nr.	Specificitatea microorganismelor	Nr. de tulpini	Indicarea microorganismelor			
			Bulion Sabourand glucozat		Mediul propus	
			9 ore	24 ore	9 ore	24 ore
1.	<i>C. albicans</i> [°] ATCC 10231	1	-	1	1	1
2.	<i>C. tropicalis</i> [°]	1	-	1	1	1
3.	<i>C. krusei</i> [°]	1	-	1	1	1
4.	<i>C. albicans</i> *	54	-	23	48	54
5.	<i>T. mentragrophytes</i> [°]	1	-	1	-	-
6.	<i>C. tropicalis</i> *	9	-	2	8	9
7.	<i>C. krusei</i> *	4	-	1	4	4
8.	<i>S. aureus</i> ATCC 12600 [°]	1	-	1	-	-
9.	<i>S. aureus</i> P-209 [°]	1	-	1	-	-
10.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 [°]	1	-	1	-	-
11.	<i>S. aureus</i> Cowan [°]	1	-	-	-	-
12.	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990 [°]	1	-	1	-	-
13.	<i>S. pyogenes</i> ATCC 12344 [°]	1	-	1	-	-
14.	<i>S. faecium</i> NCTC 7171 [°]	1	-	-	-	-
15.	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 [°]	1	-	-	-	-
16.	<i>B. cereus</i> ATCC 10702 [°]	1	-	-	-	-
17.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27583 [°]	1	-	1	-	-
18.	<i>P. aeruginosa</i> *	32	-	32	-	-
19.	<i>S. aureus</i> *	62	-	57	-	-
20.	<i>E. coli</i> *	17	-	17	-	-
21.	<i>P. vulgaris</i> *	9	-	9	-	-
22.	<i>P. mirabilis</i> *	7	-	7	-	-

Notă: [°] – tulpini de referință;

* – tulpini clinice.