



MD 2590 G2 2004.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 2590 (13) G2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 Q 1/04,
(C 12 Q 1/04,
C 12 R 1:72)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2003 0243 (22) Data depozit: 2003.10.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.10.31, BOPI nr. 10/2004
(71) Solicitant: GHEORGHÎȚA Tudor, MD (72) Inventatori: GHEORGHÎȚA Tudor, MD; PUȘCAȘ Nicolae, MD; ANGHEL Rita, MD; GHEORGHÎȚA Lilia, MD; BALAN Greta, MD; MARUȘCEAC Alexandru, MD (73) Titular: GHEORGHÎȚA Tudor, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru indicarea levurilor genului *Candida*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la industria microbiologică și
poate fi aplicată pentru indicarea rapidă a levurilor
genului *Candida* la diagnosticul candidozelor,
precum și pentru efectuarea controlului microbiologic
al materiei prime, al preparatelor medicamentoase
și al diverselor obiecte ale mediului ambiant.
Mediul nutritiv solicitat pentru indicarea levurilor
genului *Candida* include bulion peptonat uscat,
glucoză, gelatină, dihidrogenofosfat de sodiu,
hidrogenofosfat de potasiu, mediul 199, roșu de
fenol și ciprofloxacina în următorul raport al
ingredientelor, % de masă:
bulion peptonat uscat 30,41...30,74

2
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, sporirea
sensibilității, selectivității și a specificității de
indicare a levurilor genului *Candida*.
Revendicări: 1

MD 2590 G2 2004.10.31

MD 2590 G2 2004.10.31

3

Descriere:

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, al preparatelor medicamentoase și al diverselor obiecte ale mediului ambiant.

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

10 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*.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 Mediul permite indicarea levurilor genului *Candida* în materialul de examinat în concentrațiile $10^1...10^2$ 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 exemplelor descrise.

40 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

45 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 baie 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 % de masă: bulion peptonat uscat – 30,74; glucoză – 35,86; gelatină –

MD 2590 G2 2004.10.31

4

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

5 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
10 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 % de 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;
15 flacoanele se închid cu dop de cauciuc steril și cu capac metalic.

Exemplul 3

20 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
25 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 % de 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.

30 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.

35 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 $10^3 \dots 10^4$ c.m./ml/g timp de 4...5 ore (tab. 4).

40 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*

45

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	+	+	+	+	+	+	+	-	+
8	Ciprofloxacina	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Indicarea peste 9 ore	Da	Nu	Nu	Var.	Nu	Nu	Var.	Nu	Da

Notă: "+" – prezența ingredientului;

"-" – lipsa ingredientului;

"Da" – permite indicarea levirilor *Candida*;

MD 2590 G2 2004.10.31

5

"Nu" – nu permite indicarea levurilor *Candida*;
 "Var." – rezultatele indicării levurilor *Candida* sunt variabile.

Tabelul 2

5

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

Exemplu	Raportul cantitativ al ingredientelor, în % de masă								Concentrația inițială a levurilor și indicarea lor peste 9 ore de incubare la 37°C					
	Bulion peptonat uscat	Glucoză	Gelatină	Dihidrogenofosfat de sodiu	Hidrogenofosfat de potasiu	Mediul 199	Roșu de fenol	Ciprofloxacina	10 ⁹	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
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	++	+	+	-	-	-

- 10 Notă: "++" – reacția pozitivă (culoarea galbenă evidențiată);
 "+" – reacția slab pozitivă (culoarea gălbuie slab evidențiată);
 "-" – reacția negativă (culoarea roșie).

Tabelul 3

- 15 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	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	

- 20 Notă: "-" – culoare inițială roșie (rezultat negativ);
 "+" – culoare galben deschis (rezultat slab pozitiv);
 "++" – culoare galbenă (rezultat pozitiv);
 "+++ – culoare galben închis (rezultat pozitiv evidențiat).

MD 2590 G2 2004.10.31

6

Tabelul 4

5 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
10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
10 ²	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
10 ³	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
10 ⁴	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++
10 ⁵	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++
10 ⁶	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
10 ⁷	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁸	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁹	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10 Notă: "-" – culoare inițială roșie (rezultat negativ);
 "+" – culoare galben deschis (rezultat slab pozitiv);
 "++" – culoare galbenă (rezultat pozitiv);
 "+++ – culoare galben închis (rezultat pozitiv evidențiat).

Tabelul 5

15 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> ^o ATCC 10231	1	-	1	1	1
2	<i>C. tropicalis</i> ^o	1	-	1	1	1
3	<i>C. krusei</i> ^o	1	-	1	1	1
4	<i>C. albicans</i> *	54	-	23	48	54
5	<i>T. mentagrophytes</i> ^o	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 ^o	1	-	1	-	-
9	<i>S. aureus</i> P-209 ^o	1	-	1	-	-
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ^o	1	-	1	-	-
11	<i>S. aureus</i> Cowan ^o	1	-	-	-	-
12	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990 ^o	1	-	1	-	-
13	<i>S. pyogenes</i> ATCC 12344 ^o	1	-	1	-	-
14	<i>S. faecium</i> NCTC 7171 ^o	1	-	-	-	-
15	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 ^o	1	-	-	-	-
16	<i>B. cereus</i> ATCC 10702 ^o	1	-	-	-	-
17	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27583 ^o	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	-	-

20 Notă: ^o – tulpini de referință;
 * – tulpini clinice.

MD 2590 G2 2004.10.31

7

(57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru indicarea levurilor genului *Candida*, care include o bază nutritivă și glucoză, **caracterizat prin aceea că** în calitate de bază nutritivă se utilizează bulion peptonat uscat și conține suplimentar gelatină, dihidrogenofosfat de sodiu, hidrogenofosfat de potasiu, mediul 199, roșu de fenol și ciprofloxacina luate în următorul raport al ingredientelor, % de masă:

5	bulion peptonat uscat	30,41...30,74
	glucoză	35,86...39,10
	gelatină	14,77...15,37
	dihidrogenofosfat de sodiu	11,60...13,58
10	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.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Ioan Coman, Mihai Mareș. Micologie medicală aplicată. Iași, Editura Junimea, 2000, p. 39-40

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2003 0243		
(22) Data depozit: 2003.10.13		
(51) ⁷ : C 12 Q 1/04 // (C 12 Q 1/04, C 12 R 1:72) Titlul : Mediu de cultură pentru indicarea levurilor genului <i>Candida</i> (71) Solicitantul : GHEORGHITA Tudor, MD Termeni caracteristici : indicarea levurilor genului <i>Candida</i> , medile de cultură pentru indicarea acestora		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7) (MD, EA, SU) MD 1993 – 2004; EA 1996 – 2004; SU – certif. de autori, colecția BRTȘ Int. Cl. ⁷ C 12 Q 1/04// (C 12 Q 1/04, C 12 R 1:72		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Ioan Coman, Mihai Mares, Micologie medicală aplicată. Editura Junimea. Iași, 2000, p. 39-40	1
A	SU 1631091, A1, 1991.02.28	1
A	SU 1330156, A1, 1987.08.15	1
A	SU 1766074, A1, 1994.08.15	1
A	SU 1632044, A1	1
A	SU 1669189, A1	1
A	SU 1381993, A1	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2004.08.12
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr deposit:	
Date de identificare ale documentelor citate in raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4