



(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. cerere: 93-00629

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: 05.05.93

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
30.05.95 BOPI nr. 5/95

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.04.96 BOPI nr. 4/96

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 89255

(45) Data eliberării și eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: Institutul de Biologia Dezvoltării, București, RO

(73) Titular: (71)

(72) Inventatori: Radu Gabriel - Lucian, Constantinescu Cristian, Moldoveanu Dumitru, RO

Mandatar: -

(54) Medii pentru culturi de microorganisme

(57) Rezumat: Invenția se referă la medii pentru culturi de microorganisme, care cuprind o sursă de azot, constituită din extract de carne până la 50 % și preparat colagenic, până la 100 % sau

ser normal 1 ... 2 % și preparat colagenic 10 ... 20 % restul componentelor fiind cele uzuale.

Revendicări: 1

RO 110828 B



1

Prezenta invenție se referă la noi medii pentru culturi de microorganisme, utilizate în cercetare la obținerea serurilor de diagnostic sau pentru prepararea de vaccinuri.

Se cunosc mai multe medii de cultură a germenilor bacterieni (grupul *Brucella*, *Leptospira*, *Mycobacterium* etc) în a căror compoziție se includ în proporții variate fie extractul de carne, fie serurile normale (de cal, iepure sau bou), fie L-amino-acizi.

Dezavantajele acestor medii constau în aceea că germenii obținuți pot prezenta forme "R" aglutinabile și nu se pot utiliza la prepararea antigenilor. Utilizarea serurilor normale are dezavantajul existenței unui anumit grad de citotoxicitate, depinzând de proveniența lor. Toate componentele amintite sunt greu accesibile și costisitoare.

Problema pe care o rezolvă invenția este înlocuirea parțială a extractului de carne, a serurilor normale de diferite proveniențe și a L-amino acizilor din componența diferitelor medii folosite la cultivarea diverselor grupe de germeni și obținerea în condiții eficiente a unor culturi de microorganisme.

Mediile de cultură, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că cuprind : o sursă de azot constituită din extract de carne până la 50 % și preparat colagenic până la 100 % sau ser normal 1 ... 2 % și preparat colagenic 10 ... 20 %, restul componentelor fiind cele uzuale.

Avantajele mediilor, realizate conform invenției, constau în aceea că :

- se obțin simplu, în condiții de

2

eficiență prin reducerea parțială a cantităților unor componente, ca : extractul de carne, serul normal, L-asparagina;

- permite diminuarea riscurilor de citotoxicitate ;

- conduce la obținerea de cantități crescute de antigeni cu potențiale biologice necesare.

Se dau în continuare mai multe exemple de cultivare a unor germeni bacterieni, în medii de cultură, conform invenției.

Exemplul 1. Cultivarea germenului *Brucella abortus* 99, necesar la prepararea antigenului brucelic RAL-RFC, se face pe plăci Roux în mod curent folosind mediile :

Agar	25 %	25 %
Extract mînzat	100 l	50 l
Infuzie cartof	-	sau 50 l
Peptona(Oxoid)	10 %	10 %
NaCl	5 %	5 %
Glucosa	10 %	10 %
Glicerina	20 %	20 %

Rezultatele extractului de carne cu preparatul colagenic lucrându-se cu 5600 plăci sunt prezentate în tabelul 1. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin folosirea în părți egale a celor două componente (grupa C). Este posibilă și o înlocuire în totalitate a extractului de carne, însă cantitatea de antigen se reduce cu 50 % față de grupa martor (grupa A). Rezultate bune în comparație cu martorul s-a obținut și în cazul înlocuirii a 65 ... 100 % din extract atunci când în formula mediului a fost introdusă infuzia de cartofi (grupa B).

Tabelul 1

Influența înlocuirii extractului de mînzat la cultivarea germenului *Brucella*.

Grupa de plăci	Compoziții a mediului	Nr.plăci	Cantitatea totală de antigen		Cantitatea de antigen la 100 plăci	
			Doze	Litri	Doze	Litri
A	Mediul 1'	400	46.600	10	11.500	2,5
B	Mediul 2'	800	165.600	36	20.700	4,5
B	Mediul 3'	400	78.200	17	19.550	4,25
B	Mediul 4'	800	161.000	35	20.125	4,375
C	Mediul 5'	800	230.000	50	28.750	6,25
D(martor)	Mediul 6'	2.400	556.600	121	23.291	5,041

Mediul 1': Preparat colagenic 100 l.
 Mediul 2': Preparat colagenic 70 l, infuzie cartofi 30 l, peptona.
 Mediul 3': Preparat colagenic 45 l, infuzie cartofi 30 l, extract mînzat 25 l, 5
 peptona.
 Mediul 4': Preparat colagenic 35 l, infuzie cartofi 30 l, extract mînzat 35 l, peptona.
 Mediul 5': Preparat colagenic 50 l, 10
 extract mînzat 50 l, peptona.
 Mediul 6': Extract mînzat 100 l, peptona.

În locul peptonei (Oxoid) se mai poate folosi triptoză fosfat broth (TPB-

Difco) în proporție de 1,5 %, cantitățile celorlalte ingrediente rămânând neschimbate față de formula de bază a mediului. Rezultatele obținute pe 6.535 de plăci cu mediu gelozat, glucozat, glicerinat prezentate în tabelul 2 demonstrează posibilitatea înlocuirii totale (grupa E) sau parțiale (grupa F) a extractului de carne cu preparatul pe bază de collagen. Compararea este făcută prin raportarea la cantitatea totală sau la numărul de doze de antigen față de grupa de plăci martor (grupa G).

Tabelul 2

Influența înlocuirii beef extractului la cultivarea germenului Brucella abortus 99 asupra cantității de antigen brucelic RAL-RFC.

Grupa de plăci	Compoziția mediului	Nr.plăci	Cantitatea totală de antigen		Cantitatea de antigen la 100 plăci	
			Doze	Litri	Doze	Litri
E	Mediul 1"	2.195	425.500	92,5	19.385	4,214
F	Mediul 2"	2.340	388.700	84,5	16.610	3,611
G(martor)	Mediul 3"	1.200	280.600	69	24.450	5,750
G(martor)	Mediul 4"	400	78.000	17	19.500	4,250
G(martor)	Mediul 5"	400	64.400	14	16.100	3,500

Mediul 1" : Preparat colagenic 100 l, 30
 TPB, glucoza, glicerina, NaCl.

Mediul 2" : Preparat colagenic 50 l, beef extract 5 % -50 l, TPB, glicerina, NaCl.

Mediul 3" : Beef extract 5 % - 100 l, TPB 15 %, glucoza, glicerina, NaCl. 35

Mediul 4" : Extract mînzat 50 l, Infuzie cartofi 50 l, TPB 15 %, glucoza, glicerina, NaCl.

Mediul 5" : Beef extract 5 % - 50 l, infuzie cartofi 50 l, TPB 15 %, glucoza, 40
 glicerina, NaCl.

Germenii obținuți prin cultivarea în agar cu extract de carne, peptonat, glucozat, glicerinat au prezentat forme R (rofizate) care au aglutinat la proba cu 45
 tripaflavina și care nu pot fi utilizate la prepararea antigenelor brucelice de diagnostic pentru reacția de aglutinare lentă sau pentru țesutul inelar cu lapte de vacă. 50

Germenii obținuți prin cultivarea în mediu care a conținut preparatul pe bază de collagen au prezentat forme S neaglutinabile, ceea ce a permis în final obținerea a 17.000 doze de antigen care au corespuns normelor de control.

Preparatul colagenic se prepară astfel : se dizolvă collagen pulbere cu greutatea moleculară 3 000 ... 15 000, în apă bidistilată, în raport în greutate de 5 : 87, la cald, sub agitare continuă, se precipită collagenul din soluția obținută prin adăugarea de NaCl p.a. în raport în greutate față de cantitatea inițială de collagen de 2,09 : 5, se îndepărtează partea lichidă prin sifonare, se aduce din nou în soluție precipitatul, prin adăugarea unei cantități de apă bidistilată egală cu cea inițială și agitare energetică, se corectează pH-ul soluției rezultate la valoarea 6,8 ... 7 și se filtrează, peste

soluția filtrată se adaugă o soluție de NaCl și KCl dizolvate în apă bidistilată, se răcește la temperatura de 20°C, se ajustează din nou pH-ul la valoarea 6,8 ... 7 cu soluție 1 N de HCl și se condiționează fie sub formă de soluție în sticle brune sterilizate, care se autoclavează la temperatura de 120°C, timp de 30 minute, fie sub formă de pulbere, obținută prin atomizare, în pungi de plastic închise etanș și sterilizate cu radiații gamma Co⁶⁰.

Exemplul 2. Cultivarea germenilor din grupul *Leptospira* pentru obținerea vaccinului antileptosporic se face pe mediul Korthof, care are următoarea formulă clasică :

Peptona Witte	1,6 g	
NaCl	2,8 g	
NaHCO ₃	0,04 g	20
KCl	0,08 g	
KH ₂ PO ₄	0,36 g	
Na ₂ HPO ₄	1,92 g	
Apă distilată	2000 l	
Ser de iepure	5 %	25

S-a efectuat cultivarea germenilor *Leptospira pomona* și *hios* în medii în care serul normal de iepure a fost de 1 ... 2 %, iar preparatul pe bază de collagen 10 % și, respectiv, 20 %. Culturile făcute în baloane Erlenmayer și în baloane de 15 l au permis realizarea unui număr de 4 pasaje de cultivare, care au condus la o dezvoltare corespunzătoare a germenilor, cu toate că conținutul de ser normal al mediului a fost diminuat.

Exemplul 3. Cultivarea germenilor din grupul *Mycobacterium tubercu-*

losis se face în general în medii care conțin L-asparagina în proporție de 1 ... 2 g %. În locul L-asparaginei, mediul pe care l-am folosit a conținut glutamat de sodiu și preparatul pe bază de collagen, restul compoziției mediului în sărurile minerale, glucoza și microelementele a rămas neschimbat. Rezultatele au arătat o dezvoltare superioară a germenilor în mediul realizat conform invenției, urmărindu-se atât dezvoltarea microbacteriilor, cât și producția de tuberculo-proteinei specifice, care este principiul activ din produsul de diagnostic.

În mod asemănător ca în exemplele 1, 2 și 3 se pot cultiva și *Pasteurella*, *Salmonella*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Brucella ovis* în medii de cultură clasice, în care se înlocuiește parțial extractul de carne sau serurile normale, în vederea obținerii de vaccinuri și/sau seruri de diagnoză.

Revendicare

Medii pentru culturi de microorganisme, **caracterizate prin aceea că**, în scopul obținerii în condiții de eficiență, a unor culturi de germeni bacterieni utilizați în cercetare și la prepararea de vaccinuri și seruri de diagnoză, cuprind o sursă de azot constituită din extract de carne până la 50 % și preparat collagenic până la 100 % sau ser normal 1 ... 2 % și preparat collagenic 10 ... 20 %, restul componentelor fiind cele uzuale.

Președintele comisiei de examinare: **farm. Pentelescu Elena**
Examinator: **biochim. Crețu Adina**