



MD 2285 F1 2003.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2285 (13) F1 (51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/00, 1/02

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2002 0242 (22) Data depozit: 2002.09.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.10.31, BOPI nr. 10/2003
(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	

(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 sodiu, 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 sodiu	3,35...7,82

2	agar	20,87...26,80
	acid L-glutamic	3,76...4,82
5	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.
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 F1 2003.10.31

MD 2285 F1 2003.10.31

3

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.

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.

- 10 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.

Hidrolizat 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.

- 20 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*.

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*.

- 25 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).

Hidrolizat 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.

- 40 Acidul L-glutamic este introdus în mediul dat ca factor de creștere, asigurând necesitățile nutritive pentru campilobacterii. Metabisulfitul 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 F1 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 15 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 F1 2003.10.31

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.

10 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

MD 2285 F1 2003.10.31

6

extract de drojii	7,30
clorură de potasiu	7,82
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

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

Exem- plu, Nr.	Agar	Hidrolizat de cazeină	Peptonă fermen- tativă	Extract de drojii	KCl	Acid L-glu- tamic	Metabi- sulfid de sodiu	Sulfat de fier	Amestec selectiv de antibiotice	Rata de creștere (indicele Gold)	Morfologia celulelor peste 48 h de creștere	Creșterea tulpinilor după reînsămân- țarea colo- niilor
	% 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*

MD 2285 F1 2003.10.31

7

5 (57) Revendicare:

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

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

25

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2078 G1 2003.01.31

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0242		
(22) Data depozit: 2002.09.27		
(51) ⁷ : C 12N 1/00, 1/02 Alți indici de clasificare: Titlul : Mediu nutritiv pentru cultivarea Campylobacter jejuni și Campylobacter coli (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : mediile nutritive, cultivarea Campylobacter jejuni și Campylobacter coli		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
(MD, EA, SU) MD 1994 – 2003; EA – 1996-2003; SU – certificate de autor, fondul BRIT Int. Cl. ⁷		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 616	1
A	MD 695	1
A	MD 671	1
A	MD 232	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		2003.06.04
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

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