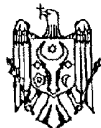




MD 2078 F1 2003.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2078 (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 0095 (22) Data depozit: 2002.03.14	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.01.31, BOPI nr. 1/2003
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: MELNIC Valentina, MD; SICINSCHI 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

2

Invenția se referă la microbiologie și poate fi utilizată pentru cultivarea, diferențierea și izolarea coloniilor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Mediul solicitat conține hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat, în următorul raport al ingredientelor (% de masă):

hidrolizat de cazeină	45,778...58,913
peptonă fermentativă	2,631...5,050
extract de drojdii	2,357...3,682

5	clorură de potasiu	0,526...3,365
	agar	6,733...10,523
	sânge	23,565...36,832
	nizoral	0,003...0,005
	rifampicină	0,005...0,008
	cefazolină	0,007...0,011
10	polimixină M sulfat	0,002...0,004.

Rezultatul invenției constă în posibilitatea diferențierii timpurii a coloniilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* și în reducerea duratei analizei bacteriologice.

15 Revendicări: 1

MD 2078 F1 2003.01.31

MD 2078 F1 2003.01.31

3

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și poate fi utilizată pentru cultivarea, diferențierea și izolarea coloniilor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

5 După esență mai aproape este mediul pentru cultivarea și izolarea microorganismelor *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* [1], care conține geloză peptonată (în componența căreia intră agar, hidrolizat pancreatic din pește și clorură de sodiu), extract de drojdii, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină, polimixină M sulfat) și sânge.

Dezavantajul mediului pentru cultivarea microorganismelor cunoscut îl constituie faptul ca el nu permite diferențierea tulpinilor izolate de *Campylobacter* la nivel de specie în baza coloniilor crescute.

10 Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în obținerea unui mediu de cultură, capabil a diferenția coloniile *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* după caracterul de creștere a coloniilor diverse, adică după morfologie (aspect), culoare și dimensiuni.

15 Esența invenției o constituie faptul că mediul pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* include agar, extract de drojdii, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină, polimixină M sulfat) și suplimentar hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, clorură de potasiu în următorul raport al ingredientelor, % de masă:

hidrolizat de cazeină	45,778...58,913
peptonă fermentativă	2,631...5,050
extract de drojdii	2,357...3,682
clorură de potasiu	0,526...3,365
agar	6,733...10,523
sânge	23,565...36,832
nizoral	0,003...0,005
rifampicină	0,005...0,008
cefazolină	0,007...0,011
polimixină M sulfat	0,002...0,004.

20 Rezultatul invenției constă în posibilitatea aprecierii coloniilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* după caracterul creșterii, datorită includerii triadei de ingrediente: a hidrolizatului de cazeină, a peptonei fermentative și a clorurii de potasiu. Anume aceste componente asigură creșterea abundentă și concomitent diferențiată a speciilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*. Coloniile de *Campylobacter jejuni* sunt mai mici în diametru (până la 1...2 mm), semitransparente, cu o nuanță de culoarea mediului, iar coloniile de *Campylobacter coli* sunt mai mari (până la 3...5 mm în diametru) de culoare cenușie.

25 Hidrodizatul de cazeină este obținut prin hidroliza fermentativă a cazeinei. Pentru aceasta volumul necesar de apă de robinet se încălzește până la 45°C, se aduce 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 verifică 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 de deasupra sedimentului devine limpede și se filtrează ușor. Lichidul limpede menționat, situat deasupra sedimentului prezintă în fond hidrolizat de cazeină. El se filtrează, se toarnă în flacoane și se sterilizează 30 min la presiunea de 1 atm. Se utilizează pe măsura necesității în condiții aseptice.

30 Hidrodizatul de cazeină include proteine și aminoacizi, precum și vitamine de grupurile B, C, E, zaharide reducătoare, acizi nucleici și alți factori de creștere. Compoziția biochimică permite hidrodizatul de cazeină să asigure diferențiat necesitățile nutritive ale *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

35 Peptonă fermentativă este un produs obținut în urma hidrolizei fermentative cu pepsină și tripsină din stomacul bovinelor și/sau porcinelor. Stomacul se mărunțește și se lasă pentru fermentare de propriile enzime timp de 18 ore. Produsul obținut se numește peptonă fermentativă și conține un amestec din albumoze, polipeptide și aminoacizi, ultimii constituind o sursă nutritivă importantă pentru microorganismele *Campylobacter*.

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

45 În limitele indicate ale ingredientelor a fost obținut un mediu cu caracterele și proprietățile descrise (tabelele 1...3, exemplele 1...5). Astfel mediul pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* poate fi folosit pentru cultivarea, diferențierea, izolarea și indicarea tulpinilor de *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*.

Exemplul 1. Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc 8,5 ml de hidrolizat de cazeină și 91,5 ml de apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

MD 2078 F1 2003.01.31

4

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

5 Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C în flacon se adaugă amestecul selectiv de antibiotice, care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Apoi se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

10 Mediul obținut imediat se toarnă în cutii Petri, câte 15...20 ml.

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

15 Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) având următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

hidrolizat de cazeină	45,778
peptonă fermentativă	2,631
extract de drojdii	3,682
clorură de potasiu	0,526
agar	10,523
sânge	36,832
nizoral	0,005
rifampicină	0,008
cefazolină	0,011
polimixină M sulfat	0,004

20 Toate variantele de preparare a mediului indicate (exemplele 2, 3, 4, 5 în tabelele 1...3) se efectuează analogic experimentului descris.

Exemplul 2. Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 10,7 ml hidrolizat de cazeină și 89,3 ml de apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

25 Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C în flacon se adaugă amestecul selectiv de antibiotice care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Ulterior se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

30 Mediul obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) având următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

hidrolizat de cazeină	50,451
peptonă fermentativă	3,471
extract de drojdii	3,240
clorură de potasiu	1,157
agar	9,257
sânge	32,399
nizoral	0,005
rifampicină	0,007
cefazolină	0,010

MD 2078 F1 2003.01.31

5

polimixină M sulfat 0,003

Exemplul 3. Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 12,8 ml hidrolizat de cazeină și 87,2 ml de apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

- 5 Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min de presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C în flacon se adaugă amestecul selectiv de antibiotice care se prepară în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Apoi se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele.
- 10 Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

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

- 15 Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec de antibiotice având următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

hidrolizat de cazeină	53,898
peptonă fermentativă	4,114
extract de drojdii	2,880
clorură de potasiu	2,057
agar	8,228
sânge	28,800
nizoral	0,004
rifampicină	0,007
cefazolină	0,009
polimixină M sulfat	0,003

Exemplul 4. Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 14,3 ml hidrolizat de cazeină și 85,7 ml apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

- 20 Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea 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 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Ulterior se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele. Soluția selectivă obținută se trece imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.
- 25

Mediul nutritiv obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

- 30 Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține: hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

hidrolizat de cazeină	55,671
peptonă fermentativă	4,734
extract de drojdii	2,651
clorură de potasiu	2,840
agar	7,574
sânge	26,510
nizoral	0,004
rifampicină	0,006
cefazolină	0,008
polimixină M sulfat	0,002

MD 2078 F1 2003.01.31

6

Exemplul 5. Pentru prepararea mediului nutritiv într-un flacon steril se introduc: 17,1 ml hidrolizat de cazeină și 82,9 ml apă distilată. Soluția se filtrează prin filtru de hârtie, apoi la ea se adaugă (în g):

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

- 5 Se aduce pH-ul soluției la nivel de 7,2. Sterilizarea mediului se efectuează timp de 20 min la presiunea de 1 atm. După sterilizare în flaconul cu mediu fierbinte se adaugă în condiții aseptice 7 ml de sânge și se amestecă minuțios. După răcirea până la 50°C se adaugă în flacon amestecul selectiv de antibiotice care este preparat în prealabil în modul următor: într-un tub steril se introduc consecutiv 1 mg nizoral, 1,6 mg rifampicină, 2,1 mg cefazolină și 0,75 mg polimixină M sulfat. Apoi se adaugă 2,0 ml apă distilată sterilă și se dizolvă ingredientele.
- 10 Soluția selectivă obținută se transferă imediat cu o pipetă sterilă în flaconul cu mediul răcit către acest moment până la aproximativ 50°C.

Mediul nutritiv obținut imediat se toarnă, câte 15...20 ml, în cutii Petri.

- 15 Mediul nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* conține hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, amestec selectiv de antibiotice (nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat) în următorul raport al ingredientelor, în % de masă:

hidrolizat de cazeină	58,913
peptonă fermentativă	5,050
extract de drojdii	2,357
clorură de potasiu	3,365
agar	6,733
sânge	23,565
nizoral	0,003
rifampicină	0,005
cefazolină	0,007
polimixină M sulfat	0,002.

Tabelul 1

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

Nr. exemplului	Hidrolizat de cazeină	Peptonă fermentativă	Extract de drojdii	Clorură de potasiu	Agar	Sânge	Nizoral	Rifampicină	Cefazolină	Polimixină M sulfat	Rata de creștere (indicele Gold)
	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă		
1	45,778	2,631	3,682	0,526	10,523	36,832	0,005	0,008	0,011	0,004	10 ⁴
2	50,451	3,471	3,240	1,157	9,257	32,399	0,005	0,007	0,010	0,003	10 ⁴ -10 ⁵
3	53,898	4,114	2,880	2,057	8,228	28,800	0,004	0,007	0,009	0,003	10 ⁶
4	55,671	4,734	2,651	2,840	7,574	26,510	0,004	0,006	0,008	0,002	10 ⁵
5	58,913	5,050	2,357	3,365	6,733	23,565	0,003	0,005	0,007	0,002	10 ⁵

20

Tabelul 2

Viteza de creștere *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* pe mediul nutritiv

Nr. exemplului	Hidrolizat de cazeină	Peptonă fermentativă	Extract de drojdii	Clorură de potasiu	Agar	Sânge	Nizoral	Rifampicină	Cefazolină	Polimixină M sulfat	Termenul de apariție a coloniilor zi
	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă		
1	45,778	2,631	3,682	0,526	10,523	36,832	0,005	0,008	0,011	0,004	2-3
2	50,451	3,471	3,240	1,157	9,257	32,399	0,005	0,007	0,010	0,003	2-3
3	53,898	4,114	2,880	2,057	8,228	28,800	0,004	0,007	0,009	0,003	2
4	55,671	4,734	2,651	2,840	7,574	26,510	0,004	0,006	0,008	0,002	2

MD 2078 F1 2003.01.31

7

5	58,913	5,050	2,357	3,365	6,733	23,565	0,003	0,005	0,007	0,002	2-3
---	--------	-------	-------	-------	-------	--------	-------	-------	-------	-------	-----

Tabelul 3

5 Proprietățile de diferențiere a mediului nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*

Nr. exemplului	Hidrolizat de cazeină	Peptonă fermentativă	Extract de drojdii	Clorură de potasiu	Agar	Sânge	Nizoral	Rifampicină	Cefazolină	Polimixină M sulfat	Posibilitatea diferențierii C. jejuni, C. coli
	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	% de masă	
1	45,778	2,631	3,682	0,526	10,523	36,832	0,005	0,008	0,011	0,004	+
2	50,451	3,471	3,240	1,157	9,257	32,399	0,005	0,007	0,010	0,003	++
3	53,898	4,114	2,880	2,057	8,228	28,800	0,004	0,007	0,009	0,003	+++
4	55,671	4,734	2,651	2,840	7,574	26,510	0,004	0,006	0,008	0,002	++
5	58,913	5,050	2,357	3,365	6,733	23,565	0,003	0,005	0,007	0,002	++

Notă: +++ - Diferențiere înalt pronunțată;
++ - Diferențiere pronunțată;
+ - Diferențiere slab pronunțată.

10

(57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*, care include hidrolizat de cazeină, peptonă fermentativă, extract de drojdii, clorură de potasiu, agar, sânge, nizoral, rifampicină, cefazolină și polimixină M sulfat, în următorul raport al ingredientelor (% de masă):

15

hidrolizat de cazeină	45,778...58,913
peptonă fermentativă	2,631...5,050
extract de drojdii	2,357...3,682
clorură de potasiu	0,526...3,365
agar	6,733...10,523
sânge	23,565...36,832
nizoral	0,003...0,005
rifampicină	0,005...0,008
cefazolină	0,007...0,011
polimixină M sulfat	0,002...0,004

20

25

30

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 232 C2 1995.11.20

Șef Secție: GUȘAN Ala
Examinator: BAZARENCO Tatiana
Redactor: LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0095		
(22) Data depozit: 2001.03.14		
(51) ⁷ : C 12 N1/00, 1/02 Alți indici de clasificare: C 12 Q 1/00 Titlul : Mediu nutritiv pentru cultivarea <i>Campylobacter jejuni</i> și <i>Campilobacter coli</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : mediu nutritiv, cultivarea speciilor <i>Campilobacter jejuni</i> și <i>Campilobacter coli</i>		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
(MD, EA, SU) MD – 1993-2002; EA – 1996-2002; certificate de autor – fondul BRIT Int. Cl. ⁷		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 671	1
A	MD 695	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		2002.11.22
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