



MD 2886 G2 2005.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2886** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0301 (22) Data depozit: 2004.12.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.10.31, BOPI nr. 10/2005
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventator: MELNIC Valentina, 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 anume la medii nutritive și poate fi aplicată pentru izolarea, cultivarea și diferențierea coloniilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Mediul nutritiv conține hidrolizat pancreatic de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, dihidrogenofosfat de potasiu, hidrogenofosfat de sodiu, L-glutamină, metabisulfat

2

5 de sodiu, sulfat de fier, agar, rifampicină, cefazolină, nízoral și polimixină M sulfat.

Rezultatul constă în asigurarea menținerii unui pH optimal pentru izolarea, cultivarea și diferențierea coloniilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

10 Revendicări: 1

MD 2886 G2 2005.10.31

MD 2886 G2 2005.10.31

3

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, și anume la medii nutritive și poate fi aplicată pentru în calitate de cea mai apropiată soluție servește mediul 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, nizoral, rifampicină, cefazolină, polimixină M sulfat [1].

Dezavantajul mediului nutritiv cunoscut îl constituie faptul ca el conține acid L-glutamic care nu se dizolvă în apă rece, soluțiile lui apoase au pH și necesită neutralizare suplimentară cu baze la introducerea în componența mediului de cultură.

Problema pe care o soluționează invenția propusă constă în obținerea unui mediu nutritiv capabil să asigure menținerea pH-ului optimal pentru izolarea, cultivarea și diferențierea concomitentă a *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*. Mediul nutritiv propus pentru izolarea, cultivarea și diferențierea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* soluționează problema pusă prin aceea că conține următoarele ingrediente, în % de masă de substanță uscată:

hidrolizat pancreatic de cazeină	43,845...46,223
peptonă fermentativă	10,991...11,590
extract de drojdii	7,694...8,113
clorură de potasiu	5,496...5,795
dihidrogenofosfat de potasiu	0,232...0,440
hidrogenofosfat de sodiu	0,580...1,099
L-glutamină	3,477...7,694
metabisulfid de sodiu	0,341...0,359
sulfat de fier	0,341...0,359
agar	21,983...23,180
rifampicină	0,013...0,014
cefazolină	0,026...0,028
nizoral	0,028...0,032
polimixină M sulfat	0,007.

Datorită includerii în componența mediului a L-glutaminei, dihidrogenofosfatului de potasiu și hidrogenofosfatului de sodiu s-a obținut un mediu nutritiv nou, mai simplu în pregătire, care datorită menținerii pH-ului optimal, asigură posibilitatea izolării, cultivării și diferențierii concomitente a coloniilor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Hidrolizatul pancreatic de cazeină (TY 9385-002-004737-94) este obținut prin hidroliza fermentativă a cazeinei. El include proteine și aminoacizi, cât și vitamine din grupele B, C, E, zaharide reducătoare, acizi nucleici, microelemente și alți factori de creștere. Compoziția biochimică permite hidrolizatului pancreatic 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 de propriile enzime timp de 18 ore. Produsul obținut 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.

L-glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) este un aminoacid, derivat al acidului L-glutamic, în care grupa CO este substituită prin grupa aminică NH_2 . Datorită acestei compoziții proprietățile fizico-chimice ale L-glutaminei esențial se deosebesc de cele ale acidului L-glutamic, L-glutamina este ușor solubilă în apă rece, soluțiile apoase ale L-glutaminei au pH-ul 5, 6. L-glutamina este inclusă în componența mediului dat ca factor care asigură necesitățile nutritive pentru campilobacterii.

Dihidrogenofosfatul de potasiu (KH_2PO_4) și hidrogenofosfatul de sodiu (Na_2HPO_4) sunt incluși în componența mediului ca substanțe cu capacități bufer, capabile de a intra în reacție atât cu acizii, cât și cu bazele, neutralizându-le și astfel menținând pH-ul mediului constant. Anume complexul constituit din L-glutamină, dihidrogenofosfatul de potasiu și hidrogenofosfatul de sodiu asigură pH-ul constant (7,2...7,4) al mediului de cultură propus, factor important pentru cultivarea campilobacteriilor.

Pentru favorizarea asimilării nutrienților în componența mediului sunt incluși ioni de K^+ . Conductibilitatea ionilor de K^+ prin peretele celular și membrana citoplasmatică ale *Campylobacter* depășește conductibilitatea ionilor de Na^+ și favorizează transportul substanțelor în celula microbiană. Concomitent ionii de K^+ sunt co-factorii fermenților, care participă în sinteza proteinelor. În calitate de sursă de ioni de K^+ în componența mediului este inclusă clorura de potasiu în stare chimic pură, produsă de Chimreactiv Donetk (STAS 4234-74). Metabisulfidul de sodiu ($Na_2S_2O_5$) și sulfatul de fier ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) sunt incluși

MD 2886 G2 2005.10.31

4

în componența mediului ca reagenți care micșorează potențialul oxidoreducător și sporesc aerotoleranța campilobacteriilor.

Antibioticele (rifampicina, cefazolina, nizoralul, polimixina M sulfat) sunt incluse în componența mediului pentru inhibarea creșterii microflorei asociative din prelevate, prezentată prin microorganisme grampozitive, gramnegative și fungi.

Componența indicată a mediului nutritiv asigură creșterea diferențiată a tulpinilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*, făcând posibilă diferențierea lor în baza aspectului și morfologiei coloniilor.

În limitele indicate ale ingredientelor a fost obținut un mediu nutritiv cu caracterele și proprietățile descrise (vezi tabelul, exemplele 1-3). Astfel mediul nutritiv cu compoziția indicată poate fi folosit pentru izolarea, cultivarea și diferențierea coloniilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Exemplul 1

Pentru prepararea mediului nutritiv pentru izolarea, cultivarea și diferențierea microorganismelor din genul *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* într-un flacon steril se introduc 100,00 ml de apă distilată și se adaugă consecutiv (în mg):

hidrolizat pancreatic de cazeină	3989,00
peptonă fermentativă	1000,00
extract de drojdii	700,00
clorură de potasiu	500,00
dihidrogenofosfat de potasiu	20,00
hidrogenofosfat de sodiu	50,00
metabisulfid de sodiu	31,00
sulfat de fier	31,00
agar	2000,00.

Amestecul se încălzește, se fierbe 3...5 min, apoi se verifică și se ajustează pH-ul la 7,2...7,4. Mediul obținut se sterilizează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în mediu se adaugă 300 mg de L-glutamină. Preventiv L-glutamina se dizolvă în 1...2 ml de apă distilată sterilizată și se fierbe timp de 15 min. După răcirea mediului până la 50°C în el se adaugă suplimentul selectiv de antibiotice, care include cefazolină 2,40 mg, nizoral 2,80 mg, polimixină M sulfat 0,60 mg, dizolvate în 1...2 ml de apă distilată sterilizată, și rifampicină 1,2 mg, dizolvată preventiv în 1...2 picături de alcool.

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

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

Mediul nutritiv pentru izolarea, cultivarea și diferențierea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține hidrolizat pancreatic de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, dihidrogenofosfat de potasiu, hidrogenofosfat de sodiu, L-glutamină, metabisulfid de sodiu, sulfat de fier, agar, rifampicină, cefazolină, nizoral, polimixină M sulfat, ingredientele fiind luate în următorul raport, în % de masă de substanță uscată:

hidrolizat pancreatic de cazeină	46,233
peptonă fermentativă	11,590
extract de drojdii	8,113
clorură de potasiu	5,795
dihidrogenofosfat de potasiu	0,232
hidrogenofosfat de sodiu	0,580
L-glutamină	3,477
metabisulfid de sodiu	0,359
sulfat de fier	0,359
agar	23,180
rifampicină	0,014
cefazolină	0,028
nizoral	0,028
polimixină M sulfat	0,007.

MD 2886 G2 2005.10.31

5

Toate variantele indicate de preparare a mediului (exemplele 2, 3, vezi tabelul) se efectuează analogic experimentului descris.

Exemplul 2

- 5 Pentru prepararea mediului nutritiv pentru izolarea, cultivarea și diferențierea microorganismelor din genul *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* într-un flacon steril se introduc 100,00 ml de apă distilată și se adaugă consecutiv (în mg):

hidrolizat pancreatic de cazeină	3989,00
peptonă fermentativă	1000,00
extract de drojdii	700,00
clorură de potasiu	500,00
dihidrogenofosfat de potasiu	30,00
hidrogenofosfat de sodiu	75,00
metabisulfat de sodiu	31,00
sulfat de fier	31,00
agar	2000,00.

- 10 Amestecul se încălzește și se fierbe 3...5 min, apoi se verifică și se ajustează pH-ul la 7,2...7,4. Mediul obținut se sterilizează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în mediu se adaugă 500 mg L-glutamină. Preventiv L-glutamina se dizolvă în 1...2 ml de apă distilată sterilizată și se fierbe timp de 15 min. După răcirea mediului până la 50°C se adaugă suplimentul selectiv de antibiotice, care include cefazolină 2,40 mg, nizoral 2,80, polimixină M sulfat 0,60 mg, dizolvate în 1...2 ml de apă distilată sterilizată, și rifampicină 1,2 mg, dizolvată preventiv în 1...2 picături de alcool.

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

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

- 20 Mediul nutritiv pentru izolarea, cultivarea și diferențierea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include hidrolizat pancreatic de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, dihidrogenofosfat de potasiu, hidrogenofosfat de sodiu, L-glutamină, metabisulfat de sodiu, sulfat de fier, agar, rifampicină, cefazolină, nizoral, polimixină M sulfat, ingredientele fiind luate în următorul raport, în % de masă de substanță uscată:

hidrolizat pancreatic de cazeină	45,007
peptonă fermentativă	11,283
extract de drojdii	7,898
clorură de potasiu	5,641
dihidrogenofosfat de potasiu	0,338
hidrogenofosfat de sodiu	0,846
L-glutamină	5,641
metabisulfat de sodiu	0,350
sulfat de fier	0,350
agar	22,566
rifampicină	0,014
cefazolină	0,027
nizoral	0,032
polimixină M sulfat	0,007.

25

Exemplul 3

Pentru prepararea mediului nutritiv pentru izolarea, cultivarea și diferențierea microorganismelor din genul *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* într-un flacon steril se introduc 100,00 ml de apă distilată și se adaugă consecutiv (în mg):

hidrolizat pancreatic de cazeină	3989,00
peptonă fermentativă	1000,00
extract de drojdii	700,00
clorură de potasiu	500,00
dihidrogenofosfat de potasiu	40,00
hidrogenofosfat de sodiu	100,00
metabisulfat de sodiu	31,00
sulfat de fier	31,00
agar	2000,00.

MD 2886 G2 2005.10.31

6

- Amestecul se încălzește și se fierbe 3...5 min, apoi se verifică și se ajustează pH-ul la 7,2...7,4. Mediul obținut se sterilizează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în mediu se adaugă 700 mg L-glutamină. Preventiv L-glutamina se dizolvă în 1...2 ml de apă distilată sterilizată și se fierbe timp de 15 min. După răcirea mediului până la 50°C se adaugă suplimentul selectiv de antibiotice, care include cefazolină 2,40 mg, nizoral 2,80 mg, polimixină M sulfat 0,60 mg, dizolvate în 1...2 ml de apă distilată sterilizată, și rifampicină 1,2 mg, dizolvată preventiv în 1...2 picături de alcool.

- Mediul gata se toarnă imediat în cutii Petru a câte 15...20 ml.
- Pentru aprecierea creșterii *Campylobacter* pe mediul propus se face însămânțarea acestora cu ansa bacteriologică cu diametrul de 2 mm prin metoda sectoarelor Gould. Anterior se prepară suspensii de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* în soluție izotonică la concentrația de 500 ml/1 ml (după standardul de turbiditate 5 U).

- Mediul nutritiv pentru izolarea, cultivarea și diferențierea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include hidrolizat pancreatic de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, dihidrogenofosfat de potasiu, hidrogenofosfat de sodiu, L-glutamină, metabisulfît de sodiu, sulfat de fier, agar, rifampicină, cefazolină, nizoral, polimixină M sulfat, ingredientele sunt luate în următorul raport, în % de masă de substanță uscată:

hidrolizat pancreatic de cazeină	43,845
peptonă fermentativă	10,991
extract de drojdii	7,694
clorură de potasiu	5,496
dihidrogenofosfat de potasiu	0,440
hidrogenofosfat de sodiu	1,099
L-glutamină	7,694
metabisulfît de sodiu	0,341
sulfat de fier	0,341
agar	21,983
rifampicină	0,013
cefazolină	0,026
nizoral	0,031
polimixină M sulfat	0,007.

Tabel

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

Exemplu nr.	Hidrolizat pancreatic de carne	Pentona fermentativă	Extrac de drojii	KCl	Dihidro-orto-fosfat de potasiu	Hidrogeno-fosfat de sodiu	L-glutamină	Meta-bisulfid de sodiu	Sulfat de fier	Rifampicina	Cefazolină	Nizoral	Poli-mixina M sulfat	Rata de creștere (indicele Gould)	Termenul apariției coloniilor (zile)	Morfologia celulelor pe suprafața de creștere	Posibilitatea de diferențiere a coloniilor <i>C. coli</i> și <i>C. jejuni</i>
	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă				
1	46,233	11,590	8,113	5,795	0,232	0,580	3,477	0,359	0,359	0,014	0,028	0,028	0,007	10 ⁴	2-3	Tipice	++
2	45,007	11,283	7,898	5,641	0,338	0,846	5,641	0,350	0,350	0,014	0,027	0,032	0,007	10 ⁵ ...10 ⁶	2	Tipice	+++
3	43,845	10,991	7,694	5,496	0,440	1,099	7,694	0,341	0,341	0,013	0,026	0,031	0,007	10 ⁴ ...10 ⁵	2	Tipice	+++

MD 2886 G2 2005.10.31

8

(57) Revendicare:

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

hidrolizat pancreatic de cazeină	43,845...46,223
peptonă fermentativă	10,991...11,590
extract de drojdii	7,694...8,113
clorură de potasiu	5,496...5,795
dihidrogenofosfat de potasiu	0,232...0,440
hidrogenofosfat de sodiu	0,580...1,099
L-glutamină	3,477...7,694
metabisulfid de sodiu	0,341...0,359
sulfat de fier	0,341...0,359
agar	21,983...23,180
rifampicină	0,013...0,014
cefazolină	0,026...0,028
nizoral	0,028...0,032
polimixină M sulfat	0,007.

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2285 F1 2003.10.31

Director Departament:

JOVMIR Tudor

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0301	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2004.12.27	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : C 12 N 1/20; C 12 Q 1/04 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 : mediu nutritiv, Campylobacter jejuni, Campylobacter coli	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))	
MD 1994-2004, EA 1996-2004, SU 1970-1994	
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/20; C 12 Q 1/04	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente
A	MD 232 B2 30.06.1995
A	MD 616 B2 30.11.1996
A	MD 617 B2 30.11.1996
A	MD 671 F1 31.01.1997
A	MD 2078 F1 31.01.2003
A	MD 2285 F1 31.10.2003
A	
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II	
☐ 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 evidență 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	01.08.2005
Examinatorul	Ala Gușan