

Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată pentru indicarea rapidă a toxigenității microbiene.

Este cunoscut imunoreactivul, care reprezintă o fâșie de hârtie de filtru sterilă îmbibată cu ser antitoxic (antidifteric sau antistafilococ), utilizat în reacția imunologică de precipitare difuză în gel (reacția Elek-Oucherlony-Frochiser), care se bazează pe interacțiunea exotoxinei microbiene cu antitoxina imunoreactivului în rezultatul căreia apare fenomenul de precipitare [1].

Pentru indicarea toxigenității microbiene în cutia Petri se toarnă până la 15 ml de geloză topită, apoi răcită la 45°C. După coagularea mediului, pe el se amplasează imunoreactivul (antidifteric sau antistafilococ).

Cultura cercetată se însămânțează prin metoda "plăcuțelor" cu diametrul de 0,8 ... 1,0 cm. Evidența rezultatelor se efectuează peste 24 ... 48 ore. Cultura cercetată e considerată toxigenă dacă liniile de precipitare sunt clare și se contopesc cu liniile de precipitare ale tulpinii de control (toxigene).

Dezavantajul imunoreactivului cunoscut este necesitatea de preparare *ex tempore*, durata îndelungată de indicare a toxigenității microbiene (peste 24 ... 48 ore), sensibilitatea și specificitatea mică și durata de păstrare insuficientă.

Imunoreactivul nu permite indicarea toxigenității microbiene în concentrații inițiale mici (101 ... 105) c.m./ml într-o perioadă mai mică de timp (3 ... 5 min).

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în accelerarea indicării toxigenității microbiene, sporirea sensibilității, specificității și păstrării pe un termen mai îndelungat a imunoreactivului.

Problema se soluționează prin folosirea imunoreactivului care include ser imun antitoxic, fixat pe purtător, și mertiolat de sodiu. În calitate de purtător se utilizează clamidospori *Ustilago maydis* în următorul raport al ingredientelor, în % de volum: ser imun antitoxic (antidifteric sau antistafilococ) 20,0 ... 50,0; clamidospori *Ustilago maydis* 8,0 ... 12,0; soluție de mertiolat de sodiu de 0,01%.

Clamidosporii *Ustilago maydis* în componența imunoreactivului servesc ca purtători ai antitoxinelor, ce permit accelerarea indicării toxigenității microbiene, sporirea sensibilității și specificității, iar mertiolatul de sodiu stabilizează, conservează și mărește termenul de păstrare al imunoreactivului.

Imunoreactivul propus permite o economisire esențială a componentelor utilizate și simplifică analizele efectuate.

Pentru prepararea imunoreactivului se prelucrează clamidosporii *Ustilago maydis* cu ajutorul soluțiilor substanțelor bioactive de 0,05% Super Bingo, sau Omo Automat sau Uni

Det Universal. Se filtrează, apoi se spală repetat (3 ... 5 ori) prin centrifugare pentru eliberarea suspensiei de balast.

După aceea, la 1 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago Maydis* se adaugă soluție de mertiolat de sodiu de 0,01%. La această suspensie se adaugă ser imun antitoxic, se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, apoi se menține la 4 ... 7°C timp de 24 ore.

Astfel se obține imunoreactivul pentru indicarea toxigenității microbiene a *Corynebacterium diphtheriae* sau *Stafylococcus aureus*, care se păstrează la temperatura de 4 ... 7°C timp de 2 ani (termen de observare).

#### Exemplul 1.

Într-o retortă chimic curată se introduc 0,16 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago maydis*, se adaugă 2,0 ml de soluție de substanțe bioactive de 0,05% (Omo automat), se agită timp de 30 min la aparatul Șutel. Suspensia obținută se filtrează prin filtru tifon-vată de 3 ori.

Clamidosporii *Ustilago maydis* se spală prin centrifugare la 1500 rot/min timp de 10 min, schimbând apa purificată sterilă de 5 ori, eliberându-i de suprasediment. La 0,08 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago maydis* se adaugă 0,2 ml de ser antitoxic, apoi până la 1,0 ml soluție de mertiolat de sodiu de 0,01% și se agită. După aceea se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, și se menține la temperatura de 4°C timp de 24 ore; se păstrează în continuare la temperatura de 4°C.

#### Exemplul 2.

Într-o retortă chimic curată se introduc 0,2 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago maydis*, se adaugă 2,0 ml de soluție de substanțe bioactive de 0,05% (Super Bingo), se agită timp de 45 min la aparatul Șutel. Suspensia obținută se filtrează prin filtru tifon-vată de 3 ori.

Clamidosporii *Ustilago maydis* se spală prin centrifugare la 1500 rot/min timp de 10 min, schimbând apa purificată sterilă de 5 ori, eliberându-i de suprasediment. La 0,1 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago maydis* se adaugă 0,35 ml de ser antitoxic, apoi până la 1,0 ml soluție de mertiolat de sodiu de 0,01% și se agită.

După aceasta, se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, și se menține la temperatura de 4°C timp de 24 ore; se păstrează la temperatura de 4°C.

#### Exemplul 3.

Într-o retortă chimic curată se introduc 0,24 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago maydis* se adaugă 2,0 ml de soluție de substanțe bioactive de 0,05% (Uni Det Universal), se agită timp de 60 min la aparatul Șutel. Suspensia obținută se filtrează prin filtru tifon-vată de 3 ori.

Clamidosporii *Ustilago maydis* se spală prin centrifugare la 1500 rot/min timp de 10 min, schimbând apa purificată sterilă de 5 ori, eliberându-i de supersediment. La 0,12 cm<sup>3</sup> de clamidospori *Ustilago maydis* se adaugă 0,5 ml de ser antitoxic, apoi până la 1,0 ml de soluție de mertiolat de sodiu de 0,01% și se agită. După aceasta, se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, și se menține la temperatura de 40°C timp de 34 ore; se păstrează în continuare la temperatura de 4°C.

Pentru indicarea toxigenității microbiene pe o lamă degresată se aplică câte 1 ... 2 picături de imunoreactiv. Apoi, cultura de microorganisme examinată se amestecă cu picătura imunoreactivului.

În cazul reacției pozitive (cultura microbiană toxigenă) apar imunoprecipitate de culoare gri-neagră. Cultura microbiană atoxigenă (reacție negativă) formează în mijlocul picăturii omogen transparente un punct gri-negru cu diametrul de 1 ... 2 mm.

Imunoreactivul propus permite indicarea toxigenității microbiene într-un termen redus (3... 5 min) (tabelul 1), este mai sensibil (tabelul 2), specific (tabelul 3) și se păstrează timp îndelungat (2 ani - termen de observație) (tabelul 4).

Tabelul 1

Timpul indicării toxigenității microbiene

| Nr. d/r | Tulpina microbiană                                    | Timpul indicării toxigenității microbiene |   |                         |   |     |    |    |
|---------|---|---|---|-------------------------|---|-----|----|----|
|         |   | Imunoreactivul propus                     |   | Imunoreactivul cunoscut |   |     |    |    |
|         |   | minute                                    |   | minute                  |   | ore |    |    |
|         |   | 3   | 5 | 3                       | 5 | 24  | 48 | 72 |
| 1.      | <i>C. diphtheriae</i><br>Type strain ATCC 27010       | +   | + | -                       | - | ±   | ±  | +  |
| 2.      | <i>C. diphtheriae</i><br>(Gravis toxigenic) 090653-BB | +   | + | -                       | - | +   | +  | +  |
| 3.      | <i>C. diphtheriae mitis</i> N 10356                   | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 4.      | <i>C. diphtheriae mitis</i> N 3984                    | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 5.      | <i>C. diphtheriae gravis</i> N 10648                  | +   | + | -                       | - | ±   | +  | +  |
| 6.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N090026        | +   | + | -                       | - | ±   | +  | +  |
| 7.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N090065        | +   | + | -                       | - | ±   | +  | +  |
| 8.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N090056        | +   | + | -                       | - | ±   | ±  | +  |
| 9.      | <i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N090056         | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 10.     | <i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N090181         | +   | + | -                       | - | ±   | +  | +  |
| 11.     | <i>C. ulcerans</i> N 1000                             | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 12.     | <i>C. ulcerans</i> ATCC 9015                          | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 13.     | <i>C. aureus</i> ATCC 25923                           | +   | + | -                       | - | ±   | ±  | +  |
| 14.     | <i>S. aureus</i> Cowan                                | +   | + | -                       | - | ±   | ±  | +  |
| 15.     | <i>S. aureus</i> P-209                                | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 16.     | <i>S. aureus</i> Dodon                                | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |
| 17.     | <i>S. aureus</i> Idmișev                              | +   | + | -                       | - | -   | ±  | +  |

Notă: “+” - reacție pozitivă;

“±” - reacție variabilă;

“-” - reacție negativă.

Tabelul 2

Sensibilitatea imunoreactivului pentru indicarea toxigenității microbiene

| Concentrația germenilor, g/ml | Timpul indicării toxigenității germenilor, în min |    |     |                         |    |     |
|-------------------------------|---|----|-----|-------------------------|----|-----|
|                               | Imunoreactivul propus                             |    |     | Imunoreactivul cunoscut |    |     |
|                               | 3'  | 5' | 10' | 3'                      | 5' | 10' |
| 101                           | -   | +  | +   | -                       | -  | -   |
| 102                           | -   | +  | +   | -                       | -  | -   |
| 103                           | +   | +  | +   | -                       | -  | -   |
| 104                           | +   | +  | +   | -                       | -  | -   |
| 105                           | +   | +  | +   | -                       | -  | -   |

|     |   |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|---|
| 106 | + | + | + | - | - | - |
| 107 | + | + | + | - | - | - |

Notă: “+” - reacția pozitivă

“-” - reacția negativă

Tabelul 3

Specificitatea imunoreactivului pentru indicarea toxigenității microbiene

| Nr. d/o | Tulpina microbiană                               | Numărul experimentelor efectuate | Imunoreactivul propus |      |          |     | Imunoreactivul cunoscut |      |          |      |
|---------|--|----------------------------------|-----------------------|------|----------|-----|-------------------------|------|----------|------|
|         |  |                                  | toxigen               |      | atoxigen |     | toxigen                 |      | atoxigen |      |
|         |  |                                  | abs                   | %    | abs      | %   | abs                     | %    | abs      | %    |
| 1.      | <i>C. diphtheriae</i> Type strain: ATCC 2700     | 58                               | 58                    | 100  | -        | -   | 58                      | 100  | -        | -    |
| 2.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> 090653-BB | 59                               | 59                    | 100  | -        | -   | 59                      | 100  | -        | -    |
| 3.      | <i>C. diphtheriae mitis</i> N 10356              | 59                               | 59                    | 100  | -        | -   | 58                      | 98,3 | 1        | 1,7  |
| 4.      | <i>C. diphtheriae mitis</i> N 3984               | 59                               | 58                    | 98,3 | 1        | 1,7 | 58                      | 98,3 | 1        | 1,7  |
| 5.      | <i>C. diphtheriae gravis</i> N 10648             | 14                               | 14                    | 100  | -        | -   | 14                      | 100  | -        | -    |
| 6.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N 090026  | 78                               | 78                    | 100  | -        | -   | 78                      | 100  | -        | -    |
| 7.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N 090065  | 58                               | 58                    | 100  | -        | -   | 58                      | 100  | -        | -    |
| 8.      | <i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N 090056  | 46                               | 46                    | 100  | -        | -   | 46                      | 100  | -        | -    |
| 9.      | <i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N 090076   | 46                               | 46                    | 100  | -        | -   | 46                      | 100  | -        | -    |
| 10.     | <i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N 090181   | 78                               | 78                    | 100  | -        | -   | 76                      | 97,4 | 2        | 2,6  |
| 11.     | <i>C. ulcerans</i> N 1000                        | 47                               | 45                    | 95,7 | 2        | 4,3 | 43                      | 91,5 | 4        | 8,5  |
| 12.     | <i>C. ulcerans</i> ATCC 9015                     | 58                               | 58                    | 100  | -        | -   | 56                      | 96,5 | 2        | 3,5  |
| 13.     | <i>S. aureus</i> ATCC 25923                      | 78                               | 78                    | 100  | -        | -   | 78                      | 100  | -        | -    |
| 14.     | <i>S. aureus</i> Cowan                           | 43                               | 43                    | 100  | -        | -   | 43                      | 100  | -        | -    |
| 15.     | <i>S. aureus</i> P-209                           | 53                               | 53                    | 100  | -        | -   | 53                      | 100  | -        | -    |
| 16.     | <i>S. aureus</i> Dodon                           | 46                               | 46                    | 100  | -        | -   | 46                      | 100  | -        | -    |
| 17.     | <i>S. aureus</i> Idmișev                         | 49                               | 49                    | 100  | -        | -   | 49                      | 100  | -        | -    |
| 18.     | <i>B. cereus</i> ATCC 14579                      | 56                               | -                     | -    | 56       | 100 | -                       | -    | 56       | 100  |
| 19.     | <i>B. cereus</i> ATCC 10702                      | 96                               | -                     | -    | 96       | 100 | -                       | -    | 96       | 100  |
| 20.     | <i>B. cereus</i> 010015                          | 56                               | -                     | -    | 56       | 100 | -                       | -    | 56       | 100  |
| 21.     | <i>S. dysenteriae</i> Type strain: ATCC 13313    | 41                               | -                     | -    | 41       | 100 | -                       | -    | 41       | 100  |
| 22.     | <i>S. Flexneri</i> Type strain: ATCC 29903       | 75                               | -                     | -    | 75       | 100 | 1                       | 1,3  | 74       | 98,7 |
| 23.     | <i>S. sonnei</i> Type strain: ATCC 29930         | 43                               | -                     | -    | 43       | 100 | -                       | -    | 43       | 100  |
| 24.     | <i>V. cholerae</i> Mecnicov                      | 61                               | -                     | -    | 61       | 100 | -                       | -    | 61       | 100  |
| 25.     | <i>B. pertussis</i> Type strain: ATCC 9797       | 71                               | -                     | -    | 71       | 100 | -                       | -    | 71       | 100  |

Tabelul 4

Durata păstrării imunoreactivului pentru indicarea toxigenității microbiene

| Durata păstrării | Imunoreactivul propus |                  |
|------------------|-----------------------|------------------|
|                  | <i>C. diphtheriae</i> | <i>S. aureus</i> |
| 24 ore           | +                     | +                |
| 48 ore           | +                     | +                |
| 72 ore           | +                     | +                |
| 1 lună           | +                     | +                |
| 6 luni           | +                     | +                |
| 1 an             | +                     | +                |
| 1,5 ani          | +                     | +                |
| 2 ani            | +                     | +                |

Notă: Imunoreactivul cunoscut (fâșia îmbibată cu ser antitoxic) se prepară și se utilizează *ex tempore*.