

Invenția se referă la microbiologie și poate fi utilizată pentru cultivarea, diferențierea și izolarea coloniilor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

După esență mai aproape este mediul pentru cultivarea și izolarea microorganismelor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* [1], care conține geloză peptonată (în componența căreia intră agar, hidrolizat pancreatic din pește și clorură de sodiu), extract de drojdii, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină, polimixină M sulfat) și sânge.

Dezavantajul mediului pentru cultivarea microorganismelor cunoscut îl constituie faptul ca el nu permite diferențierea tulpinilor izolate de *Campylobacter* la nivel de specie în baza coloniilor crescute.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în obținerea unui mediu de cultură, capabil a diferenția coloniile *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* după caracterul de creștere a coloniilor diverse, adică după morfologie (aspect), culoare și dimensiuni.

Esența invenției o constituie faptul că mediul pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include agar, extract de drojdii, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină, polimixină M sulfat) și suplimentar hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, clorură de potasiu în următorul raport al ingredientelor, % de masă:

|                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| hidrolizat de cazeină | 45,778...58,913 |
| peptonă fermentativă  | 2,631...5,050   |
| extract de drojdii    | 2,357...3,682   |
| clorură de potasiu    | 0,526...3,365   |
| agar                  | 6,733...10,523  |
| sânge                 | 23,565...36,832 |
| nizoral               | 0,003...0,005   |
| rifampicină           | 0,005...0,008   |
| cefazolină            | 0,007...0,011   |
| polimixină M sulfat   | 0,002...0,004   |

Rezultatul invenției constă în posibilitatea aprecierii coloniilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* după caracterul creșterii, datorită includerii triadei de ingrediente: a hidrolizatului de cazeină a peptonei fermentative și a clorurii de potasiu. Anume aceste componente asigură creșterea abundentă și concomitent diferențiată a speciilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*. Coloniile de *Campylobacter jejuni* sunt mai mici în diametru (până la 1...2 mm), semitransparente, cu o nuanță de culoarea mediului, iar coloniile de *Campylobacter coli* sunt mai mari (până la 3...5 mm în diametru) de culoare cenușie.

Hidrodizatul de cazeină este obținut prin hidroliza fermentativă a cazeinei. Pentru aceasta volumul necesar de apă de robinet se încălzește până la 45°C, se aduce la pH 8,2 și se adaugă 7...10% de cazeină uscată (STAS nr. 1211-41 și TU 153-54). Apa și cazeina se amestecă minuțios, se corectează repetat pH-ul, agitând periodic până la umflarea cazeinei. Se adaugă ulterior 0,5% de pancreatină uscată. Se amestecă din nou și se verifică pH-ul. Procesul de fermentare continuă 16...20 zile la temperatura camerei. Periodic se controlează pH-ul și se agită baloanele. La încetarea fermentării lichidul supernatant de deasupra sedimentului devine limpede și se filtrează ușor. Lichidul limpede menționat, situat deasupra sedimentului prezintă în fond hidrolizatului de cazeină. El se filtrează, se toarnă în flacoane și se sterilizează 30 min la presiunea de 1 atm. Se utilizează pe măsura necesității în condiții aseptice.

Hidrodizatul de cazeină include proteine și aminoacizi, precum și vitamine de grupurile B, C, E, zaharide reducătoare, acizi nucleici și alți factori de creștere. Compoziția biochimică permite hidrodizatul de cazeină să asigure diferențiat necesitățile nutritive ale *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Peptonă fermentativă este un produs obținut în urma hidrolizei fermentative cu pepsină și tripsină din stomacul bovinelor și/sau porcinelor. Stomacul se mărunțește și se lasă pentru fermentare de propriile enzime timp de 18 ore. Produsul obținut se numește peptonă fermentativă și conține un amestec din albumoze, polipeptide și aminoacizi, ultimii constituind o sursă nutritivă importantă pentru microorganismele *Campylobacter*.

În calitate de sursă de ioni de K<sup>+</sup> se utilizează clorura de potasiu în stare chimic pură, produsă de Chimreactiv Donetsk (STAS 4234-74).

În limitele indicate ale ingredientelor a fost obținut un mediu cu caracterele și proprietățile descrise (tabelele 1...3, exemplele 1...5). Astfel mediul pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* poate fi folosit pentru cultivarea, diferențierea, izolarea și indicarea tulpinilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

*Exemplul 1.* Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc 8,5 ml de hidrolizat de cazeină și 91,5 ml de apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

|                      |     |
|----------------------|-----|
| peptonă fermentativă | 0,5 |
| clorură de potasiu   | 0,1 |
| agar                 | 2,0 |
| extract de drojdii   | 0,7 |

Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C în flacon se adaugă amestecul selectiv de antibiotice, care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Apoi se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

Mediul obținut imediat se toarnă în cutii Petri, câte 15...20 ml.

Pentru aprecierea creșterii *Campylobacter* pe mediul propus se face însămânțarea acestora cu o ansă bacteriologică cu diametrul de 2 mm prin metoda sectoarelor Gold. Anterior se prepară suspensii de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* în soluție izotonică cu concentrația de 500 mln/ml (după standardul de turbiditate 5 UI).

Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) având următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| hidrolizat de cazeină | 45,778 |
| peptonă fermentativă  | 2,631  |
| extract de drojdii    | 3,682  |
| clorură de potasiu    | 0,526  |
| agar                  | 10,523 |
| sânge                 | 36,832 |
| nizoral               | 0,005  |
| rifampicină           | 0,008  |
| cefazolină            | 0,011  |
| polimixină M sulfat   | 0,004  |

Toate variantele de preparare a mediului indicate (exemplele 2, 3, 4, 5 în tabelele 1...3) se efectuează analogic experimentului descris.

*Exemplul 2.* Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 10,7 ml hidrolizat de cazeină și 89,3 ml de apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

|                      |      |
|----------------------|------|
| peptonă fermentativă | 0,75 |
| clorură de potasiu   | 0,25 |
| agar                 | 2,0  |
| extract de drojdii   | 0,7  |

Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C în flacon se adaugă amestecul selectiv de antibiotice care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Ulterior se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

Mediul obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) având următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| hidrolizat de cazeină | 50,451 |
| peptonă fermentativă  | 3,471  |
| extract de drojdii    | 3,240  |
| clorură de potasiu    | 1,157  |
| agar                  | 9,257  |

|                     |        |
|---------------------|--------|
| sânge               | 32,399 |
| nizoral             | 0,005  |
| rifampicină         | 0,007  |
| cefazolină          | 0,010  |
| polimixină M sulfat | 0,003  |

*Exemplul 3.* Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 12,8 ml hidrolizat de cazeină și 87,2 ml de apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

|                      |     |
|----------------------|-----|
| peptonă fermentativă | 1,0 |
| clorură de potasiu   | 0,5 |
| agar                 | 2,0 |
| extract de drojdii   | 0,7 |

Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min de presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C în flacon se adaugă amestecul selectiv de antibiotice care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Apoi se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

Mediul obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec de antibiotice având următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| hidrolizat de cazeină | 53,898 |
| peptonă fermentativă  | 4,114  |
| extract de drojdii    | 2,880  |
| clorură de potasiu    | 2,057  |
| agar                  | 8,228  |
| sânge                 | 28,800 |
| nizoral               | 0,004  |
| rifampicină           | 0,007  |
| cefazolină            | 0,009  |
| polimixină M sulfat   | 0,003  |

*Exemplul 4.* Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 14,3 ml hidrolizat de cazeină și 85,7 ml apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

|                      |      |
|----------------------|------|
| peptonă fermentativă | 1,25 |
| clorură de potasiu   | 0,75 |
| agar                 | 2,0  |
| extract de drojdii   | 0,7  |

Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C se adaugă în flacon amestecul selectiv de antibiotice care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Ulterior se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

Mediul nutritiv obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| hidrolizat de cazeină | 55,671 |
| peptonă fermentativă  | 4,734  |
| extract de drojdii    | 2,651  |
| clorură de potasiu    | 2,840  |
| agar                  | 7,574  |

|                     |        |
|---------------------|--------|
| sânge               | 26,510 |
| nizoral             | 0,004  |
| rifampicină         | 0,006  |
| cefazolină          | 0,008  |
| polimixină M sulfat | 0,002  |

*Exemplul 5.* Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 17,1 ml hidrolizat de cazeină și 82,9 ml apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

|                      |     |
|----------------------|-----|
| peptonă fermentativă | 1,5 |
| clorură de potasiu   | 1,0 |
| agar                 | 2,0 |
| extract de drojdii   | 0,7 |

Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C se adaugă în flacon amestecul selectiv de antibiotice care este preparat în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Apoi se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se transferă imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

Mediul nutritiv obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| hidrolizat de cazeină | 58,913 |
| peptonă fermentativă  | 5,050  |
| extract de drojdii    | 2,357  |
| clorură de potasiu    | 3,365  |
| agar                  | 6,733  |
| sânge                 | 23,565 |
| nizoral               | 0,003  |
| rifampicină           | 0,005  |
| cefazolină            | 0,007  |
| polimixină M sulfat   | 0,002. |

Tabelul 1. Sensibilitatea mediului nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*

| Nr. exemplului | Hidrolizat de cazeină | Peptonă fermentativă | Extract de drojdii | Clorură de potasiu | Agar      | Sânge     | Nizoral   | Rifampicină | Cefazolină | Polimixină M sulfat | Rata de creștere (indicele Gold) |
|----------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|---------------------|----------------------------------|
|                | % de masă             | % de masă            | % de masă          | % de masă          | % de masă | % de masă | % de masă | % de masă   | % de masă  | % de masă           |                                  |
| 1              | 45,778                | 2,631                | 3,682              | 0,526              | 10,523    | 36, 832   | 0,005     | 0,008       | 0,011      | 0,004               | 104                              |
| 2              | 50,451                | 3,471                | 3,240              | 1,157              | 9,257     | 32,399    | 0,005     | 0,007       | 0,010      | 0,003               | 104-105                          |
| 3              | 53,898                | 4,114                | 2,880              | 2,057              | 8,228     | 28,800    | 0,004     | 0,007       | 0,009      | 0,003               | 106                              |
| 4              | 55,671                | 4,734                | 2,651              | 2,840              | 7,574     | 26,510    | 0,004     | 0,006       | 0,008      | 0,002               | 105                              |
| 5              | 58,913                | 5,050                | 2,357              | 3,365              | 6,733     | 23,565    | 0,003     | 0,005       | 0,007      | 0,002               | 105                              |

Tabelul 2. Viteza de creștere *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* pe mediul nutritiv

| Nr. exemplului | Hidrolizat de cazeină | Peptonă fermentativă | Extract de drojdii | Clorură de potasiu | Agar      | Sânge     | Nizoral   | Rifampicină | Cefazolină | Polimixină M sulfat | Termenul de apariție a coloniilor zi UI |
|----------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|---------------------|---|
|                | % de masă             | % de masă            | % de masă          | % de masă          | % de masă | % de masă | % de masă | % de masă   | % de masă  | % de masă           |   |
| 1              | 45,778                | 2,631                | 3,682              | 0,526              | 10,523    | 36, 832   | 0,005     | 0,008       | 0,011      | 0,004               | 2-3                                     |
| 2              | 50,451                | 3,471                | 3,240              | 1,157              | 9,257     | 32,399    | 0,005     | 0,007       | 0,010      | 0,003               | 2-3                                     |
| 3              | 53,898                | 4,114                | 2,880              | 2,057              | 8,228     | 28,800    | 0,004     | 0,007       | 0,009      | 0,003               | 2                                       |
| 4              | 55,671                | 4,734                | 2,651              | 2,840              | 7,574     | 26,510    | 0,004     | 0,006       | 0,008      | 0,002               | 2                                       |
| 5              | 58,913                | 5,050                | 2,357              | 3,365              | 6,733     | 23,565    | 0,003     | 0,005       | 0,007      | 0,002               | 2-3                                     |

Tabelul 3. Proprietățile de diferențiere a mediului nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*

| Nr. exemplului | Hidrolizat de cazeină | Peptonă fermentativă | Extract de drojdii | Clorură de potasiu | Agar      | Sânge     | Nizoral   | Rifampicină | Cefazolină | Polimixină M sulfat | Posibilitatea diferențierii C. jejuni, C. coli |
|----------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|---------------------|--|
|                | % de masă             | % de masă            | % de masă          | % de masă          | % de masă | % de masă | % de masă | % de masă   | % de masă  | % de masă           |  |
| 1              | 45,778                | 2,631                | 3,682              | 0,526              | 10,523    | 36, 832   | 0,005     | 0,008       | 0,011      | 0,004               | +  |
| 2              | 50,451                | 3,471                | 3,240              | 1,157              | 9,257     | 32,399    | 0,005     | 0,007       | 0,010      | 0,003               | ++   |
| 3              | 53,898                | 4,114                | 2,880              | 2,057              | 8,228     | 28,800    | 0,004     | 0,007       | 0,009      | 0,003               | +++  |
| 4              | 55,671                | 4,734                | 2,651              | 2,840              | 7,574     | 26,510    | 0,004     | 0,006       | 0,008      | 0,002               | ++   |
| 5              | 58,913                | 5,050                | 2,357              | 3,365              | 6,733     | 23,565    | 0,003     | 0,005       | 0,007      | 0,002               | ++   |

Notă: +++ - Diferențiere înalt pronunțată; ++ - Diferențiere pronunțată; + - Diferențiere slab pronunțată.