



MD 2285 G2 2003.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2285⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/00, 1/02

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2002 0242 (22) Data depozit: 2002.09.27</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.10.31, BOPI nr. 10/2003</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: MELNIC Valentina, MD; SECINSCHI Liviu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Reprezentant: VOZIANU Maria, MD</p>	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată pentru cultivarea și izolarea microorganismelor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Mediul solicitat conține hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, acid L-glutamic, metabisulfid de sodiu, sulfat de fier, rifampicină, cefazolină, nizoral și polimixină M sulfat, având următorul raport al ingredientelor, în % de masă de substanță uscată:

hidrolizat de cazeină	44,67...46,50
peptonă fermentativă	10,05...13,04
extract de drojdii	7,30...9,38
clorură de potasiu	3,35...7,82
agar	20,87...26,80

2	acid L-glutamic	3,76...4,82
	metabisulfid de sodiu	0,32...0,42
5	sulfat de fier	0,32...0,42
	rifampicină	0,012.. 0,015
	cefazolină	0,024...0,031
	nizoral	0,028...0,036
	polimixină M sulfat	0,006...0,008.
10	Rezultatul invenției constă în posibilitatea izolării microorganismelor <i>Campylobacter jejuni</i> și <i>Campylobacter coli</i> și creșterii culturilor repicabile cu păstrarea caracteristicilor cultural-morfologice.	
	Revendicări: 1	

15

MD 2285 G2 2003.10.31

MD 2285 G2 2003 2003.10.31

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată pentru cultivarea și izolarea microorganismelor din genul *Campylobacter*, și anume a speciilor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

5 Este cunoscut mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* [1], care conține hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat.

10 Dezavantajul mediului nutritiv cunoscut îl constituie faptul că el conține sânge, care poate fi infectat cu agenți cauzali ai diferitor boli transmisibile (SIDA, hepatite virale etc.), care prezintă pericol pentru infectarea personalului.

Problema pe care o rezolvă invenția este obținerea unui mediu nutritiv fără sânge, capabil să asigure creșterea și izolarea campilobacteriilor.

Mediul nutritiv propus pentru cultivarea microorganismelor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* are următoarea componență, în % de masă de substanță uscată:

agar	20,87...26,80
hidrolizat de cazeină	44,67...46,50
peptonă fermentativă	10,05...13,04
extract de drojdii	7,30...9,38
clorură de potasiu	3,35...7,82
acid L-glutamic	3,76...4,82
metabisulfid de sodiu	0,32...0,42
sulfat de fier	0,32...0,42
rifampicină	0,012...0,015
cefazolină	0,024...0,031
nizoral	0,028...0,036
polimixină M sulfat	0,006...0,008.

15 Rezultatul invenției constă în posibilitatea izolării microorganismelor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* și creșterii culturilor repicabile cu păstrarea caracteristicilor cultural-morfologice.

20 Hidrolizatul de cazeină este obținut prin hidroliza fermentativă a cazeinei. Pentru aceasta volumul necesar de apă de robinet se încălzește până la 45°C, se ajustează 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 ajustează 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, situat deasupra sedimentului prezintă în fond hidrolizatul de cazeină. El se filtrează, se toarnă în flacoane și se sterilizează 30 min la presiunea de 1 atm. Se utilizează pe măsura necesității din flacon în condiții aseptice.

25 Hidrolizatul de cazeină include proteine și aminoacizi, cât și vitamine din grupele B, C, E, zaharide reducătoare, acizi nucleici și alți factori de creștere. Compoziția biochimică permite hidrolizatului de cazeină să asigure diferențiat necesitățile nutritive ale *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

30 Peptona fermentativă este un produs obținut în rezultatul hidrolizei fermentative cu pepsină și tripsină a stomacurilor de bovine și/sau porcine. Stomacul se mărunțește și se lasă pentru fermentare pe propriile enzime timp de 18 h. Produsul obținut se numește peptonă fermentativă și conține un amestec din albumoze, polipeptide și aminoacizi, ultimii constituind o sursă importantă de nutrienți pentru microorganismele *Campylobacter*.

Extractul de drojdii conține acizi aminici, vitamine, baze purinice și pirimidinice, cationi, cantități mari de acizi nucleici și baze azotate și sunt surse naturale de factori de creștere.

35 În calitate de sursă de ioni de K⁺ se utilizează clorura de potasiu în stare chimic pură, produsă de Chimreactiv Donețk (STAS 4234-74).

40 Hidrolizatul de cazeină, peptona fermentativă, extractul de drojdii și clorura de potasiu favorizează asimilarea acidului L-glutamic de către *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* prevenindu-se epuizarea celulelor în procesul sintezei și transformării lor în forme atipice. Ca rezultat mediul nutritiv permite cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* cu formarea coloniilor repicabile fără variante morfologice cu degradare.

Acidul L-glutamic este introdus în mediul dat ca factor de creștere, asigurând necesitățile nutritive pentru campilobacterii. Metabisulfidul de sodiu și sulfatul de fier sunt incluși în componența mediului ca reagenți care coboară potențialul oxidoreducător al mediului nutritiv și sporesc aerotoleranța campilobacteriilor.

45 În limitele indicate ale ingredientelor a fost obținut mediul cu caracterele și proprietățile descrise (tabelul 1, exemplele 1-3). Astfel mediul pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* poate fi folosit pentru cultivarea și izolarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

MD 2285 G2 2003.10.31

4

Exemplul 1

5 Pentru prepararea mediului nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* într-un flacon steril se introduc consecutiv 31 mg metabisulfid de sodiu și 31 mg sulfat de fier. Într-o eprubetă cu 3...4 ml apă distilată sterilă se introduc 360 mg acid L-glutamic, care foarte repede se dizolvă la neutralizare concomitentă cu soluție 1,0 N sau 2,5 N NaOH până la pH 7,2...7,4. Conținutul eprubetei se transferă în flaconul pregătit anterior pentru dizolvarea celorlalte componente.

10 Separat, în alt flacon steril, se introduc 10,7 ml hidrolizat de cazeină (reziduu uscat – 3334,87 mg) și 89,3 ml de apă distilată. Soluția se filtrează printr-un filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

Amestecul se încălzește până la fierbere. Se apreciază pH-ul soluției ajustându-se la nivel de 7,2. Conținutul primului flacon se transferă în flaconul al doilea, se agită, apoi mediul obținut se sterilizează timp de 20 min la presiunea de 0,5 atm. După sterilizarea și răcirea mediului 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 1,2 mg rifampicină, 2,4 mg cefazolină, 2,8 mg nizoral și 0,6 mg polimixină M sulfat. 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 gata se toarnă imediat câte 15...20 ml în cutii Petri.

20 Pentru aprecierea creșterii *Campylobacter* pe mediul propus însămânțarea acestora se face cu ansa bacteriologică cu diametrul de 2 mm prin metoda sectoarelor Gold. Anterior se prepară suspensii de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* în soluție izotonică la concentrația 500 mln./1 ml (după standardul de turbiditate 5 UI).

25 Un flacon cu mediu nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include agar, hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, acid L-glutamic, metabisulfid de sodiu, sulfat de fier, rifampicină, cefazolină, nizoral și polimixină M sulfat având următorul raport al ingredientelor, în % de masă de substanță uscată:

agar	26,80
hidrolizat de cazeină	44,67
peptonă fermentativă	10,05
extract de drojdii	9,38
clorură de potasiu	3,35
acid L-glutamic	4,82
metabisulfid de sodiu	0,42
sulfat de fier	0,42
rifampicină	0,015
cefazolină	0,031
nizoral	0,036
polimixină M sulfat	0,008.

Următoarele variante (exemplele 2 și 3) de preparare a mediului indicate în tabelul 1-2 se efectuează analogic experimentului descris.

Exemplul 2

30 Pentru prepararea mediului nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* într-un flacon steril se introduc consecutiv 31 mg metabisulfid de sodiu, 31 mg sulfat de fier. Într-o eprubetă cu 3...4 ml apă distilată sterilă se introduc 360 mg acid L-glutamic, care foarte repede se dizolvă la neutralizare concomitentă cu soluție 1,0 N sau 2,5 N NaOH până la pH 7,2...7,4. Conținutul eprubetei se transferă în flaconul pregătit anterior pentru dizolvarea celorlalte componente.

35 Separat, în alt flacon steril, se introduc 12,8 ml hidrolizat de cazeină (reziduu uscat – 3989,38 mg) și 87,2 ml de apă distilată. Soluția obținută se filtrează printr-un filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

Amestecul se încălzește până la fierbere. Se apreciază pH-ul soluției ajustându-se la nivel de 7,2.

40

MD 2285 G2 2003.10.31

5

5 Conținutul primului flacon se transferă în flaconul al doilea, se agită, apoi mediul obținut se sterilizează timp de 20 min la presiunea de 0,5 atm. După sterilizarea și răcirea mediului 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 1,2 mg rifampicină, 2,4 mg cefazolină, 2,8 mg nizoral și 0,6 mg polimixină M sulfat. Se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă e gata și se transferă imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

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

10 Pentru aprecierea creșterii *Campylobacter* pe mediul propus însămânțarea acestora se face cu ansa bacteriologică cu diametrul de 2 mm prin metoda sectoarelor Gold. Anterior se prepară suspensii de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* în soluție izotonică la concentrația 500 mln./1 ml (după standardul de turbiditate 5 UI).

15 Un flacon cu mediu nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include agar, hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, acid L-glutamic, metabisulfid de sodiu, sulfat de fier, rifampicină, cefazolină, nizoral și polimixină M sulfat având următorul raport al ingredientelor, în % de masă de substanță uscată:

agar	23,21
hidrolizat de cazeină	46,29
peptonă fermentativă	11,60
extract de drojdii	8,12
clorură de potasiu	5,80
acid L-glutamic	4,18
metabisulfid de sodiu	0,36
sulfat de fier	0,36
rifampicină	0,014
cefazolină	0,028
nizoral	0,032
polimixină M sulfat	0,007

Exemplul 3

20 Pentru prepararea mediului nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* într-un flacon steril se introduc consecutiv 31 mg metabisulfid de sodiu și 31 mg sulfat de fier. Într-o eprubetă cu 3...4 ml apă distilată sterilă se introduc 360 mg acid L-glutamic, care foarte repede se dizolvă la neutralizare concomitentă cu soluție 1,0 N sau 2,5 N NaOH până la pH 7,2...7,4. Conținutul eprubetei se transferă în flaconul pregătit anterior pentru dizolvarea celorlalte componente.

25 Separat, în alt flacon steril, se introduc 14,3 ml de hidrolizat de cazeină (reziduu uscat – 4456,88 mg) și apă distilată 85,7 ml. Soluția obținută se filtrează printr-un filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

Amestecul se încălzește până la fierbere. Se apreciază pH-ul soluției ajustându-se la nivel de 7,2.

30 Conținutul primului flacon se transferă în flaconul al doilea, se agită, apoi mediul obținut se sterilizează timp de 20 min la presiunea de 0,5 atm. După sterilizarea și răcirea mediului 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 1,2 mg rifampicină, 2,4 mg cefazolină, 2,8 mg nizoral, și 0,6 mg polimixină M sulfat. Se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă e gata și se transferă imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

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

35 Pentru aprecierea creșterii *Campylobacter* pe mediul propus însămânțarea acestora se face cu ansa bacteriologică cu diametrul de 2 mm prin metoda sectoarelor Gold. Anterior se prepară suspensia de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* în soluție izotonică la concentrația 500 mln./1 ml (după standardul de turbiditate 5 UI).

40 Un flacon cu mediu nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include agar, hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, acid L-glutamic, metabisulfid de sodiu, sulfat de fier, rifampicină, cefazolină, nizoral și polimixină M sulfat având următorul raport al ingredientelor, în % de masă de substanță uscată:

agar	20,87
hidrolizat de cazeină	46,50
peptonă fermentativă	13,04
extract de drojdii	7,30
clorură de potasiu	7,82

MD 2285 G2 2003.10.31

6

acid L-glutamic	3,76
metabisulfid de sodiu	0,32
sulfat de fier	0,32
rifampicină	0,013
cefazolină	0,025
nizoral	0,029
polimixină M sulfat	0,006

Tabel

Sensibilitatea mediului pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*

Exemplu, Nr.	Agar	Hidrolizat de cazeină	Peptonă fermentativă	Extract de drojdii	KCl	Acid L-glutamic	Metabisulfid de sodiu	Sulfat de fier	Amestec selectiv de antibiotice	Rata de creștere (indicele Gold)	Morfologia celulelor peste 48 h de creștere	Creșterea tulpinilor după reînsămânțarea coloniilor
	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă			
1	26,80	44,67	10,05	9,38	3,36	4,82	0,42	0,42	0,09	10 ⁴	Tipice	+
2	23,21	46,29	11,60	8,12	5,80	4,18	0,36	0,36	0,08	10 ⁵ ...10 ⁶	Tipice	+
3	20,87	46,50	13,04	7,30	7,82	3,76	0,32	0,32	0,07	10 ⁴ ...10 ⁵	Tipice	+

Notă: "+" – creștere *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*

10

(57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*, care conține hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, acid L-glutamic, metabisulfid de sodiu, sulfat de fier, rifampicină, cefazolină, nizoral și polimixină M sulfat, având următorul raport al ingredientelor în % de masă de substanță uscată:

15	hidrolizat de cazeină	44,67...46,50
	peptonă fermentativă	10,05...13,04
	extract de drojdii	7,30...9,38
20	clorură de potasiu	3,35...7,82
	agar	20,87...26,80
	acid L-glutamic	3,76...4,82
	metabisulfid de sodiu	0,32...0,42
	sulfat de fier	0,32...0,42
25	rifampicină	0,012...0,015
	cefazolină	0,024...0,031
	nizoral	0,028...0,036
	polimixină M sulfat	0,006...0,008

30

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2078 G1 2003.01.31

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria