



MD 1689 F1

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1689⁽¹³⁾ F1
(51) Int. Cl.⁷: C 12 Q 1/00, 1/04;
C 12 R 1/16

(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 2000 0033 (22) Data depozit: 2000.02.17	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.06.30, BOPI nr. 6/2001
(71) Solicitant: Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova, MD (72) Inventatori: GHEORGHIȚĂ Tudor, MD; ANGHEL Margarita, MD (73) Titular: Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru determinarea *Corynebacterium diphtheriae*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie și poate fi
utilizată la determinarea rapidă a *Corynebacterium* 5
diphtheriae.
Esența invenției constă în aceea că mediul
nutritiv include cistină, telurit de potasiu,
hidroxid de sodiu, hiposulfid de sodiu, mediul 199
și bulion peptonat uscat în următorul raport al
ingredientelor, în % de masă:
cistină 32,8...36,4
telurit de potasiu 10,9...11,7

2
hidroxid de sodiu 1,3...1,5
hiposulfid de sodiu 5,4...5,9
mediul 199 1,5...2,0
bulion peptonat uscat 43,7...46,8.
Rezultatul invenției constă în accelerarea
indicării *Corynebacterium diphtheriae* și în
sporirea sensibilității mediului nutritiv.
10
Revendicări: 1

MD 1689 F1

MD 1689 F1

3

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și poate fi utilizată la determinarea rapidă a *Corynebacterium diphtheriae*.

După esența tehnică mai aproape este mediul de cultură cistină-telurit-ser Tinsdal-Sadăcov [1], care conține cistină, telurit de potasiu, hidroxid de sodiu, hiposulfid de sodiu și ser de câine sau bovine, utilizat pentru cultivarea *Corynebacterium diphtheriae* timp de 24...48 ore de incubare la 37°C. Mediul se păstrează 3...4 zile.

Dezavantajul mediului de cultură cunoscut este durata îndelungată de cultivare (24...48 ore), sensibilitatea insuficientă și durata mică de păstrare. Acest mediu nu permite cultivarea și indicarea celulelor unice de *Corynebacterium diphtheriae* timp de 7...9 ore de incubare la 37°C.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în crearea unui mediu de cultură ce permite accelerarea indicării *Corynebacterium diphtheriae* și în sporirea sensibilității mediului nutritiv.

Esența invenției constă în aceea că mediul de cultură pentru determinarea *Corynebacterium diphtheriae* include cistină, telurit de potasiu, hidroxid de sodiu, hiposulfid de sodiu, factori de creștere și bază nutritivă peptonată. În calitate de factori de creștere mediul solicitat conține mediul 199, iar în calitate de bază nutritivă peptonată - bulion peptonat uscat în următorul raport al ingredientelor, în % de masă: cistină 32,8...36,4; telurit de potasiu 10,9...11,7; hidroxid de sodiu 1,3...1,5; hiposulfid de sodiu 5,4...5,9; mediul 199 1,5...2,0, bulion peptonat uscat 43,7...46,8.

Rezultatul invenției constă în accelerarea indicării *Corynebacterium diphtheriae* și în sporirea sensibilității mediului nutritiv datorită factorilor de creștere ai mediului 199 și bazei nutritive peptonate. Bulionul peptonat uscat, cistina și teluritul de potasiu se utilizează în calitate de substrat specific, scindarea lor permite indicarea *Corynebacterium diphtheriae* care împreună cu hidroxidul și hiposulfitul de sodiu determină selectivitatea mediului.

Mediul 199 se introduce în calitate de factor obligatoriu de creștere, iar bulionul peptonat uscat ca baza nutritivă peptonată care favorizează accelerarea creșterii și multiplicării *Corynebacterium diphtheriae* ce permite sporirea sensibilității mediului, scindarea cistinei și teluritul de potasiu ca substrat specific împreună cu hidroxidul și hiposulfitul de sodiu, creează condiții de indicare și selectivitate pentru *Corynebacterium diphtheriae*.

Mediul de cultură solicitat permite cultivarea și indicarea *Corynebacterium diphtheriae* timp de 7...9 ore în concentrațiile inițiale 1...10 c.m./ml, în cazul când conține toate ingredientele (tabelul 1), în limitele indicate (tabelul 2). Mediul este selectiv (tabelul 3), deoarece alte culturi microbiene nu cresc, ceea ce confirmă specificitatea și selectivitatea lui.

În limitele indicate ale ingredientelor au fost obținute medii cu caracterele și proprietățile identice descrise (tabelul 2, exemplele 2, 3, 4). Toate variantele (exemplele 2, 3, 4) de preparare a mediului indicate în tabelul 2 se efectuează analogic exemplilor descrise.

În urma uscării în flacoane a 0,2 ml de mediu solicitat la temperatura de 37...45°C timp de 1,5...2 ore se obține o peliculă cristalizată fixată la fundul flaconului.

Astfel mediul de cultură preparat în formă de peliculă cristalizată poate fi folosit pentru indicarea *Corynebacterium diphtheriae* în materialul de cercetat și își păstrează proprietățile timp de 2 ani (termenul de observare) (tabelul 4).

Exemplul 1

Pentru prepararea mediului nutritiv solicitat într-o retortă sterilă și chimic curată se toarnă ingredientele în prealabil sterilizate: bulion peptonat 20% - 1,5 ml; soluție de cistină 10% - 2,5 ml; hidroxid de sodiu 0,1N - 2,5 ml; soluție telurit de potasiu 5% - 1,5 ml; soluție hiposulfid de sodiu 2,5% - 1,5 ml și mediul 199 - 6,5 ml. Mediul lichid obținut se agită, se introduce câte 0,2 ml în 80 flacoane de sticlă sterile cu volumul de 10 ml, apoi se usucă la temperatura de 37...45°C și se sterilizează în razele ultraviolete timp de 1,5...2 ore. Se închid cu dopuri de cauciuc sterile, apoi cu capace metalice.

Un flacon cu mediu nutritiv uscat pentru determinarea *Corynebacterium diphtheriae* include cistină, telurit de potasiu, hidroxid și hiposulfid de sodiu, mediul 199 și bulion peptonat uscat în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

cistină	36,4
telurit de potasiu	10,9
hidroxid de sodiu	1,5
hiposulfid de sodiu	5,4
mediul 199	2,0
bulion peptonat uscat	43,7

MD 1689 F1

4

Exemplul 2

Pentru prepararea mediului nutritiv solicitat într-o retortă sterilă și chimic curată se toarnă ingredientele în prealabil sterilizate: bulion peptonat 20% - 2,0 ml, soluție de cistină 10% - 3,0 ml, hidroxid de sodiu 0,1N - 3,0 ml, soluție de telurit de potasiu 5% - 2,0 ml, soluție de hiposulfid de sodiu 2,5% - 2,0 ml și mediul 199 - 7,0 ml.

Mediul lichid obținut se agită, se introduce câte 0,2 ml în 95 flacoane de sticlă sterile cu volumul de 10 ml, apoi se usucă la temperatura de 37...45°C și se sterilizează în razele ultraviolete timp de 1,5...2,0 ore. Se închid cu dopuri de cauciuc sterile, apoi cu capace metalice.

Un flacon cu mediu nutritiv uscat pentru determinarea *Corynebacterium diphtheriae* include cistină, telurit de potasiu, hidroxid și hiposulfid de sodiu, mediul 199 și bulion peptonat uscat în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

cistină	34,2
telurit de potasiu	11,4
hidroxid de sodiu	1,4
hiposulfid de sodiu	5,7
mediul 199	1,7
bulion peptonat uscat	45,6

Exemplul 3

Pentru prepararea mediului nutritiv solicitat într-o retortă sterilă și chimic curată se toarnă ingredientele în prealabil sterilizate: bulion peptonat 20% - 2,5 ml, soluție de cistină 10% - 3,5 ml, hidroxid de sodiu 0,1N - 3,5 ml, soluție telurit de potasiu 5% - 2,5 ml, soluție hiposulfid de sodiu 2,5% - 2,5 ml și mediul 199 - 7,5 ml.

Mediul lichid obținut se agită, se introduce câte 0,2 ml în 110 flacoane de sticlă sterile cu volumul de 10 ml, apoi se usucă la temperatura de 37...45°C și se sterilizează în razele ultraviolete timp de 1,5...2,0 ore. Se închid cu dopuri de cauciuc sterile, apoi cu capace metalice.

Un flacon cu mediu nutritiv uscat pentru determinarea *Corynebacterium diphtheriae* include cistină, telurit de potasiu, hidroxid și hiposulfid de sodiu, mediul 199 și bulion peptonat uscat în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

cistină	32,8
telurit de potasiu	11,7
hidroxid de sodiu	1,3
hiposulfid de sodiu	5,9
mediul 199	1,5
bulion peptonat uscat	46,8

În flaconul cu mediu uscat se introduce materialul de examinat în 2,0 ml apă purificată sterilă. Timp de 2...3 minute mediul se dizolvă, apoi se incubează în termostat la 37°C timp de 7...9 ore. În cazul prezenței *Corynebacterium diphtheriae* în materialul de analizat mediul se colorează în negru pronunțat, pe când în control - culoarea rămâne roz-surie.

Timpul indicării *Corynebacterium diphtheriae* depinde de concentrația inițială a germenilor în materialul de analizat. Indicarea a 10...100 c.m./ml este posibilă peste 7...9 ore, iar 1 mlrd și mai mult c.m./ml peste 3...5 ore de incubare.

Tabelul 1

Influența ingredientelor mediului nutritiv uscat la indicarea *Corynebacterium diphtheriae*

Nr.	Ingrediente, partea componentă a mediului	Variantele componenței mediului și rezultatele indicării						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
1	Cistină	-	+	+	+	+	+	+
2	Telurit de potasiu	+	-	+	+	+	+	+
3	Hidroxid de sodiu	+	+	-	+	+	+	+
4	Hiposulfid de sodiu	+	+	+	-	+	+	+
5	Mediu 199	+	+	+	+	-	+	+
6	Bulion peptonat uscat	+	+	+	+	+	-	+
Indicarea <i>Corynebacterium diphtheriae</i> până la 9 ore		-	-	-	-	-	-	+

Notă: "+" - prezența ingredientului;
 "-" - lipsa ingredientului.

MD 1689 F1

5

Tabelul 2

Sensibilitatea mediului la indicarea *Corynebacterium diphtheriae* în funcție de componența cantitativă a mediului

5

Exemplu	Bulion peptonat uscat	Cistină	Telurit de potasiu	Hiposulfat de sodiu	Mediul 199	Hidroxid de sodiu	Sensibilitatea
	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	
1	41,8	38,3	10,4	5,1	2,4	1,6	+
2	43,7	36,4	10,9	5,4	2,0	1,5	++
3	45,6	34,5	11,4	5,7	1,7	1,4	+++
4	46,8	32,8	11,7	5,9	1,5	1,3	++
5	50,4	27,7	12,6	6,8	0,9	1,0	-

Notă: “+++” - înalt sensibil;

“++” - sensibil;

“+” - slab sensibil;

“-” - insensibil.

10

Tabelul 3

Timpul indicării *Corynebacterium diphtheriae* în funcție de concentrația microorganismelor în materialul analizat

15

Concentrația materialului analizat în ml/g	Timpul indicării (ore)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
10 ²	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
10 ³	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
10	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++
10	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
10	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
10	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Notă: “+++” - reacție pozitivă pronunțată;

“++” - reacție pozitivă;

“+” - reacție slab pozitivă;

“-” - reacție negativă.

20

MD 1689 F1

6

Tabelul 4

5

Durata păstrării calității și sterilității mediului nutritiv uscat
pentru indicarea *Corynebacterium diphtheriae*

Durata observărilor	Timpul indicării <i>Corynebacterium diphtheriae</i> în concentrații inițiale 10-100 c.m./ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
7 zile	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
15 zile	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
30 zile	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2 luni	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3 luni	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
9 luni	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
12 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
24 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Notă: "+" - creșterea *Corynebacterium diphtheriae*;
"-" - lipsa creșterii *Corynebacterium diphtheriae*.

10

(57) Revendicare :

15 Mediu nutritiv pentru determinarea *Corynebacterium diphtheriae*, care include cistină, telurit de potasiu, hidroxid de sodiu, hiposulfid de sodiu, factori de creștere și bază nutritivă peptonată, **caracterizat prin aceea că** în calitate de factori de creștere mediul nutritiv conține mediul 199, iar în calitate de bază nutritivă peptonată - bulion peptonat uscat în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

20	cistină	32,8...36,4
	telurit de potasiu	10,9...11,7
	hidroxid de sodiu	1,3...1,5
	hiposulfid de sodiu	5,4...5,9
	mediul 199	1,5...2,0
	bulion peptonat uscat	43,7...46,8.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования под редакцией М.О. Биргера, 3-е издание, дополненное и перераб., Москва, Медицина, 1982, с. 73-74

Şef Secție: CRASNOVA Nadejda

Examinator: BAZARENCO Tatiana

Redactor: CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0033		
(22) Data depozit: 2000.02.17		
(51) Int. Cl. (7) : C 12 Q 1/00, 1/04 (52) Alți indici de clasificare: C 12 R 1:16 (54) Titlul : Mediu de cultură selectiv pentru determinarea <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (71) Solicitantul : Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova, MD (54) Termeni caracteristici : mediu nutritiv, determinarea <i>Corynebacterium diphtheriae</i>		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indicii de clasificare)		
(51) C.I.B. 7: C 12 Q 1/00, 1/04; C 12 R 1:16 MD 1993-2000; EA 1996-2000		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	a 2000 0031	1
☐ 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 depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		T - document publicat după data depozitului 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 data 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 când 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 efectuării documentării		01.02.12
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

ANEXĂ la RAPORTUL DE DOCUMENTARE

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