



MD 2286 B2 2003.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2286⁽¹³⁾ B2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 Q 1/00, 1/04

(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 2001 0039 (22) Data depozit: 2001.02.14 (41) Data publicării cererii: 2002.08.31, BOPI nr. 8/2002	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.10.31, BOPI nr. 10/2003
(71) Solicitant: GHEORGHÎȚA Tudor, MD (72) Inventatori: GHEORGHÎȚA Tudor, MD; ANGHEL Rita, MD; PUȘCAȘ Nicolae, MD; CHIRILĂ Liliana, RO (73) Titular: GHEORGHÎȚA Tudor, MD	

(54) Imunoreactiv pentru indicarea toxigenității microbiene

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată pentru indicarea rapidă a toxigenității microbiene.

Imunoreactivul include ser imun antitoxic, clamidospori de *Ustilago maydis* și soluție de 0,01% de mertiolat de sodiu, având următorul raport al ingredientelor, în % de volum:

ser imun antitoxic 20,0...50,0

2
5 clamidospori de *Ustilago maydis* 8,0...12,0
soluție de 0,01% de mertiolat de sodiu restul.
Rezultatul invenției constă în accelerarea indicării toxigenității microbiene, sporirea sensibilității și specificității reactivului, precum și în mărirea termenului lui de păstrare.

10 Revendicări: 1

MD 2286 B2 2003.10.31

MD 2286 B2 2003.10.31

3

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată pentru indicarea rapidă a toxigenității microbiene.

Este cunoscut imunoreactivul, care reprezintă o fâșie de hârtie de filtru sterilă îmbibată cu ser antitoxic (antidiferic sau antistafilococic), utilizat în reacția imunologică de precipitare difuză în gel (reacția Elek-Oucherlony-Frochiser), care se bazează pe interacțiunea exotoxinei microbiene cu antitoxina imunoreactivului în rezultatul căreia apare fenomenul de precipitare [1].

Pentru indicarea toxigenității microbiene în cutia Petri se toarnă până la 15 ml de geloză topită, apoi răcită la 45°C. După coagularea mediului, pe el se amplasează imunoreactivul (antidiferic sau antistafilococic).

Cultura cercetată se însămânțează prin metoda "plăcuțelor" cu diametrul de 0,8...1,0 cm. Evidența rezultatelor se efectuează peste 24...48 ore. Cultura cercetată e considerată toxigenă dacă liniile de precipitare sunt clare și se contopesc cu liniile de precipitare ale tulpinii de control (toxigene).

Dezavantajul imunoreactivului cunoscut este necesitatea de preparare ex tempore, durata îndelungată de indicare a toxigenității microbiene (peste 24...48 ore), sensibilitatea și specificitatea mică și durata de păstrare insuficientă.

Imunoreactivul nu permite indicarea toxigenității microbiene în concentrații inițiale mici ($10^1...10^3$) c.m./ml într-o perioadă mai mică de timp (3...5 min).

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în accelerarea indicării toxigenității microbiene, sporirea sensibilității, specificității și păstrării pe un termen mai îndelungat a imunoreactivului.

Problema se soluționează prin folosirea imunoreactivului care include ser imun antitoxic, fixat pe purtător, și mertiolat de sodiu. În calitate de purtător se utilizează clamidosporii *Ustilago maydis* în următorul raport al ingredientelor, în % de volum: ser imun antitoxic (antidiferic sau antistafilococic) 20,0...50,0; clamidosporii *Ustilago maydis* 8,0...12,0; soluție de mertiolat de sodiu de 0,01%.

Clamidosporii *Ustilago maydis* în componența imunoreactivului servesc ca purtători ai antitoxinelor, ce permit accelerarea indicării toxigenității microbiene, sporirea sensibilității și specificității, iar mertiolatul de sodiu stabilizează, conservează și mărește termenul de păstrare al imunoreactivului.

Imunoreactivul propus permite o economisire esențială a componentelor utilizate și simplifică analizele efectuate.

Pentru prepararea imunoreactivului se prelucrează clamidosporii *Ustilago maydis* cu ajutorul soluțiilor de detergenți de 0,05% Super Bingo, sau Omo Automat sau Uni Det Universal. Se filtrează, apoi se spală repetat (3...5 ori) prin centrifugare pentru eliberarea suspensiei de balast.

După aceea, la 1 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis* se adaugă soluție de mertiolat de sodiu de 0,01%. La această suspensie se adaugă ser imun antitoxic, se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, apoi se menține la 4...7°C timp de 24 ore.

Astfel se obține imunoreactivul pentru indicarea toxigenității microbiene a *Corynebacterium diphtheriae* sau *Staphylococcus aureus*, care se păstrează la temperatura de 4...7°C timp de 2 ani (termen de observare).

Exemplul 1

Într-o retortă chimic curată se introduc 0,16 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis*, se adaugă 2,0 ml de soluție de detergent de 0,05% (Omo automat), se agită timp de 30 min la aparatul Șutel. Suspensia obținută se filtrează prin filtru tifon-vată de 3 ori.

Clamidosporii *Ustilago maydis* se spală prin centrifugare la 1500 rot/min timp de 10 min, schimbând apa purificată sterilă de 5 ori, eliberându-i de suprasediment. La 0,08 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis* se adaugă 0,2 ml de ser antitoxic, apoi până la 1,0 ml soluție de mertiolat de sodiu de 0,01% și se agită. După aceea se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, și se menține la temperatura de 4°C timp de 24 ore; se păstrează în continuare la temperatura de 4°C.

Exemplul 2

Într-o retortă chimic curată se introduc 0,2 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis*, se adaugă 2,0 ml de soluție de detergent de 0,05% (Super Bingo), se agită timp de 45 min la aparatul Șutel. Suspensia obținută se filtrează prin filtru tifon-vată de 3 ori.

Clamidosporii *Ustilago maydis* se spală prin centrifugare la 1500 rot/min timp de 10 min, schimbând apa purificată sterilă de 5 ori, eliberându-i de suprasediment. La 0,1 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis* se adaugă 0,35 ml de ser antitoxic, apoi până la 1,0 ml soluție de mertiolat de sodiu de 0,01% și se agită.

După aceasta, se termostatează la 37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, și se menține la temperatura de 4°C timp de 24 ore; se păstrează la temperatura de 4°C.

Exemplul 3

Într-o retortă chimic curată se introduc 0,24 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis* se adaugă 2,0 ml de soluție de detergent de 0,05% (Uni Det Universal), se agită timp de 60 min la aparatul Șutel. Suspensia obținută se filtrează prin filtru tifon-vată de 3 ori.

Clamidosporii *Ustilago maydis* se spală prin centrifugare la 1500 rot/min timp de 10 min, schimbând apa purificată sterilă de 5 ori, eliberându-i de suprasediment. La 0,12 cm³ de clamidosporii *Ustilago maydis* se adaugă 0,5 ml de ser antitoxic, apoi până la 1,0 ml de soluție de mertiolat de sodiu de 0,01% și se agită. După aceasta, se termostatează la

MD 2286 B2 2003.10.31

4

37°C timp de 60 min, agitând peste fiecare 10 min, și se menține la temperatura de 4°C timp de 34 ore; se păstrează în continuare la temperatura de 4°C.

Pentru indicarea toxigenității microbiene pe o lamă degresată se aplică câte 1...2 picături de imunoreactiv. Apoi, cultura de microorganisme examinată se amestecă cu picătura imunoreactivului.

5 În cazul reacției pozitive (cultura microbiană toxigenă) apar imunoprecipitate de culoare gri-neagră. Cultura microbiană atoxigenă (reacție negativă) formează în mijlocul picăturii omogen transparente un punct gri-negru cu diametrul de 1...2 mm.

Imunoreactivul propus permite indicarea toxigenității microbiene într-un termen redus (3...5 min) (tabelul 1), este mai sensibil (tabelul 2), specific (tabelul 3) și se păstrează timp îndelungat (2 ani - termen de observație) (tabelul 4).

10

Tabelul 1

Timpul indicării toxigenității microbiene

Nr. d/r	Tulpina microbiană	Timpul indicării toxigenității microbiene						
		Imunoreactivul propus		Imunoreactivul cunoscut				
		minute		minute		ore		
		3	5	3	5	24	48	72
1.	<i>C. diphtheriae</i> Type strain ATCC 27010	+	+	-	-	±	±	+
2.	<i>C. diphtheriae</i> (Gravis toxigenic) 090653-BB	+	+	-	-	+	+	+
3.	<i>C. diphtheriae mitis</i> N 10356	+	+	-	-	-	±	+
4.	<i>C. diphtheriae mitis</i> N 3984	+	+	-	-	-	±	+
5.	<i>C. diphtheriae gravis</i> N 10648	+	+	-	-	±	+	+
6.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N090026	+	+	-	-	±	+	+
7.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N090065	+	+	-	-	±	+	+
8.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N090056	+	+	-	-	±	±	+
9.	<i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N090056	+	+	-	-	-	±	+
10.	<i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N090181	+	+	-	-	±	+	+
11.	<i>C. ulcerans</i> N 1000	+	+	-	-	-	±	+
12.	<i>C. ulcerans</i> ATCC 9015	+	+	-	-	-	±	+
13.	<i>C. aureus</i> ATCC 25923	+	+	-	-	±	±	+
14.	<i>S. aureus</i> Cowan	+	+	-	-	±	±	+
15.	<i>S. aureus</i> P-209	+	+	-	-	-	±	+
16.	<i>S. aureus</i> Dodon	+	+	-	-	-	±	+
17.	<i>S. aureus</i> Idmișev	+	+	-	-	-	±	+

Notă: “+” - reacție pozitivă;

“±” - reacție variabilă;

“-” - reacție negativă.

15

Tabelul 2

Sensibilitatea imunoreactivului pentru indicarea toxigenității microbiene

Concentrația culturii microbiene, g/ml	Timpul indicării toxigenității microbiene, în min					
	Imunoreactivul propus			Imunoreactivul cunoscut		
	3'	5'	10'	3'	5'	10'
10 ¹	-	+	+	-	-	-
10 ²	-	+	+	-	-	-
10 ³	+	+	+	-	-	-
10 ⁴	+	+	+	-	-	-
10 ⁵	+	+	+	-	-	-
10 ⁶	+	+	+	-	-	-
10 ⁷	+	+	+	-	-	-

Notă: “+” - reacția pozitivă

“-” - reacția negativă.

20

MD 2286 B2 2003.10.31

5

Tabelul 3

Specificitatea imunoreactivului pentru indicarea toxigenității microbiene

Nr. d/o	Tulpina microbiană	Numărul experimentelor efectuate	Imunoreactivul propus				Imunoreactivul cunoscut			
			toxigen		atoxigen		toxigen		atoxigen	
			abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
1.	<i>C. diphtheriae</i> Type strain: ATCC 2700	58	58	100	-	-	58	100	-	-
2.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> 090653-BB	59	59	100	-	-	59	100	-	-
3.	<i>C. diphtheriae mitis</i> N 10356	59	59	100	-	-	58	98,3	1	1,7
4.	<i>C. diphtheriae mitis</i> N 3984	59	58	98,3	1	1,7	58	98,3	1	1,7
5.	<i>C. diphtheriae gravis</i> N 10648	14	14	100	-	-	14	100	-	-
6.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N 090026	78	78	100	-	-	78	100	-	-
7.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N 090065	58	58	100	-	-	58	100	-	-
8.	<i>C. diphtheriae gravis toxigenic</i> N 090056	46	46	100	-	-	46	100	-	-
9.	<i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N 090076	46	46	100	-	-	46	100	-	-
10.	<i>C. diphtheriae mitis toxigenic</i> N 090181	78	78	100	-	-	76	97,4	2	2,6
11.	<i>C. ulcerans</i> N 1000	47	45	95,7	2	4,3	43	91,5	4	8,5
12.	<i>C. ulcerans</i> ATCC 9015	58	58	100	-	-	56	96,5	2	3,5
13.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	78	78	100	-	-	78	100	-	-
14.	<i>S. aureus</i> Cowan	43	43	100	-	-	43	100	-	-
15.	<i>S. aureus</i> P-209	53	53	100	-	-	53	100	-	-
16.	<i>S. aureus</i> Dodon	46	46	100	-	-	46	100	-	-
17.	<i>S. aureus</i> Idmișev	49	49	100	-	-	49	100	-	-
18.	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	56	-	-	56	100	-	-	56	100
19.	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	96	-	-	96	100	-	-	96	100
20.	<i>B. cereus</i> 010015	56	-	-	56	100	-	-	56	100
21.	<i>S. dysenteriae</i> Type strain: ATCC 13313	41	-	-	41	100	-	-	41	100
22.	<i>S. Flexneri</i> Type strain: ATCC 29903	75	-	-	75	100	1	1,3	74	98,7
23.	<i>S. sonnei</i> Type strain: ATCC 29930	43	-	-	43	100	-	-	43	100
24.	<i>V. cholerae</i> Mecnicov	61	-	-	61	100	-	-	61	100
25.	<i>B. pertussis</i> Type strain: ATCC 9797	71	-	-	71	100	-	-	71	100

MD 2286 B2 2003.10.31

6

Tabelul 4

Durata păstrării imunoreactivului pentru indicarea toxigenității microbiene

Durata păstrării	Imunoreactivul propus	
	<i>C. diphtheriae</i>	<i>S. aureus</i>
24 ore	+	+
48 ore	+	+
72 ore	+	+
1 lună	+	+
6 luni	+	+
1 an	+	+
1,5 ani	+	+
2 ani	+	+

5

Notă: Imunoreactivul cunoscut (fâșia îmbibată cu ser antitoxic) se prepară și se utilizează ex tempore.

(57) Revendicare:

10

Imunoreactiv pentru indicarea toxigenității microbiene, care include ser imun antitoxic fixat pe purtător, caracterizat prin aceea că suplimentar conține soluție de 0,01% de mertiolat de sodiu, iar în calitate de purtător se utilizează clamidospori de *Ustilago maydis*, având următorul raport al ingredientelor, în % de volum:

15

ser imun antitoxic	20,0...50,0
clamidospori <i>Ustilago maydis</i>	8,0...12,0
soluție de 0,01% de mertiolat de sodiu	restul.

(56) Referințe bibliografice:

1. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования, под редакцией Биргера М.О. М., Медицина, 1982, с. 239 – 241

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria