



MD 4030 B1 2010.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4030** (13) **B1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12R 1/32 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
<p>(21) Nr. depozit: a 2009 0134 (22) Data depozit: 2009.12.12</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.04.30, BOPI nr. 4/2010</p>
<p>(71) Solicitanți: POPESCU Timofei, MD; SCRIPNIC Svetlana, MD (72) Inventatori: POPESCU Timofei, MD; SCRIPNIC Svetlana, MD (73) Titulari: POPESCU Timofei, MD; SCRIPNIC Svetlana, MD</p>	

(54) **Bază pentru prepararea mediilor nutritive pentru cultivarea microorganismelor din genul *Mycobacterium* și procedeu de obținere a acesteia**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, și anume la microbiologia clinică și poate fi utilizată pentru diagnosticarea microorganismelor din genul *Mycobacterium*.

Se propune o bază pentru prepararea mediilor nutritive pentru cultivarea microorganismelor din genul *Mycobacterium*, care conține: sulfat de magneziu, citrat de sodiu, dihidrogenofosfat de potasiu, acid glutamic, hidroxid de sodiu de 20%, alaun de fier și amoniu, glicerină și apă distilată în următorul raport al componentelor, în % masă:

sulfat de magneziu	0,25...0,9
citrat de sodiu	0,25...1,5
dihidrogenofosfat de potasiu	4,5...25,0
acid glutamic	4,5...20,0
hidroxid de sodiu de 20%	1,5...3,5

2
alaun de fier și amoniu 0,01...0,1
glicerină 8,0...35,0
5 apă distilată restul.

Se propune de asemenea un procedeu de obținere a bazei sus-menționate, care include dizolvarea în apă distilată a sulfatului de magneziu, citratului de sodiu și dihidrogenofosfatului de potasiu, încălzirea soluției până la temperatura de 90°C, dizolvarea în ea a acidului glutamic și adăugarea hidroxidului de sodiu de 20%, răcirea și dizolvarea în soluția obținută a alaunului de fier și amoniu și a glicerinei, cu sterilizarea ulterioară la o presiune de 0,5 atm, timp de 15 min.

15 Revendicări: 2

MD 4030 B1 2010.04.30

Descriere:

Invenția se referă la medicină, și anume la microbiologia clinică și poate fi utilizată pentru diagnosticarea microorganismelor din genul *Mycobacterium*.

Este cunoscută o bază pentru prepararea unui mediu standard liofilizat Löwenstein-Jensen.

5 Mediul se prepară în urma aplicării unui procedeu de uscare liofilizată a unui mediu nutritiv, care conține: L-asparagină, caliu dihidrofosfat, sulfat de magneziu, citrat de magneziu, făină de cartofi, verde de malahit, apă distilată și suspensie de ou [1].

10 Dezavantajul mediului cunoscut constă în proprietățile funcționale limitate (examenul prin cultură și testarea sensibilității medicamentoase a *M. tuberculosis*), sensibilitatea redusă și timpul de creștere a micobacteriilor mai îndelungat.

Mai este cunoscut un procedeu de preparare a unui mediu nutritiv de creștere a micobacteriilor, care conține: fosfat monopotasie 15,0 g, sulfat de magneziu 0,5 g, citrat de sodiu 1,0 g, citrat de fier amoniacal 0,05 g, glicerină 20,0 g, apă distilată până la 1000,0 mL. Soluția se agită până la dizolvarea definitivă a componentelor. Se sterilizează în autoclav la regim de 0,5 atm, timp de 20 min.

15 Emulsia de ou se prepară în mod aseptice. După răcire, la o parte de soluție se adaugă două părți de emulsie de ou și se agită minuțios. La un litru de mediu se adaugă 20,0 mL sol. de 5% hidroxid de sodiu și 15,0 mL sol. de 2% verde de malahit. Mediul se repartizează câte 5,0 mL în eprubete sterile și se coagulează la 85°C, timp de 45 min. [2].

20 Dezavantajul acestui produs constă în domeniul îngust de utilizare (izolarea micobacteriilor și testarea sensibilității medicamentoase).

Este de asemenea cunoscut un mediu lichid de cultură pentru creșterea micobacteriilor, care se prepară din: citrat de fier amoniacal, sulfat de magneziu, citrat de sodiu, acid 2-aminoglutamic, glicerol, acid adenilic și apă distilată [3].

25 Dezavantajul mediului constă în proprietățile funcționale limitate doar la un mediu lichid pentru creșterea micobacteriilor.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unei baze destinate diagnosticului cultural al micobacteriilor cu proprietăți multifuncționale.

30 Baza pentru prepararea mediilor nutritive pentru cultivarea microorganismelor din genul *Mycobacterium* conține: sulfat de magneziu, citrat de sodiu, dihidrogenofosfat de potasiu, acid glutamic, hidroxid de sodiu de 20%, alaun de fier și amoniu, glicerină și apă distilată în următorul raport al componentelor, în % masă:

sulfat de magneziu	0,25...0,9
citrat de sodiu	0,25...1,5
dihidrogenofosfat de potasiu	4,5...25,0
35 acid glutamic	4,5...20,0
hidroxid de sodiu de 20%	1,5...3,5
alaun de fier și amoniu	0,01...0,1
glicerină	8,0...35,0
40 apă distilată	restul.

Rezultatul invenției constă în obținerea unei baze care poate fi utilizată la prepararea unor medii pentru diagnosticul bacteriilor tipice, atipice și biologic transformate, testarea sensibilității medicamentoase, creșterea biomasei bacteriene, perfecționarea și unificarea investigațiilor în microbiologia tuberculozei.

45 Rezultatul a fost obținut datorită selectării componentelor care asigură o fiziologie și un metabolism optim pentru celula bacteriană.

Este cunoscut un procedeu de obținere a unei baze pentru prepararea mediului Löwenstein-Jensen, care prezintă un amestec măcinat (praf) al componentelor: L-asparagină, caliu dihidrofosfat, sulfat de magneziu, citrat de magneziu, făină de cartofi, verde de malahit. Pentru prepararea mediului de cultură Löwenstein-Jensen se amestecă 37,2 g de praf în 600,0 mL de apă distilată care conține 12,0 mL de glicerină, care se fierbe până la dizolvarea definitivă a componentelor. Se sterilizează în autoclav la un regim de 1 atm, la 121°C, timp de 15 min. Se prepară în mod aseptice 1000,0 mL de emulsie de ou, care se amestecă cu 600,0 mL de bază. Se toarnă în eprubete câte 5,0 mL și se coagulează la 85°C, timp de 45 min. [4].

55 Dezavantajul acestui procedeu constă în domeniul îngust de utilizare (izolarea micobacteriilor și testarea sensibilității medicamentoase).

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu de obținere a unei baze destinat pentru prepararea unor medii utilizate în diagnosticul bacteriilor tipice, atipice și biologic transformate, testarea sensibilității medicamentoase, creșterea biomasei bacteriene, perfecționarea și unificarea investigațiilor în microbiologia tuberculozei.

60 Procedul de obținere a bazei revendicate include dizolvarea în apă distilată a sulfatului de magneziu, citratului de sodiu și dihidrogenofosfatului de potasiu, încălzirea soluției până la temperatura de 90°C, dizolvarea în ea a acidului glutamic și adăugarea hidroxidului de sodiu de

20%, răcirea și dizolvarea în soluția obținută a alaunului de fier și amoniu și a glicerinei, cu sterilizarea ulterioară la o presiune de 0,5 atm, timp de 15 min.

Rezultatul invenției constă în aceea că procedeul propus constituie o modalitate de dizolvare și stabilizare a componentelor pe un termen îndelungat.

5 Rezultatul a fost obținut datorită includerii în componența bazei a hidroxidului de sodiu, lipsa căruia conduce la sedimentarea și cristalizarea componentelor.

Ca urmare, a fost obținut un produs cu proprietăți multifuncționale, care poate fi utilizat în diagnosticul cultural a microbacteriilor.

10 Aplicarea anumitor procedee descrise permite de a obține din baza revendicată a unor culturi solide, lichide sintetice, lichide semisintetice, semilichide (speciale) care pot fi utilizate pentru diagnosticul prin cultură a microbacteriilor, identificarea micobacteriilor, testarea sensibilității medicamentoase a micobacteriilor prin metode microbiologice clasice, examenul prin cultură a *Mycobacterium tuberculosis* biologic transformate (formule L), examenul prin cultură a formelor ultramici *M. tuberculosis*, creșterea biomasei micobacteriene și realizarea altor investigații.

15 *Exemple de realizare a invenției*

Exemplul 1

Prepararea bazei

În 500 mL de apă distilată (temperatura camerei) se dizolvă 3,0 g sulfat de magneziu, 13,0 g citrat de sodiu și 80,0 g dihidrogenofosfat de potasiu. Soluția se încălzește până la temperatura de 90°C, apoi se adaugă 70,0 g acid glutamic, 100,0 mL sol. hidroxid de sodiu de 20%. După răcirea soluției până la temperatura camerei se dizolvă 0,8 g alaun de fier și amoniu și glicerină. Se adaugă apă distilată până la 1000,0 mL. Preparatul se toarnă în flacoane de 250,0 mL. Se ermetizează cu dopuri de cauciuc și căpăcele de aluminiu. Sterilizarea se efectuează în autoclav la regim de presiune 0,5 atm, timp de 15 min. Compoziția se păstrează la temperatura camerei, la întuneric și cu evitarea înghețului. Utilizând metode simple din compoziția dată se poate prepara tot spectrul de medii nutritive folosite în microbiologia tuberculozei. Actualmente nu se cunoaște un alt produs cu proprietăți multifuncționale.

Exemplul 2

30 Studiul eficacității mediului solid obținut din compoziția propusă, destinat izolării microbacteriilor din materialul diagnostic. Pentru prepararea unui litru de mediu, în 320 mL de apă distilată sterilă se adaugă 38,3 mL de compoziție, 627 mL masă de ou integru, 15 mL soluție verde de malahit de 2% și se agită. Se toarnă în eprubete sterile și se coagulează la 85°C timp de 30 min.

Calitățile mediului au fost studiate prin efectuarea investigațiilor în paralel cu mediul Löwenstein-Jensen. După 45 zile de incubare, din 250 probe pe mediul Löwenstein-Jensen s-au înregistrat 76 (30,4%) de tulpini *M. tuberculosis*, iar pe mediul preparat din compoziția propusă – 109 (43,6%) tulpini. Diferența e autentică ($P < 0,05\%$). Pe mediile experimentale creșterea microbacteriilor a fost mai rapidă cu 3...5 zile.

Exemplul 3

40 Studiul eficacității mediului solid, obținut din compoziția propusă, destinat diferențierii primare a microbacteriilor.

Mediul se prepară după metoda descrisă în exemplul 2. În calitate de test pentru diferențierea primară a fost utilizat acidul paranitrobenzoic în concentrație de 500 mg/mL de mediu.

Au fost testate 47 de tulpini de micobacterii izolate din materialul diagnostic și tulpinile de laborator *M. tuberculosis* H37RV, *M. fortuitum* și *M. phlei*. Testările au fost efectuate în paralel pe ambele medii. La a treia zi *M. fortuitum* și *M. phlei* au înregistrat o creștere în prezența acidului paranitrobenzoic și în control. O tulpină izolată din materialul diagnostic a înregistrat o creștere la a treia zi în mediile cu acid paranitrobenzoic și a fost considerată ca reprezentantă a grupei IV după clasificarea Runyon (Зыков М.П., Ильина Т.Б. Потенциально-патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов. Москва, Медицина, 1978, с. 21-22). Creșterea pe mediul experimental la a 14 zi de incubare și la 18...21 zi pe mediul de control a fost înregistrată la 46 tulpini. Lipsa creșterii în prezența acidului paranitrobenzoic a permis ca culturile să fie considerate tulpini de *M. tuberculosis*. Tulpina de laborator *M. tuberculosis* H37RV a înregistrat o creștere în control la a 10 zi în mediile din compoziția propusă și la a 14 zi în mediul de control. În mediile cu acid paranitrobenzoic creșterea nu a avut loc.

55 Astfel, a fost demonstrată posibilitatea utilizării mediului obținut din compoziția propusă la diferențierea primară a micobacteriilor cu o coincidență a rezultatelor de 100%.

Exemplul 4

Studiul eficacității mediului solid, obținut din compoziția propusă la testarea rezistenței medicamentoase a *M. tuberculosis*.

60 Mediul se prepară după metoda descrisă în exemplul 2, cu excepția că se adaugă suplimentar 10,0 mL soluție de 5% hidroxid de sodiu și preparatele antibacteriene în concentrațiile critice stabilite.

Investigațiile au fost efectuate paralel și în mediul Löwenstein-Jensen. Au fost testate 99 tulpini *M. tuberculosis* izolate de la bolnavi cu tuberculoză pulmonară și tulpina de laborator *M. tuberculosis* H37RV. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Rezultatele testării sensibilității medicamentoase a tulpinilor
M. tuberculosis pe diferite medii

Concentrațiile critice, μg/mL	Nr. de testări	Rezultat	
		Identic	Diferit
Isoniazidă, 1	100	100	0
Rimfampicină, 40	100	100	0
Etambutol, 2	100	97	0
Streptomicină, 5	100	98	2
Etionamidă, 30	100	100	0
Kanamycină, 30	100	100	0
Cicloserină, 40	100	99	1

5 Tulpina de laborator *M. tuberculosis* H37RV a fost sensibilă pe ambele medii la toate preparatele antibacteriene testate. Astfel, au fost stabilite calitățile în ceea ce privește corespunderea mediului în cazul utilizării cu scopul aprecierii sensibilității medicamentoase.

Acest studiu a demonstrat posibilitatea utilizării mediului obținut din compoziția propusă la testarea sensibilității *M. tuberculosis* cu o coincidență a rezultatelor pe mediul Löwenstein-Jensen și
10 cel experimental la nivel de 97...100 %.

Exemplul 5

Studiul eficacității mediului special (semilichid) obținut din compoziția propusă la diagnosticul micobacteriilor biologic transformate (formele L). Pentru prepararea a unui litru de mediu se dizolvă 54,0 mL compoziție propusă, 20,0 mL glicerină în 400,0 apă distilată, se corectează reacția mediului
15 la nivelul pH = 7,0. În 300,0 mL apă distilată se fierbe 3 g de agar-agar, care preventiv se inmoaie timp de 12 ore în apă distilată. Toate componentele se amestecă și volumul total al soluției se aduce la nivelul de 800,0 mL. Se sterilizează în autoclavă în regim de 0,5 atm, timp de 20 min, după răcire se adaugă 100,0 mL de ser bovin, 100,0 soluție de zaharoză 200% și 6,0 mL soluție verde de malahit de 2%. Se toarnă în eprubete sterile, se păstrează la 4°C și se utilizează timp de 30 zile.

20 Au fost cercetate 235 probe de material diagnostic recoltat de la bolnavii cu tuberculoză pulmonară. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Depistarea formelor-L ale *M. tuberculosis* și frecvența florei asociative

Mediu	Nr. de investigații	Floră asociativă		Investigații calitative	Rezultatul pozitiv	
		Abs.	%		Abs.	%
Șkolnikov în modificarea Doroșkova	235	94	40,0	141	25	17,7
Experimental	235	8	3,0	227	50	22,0

25 Analiza datelor demonstrează că mediul obținut din compoziția propusă în diagnosticul formelor-L a *M. tuberculosis* este mai eficient decât cel tradițional. A scăzut considerabil numărul cazurilor de dezvoltare a florei asociative (de la 40,0% la 3,4%), iar numărul cazurilor de depistare a formelor-L a micobacteriilor a crescut cu 4,3%.

În cazul utilizării bazei revendicate, spre deosebire de cele tradiționale (mediul Șkolnikov în
30 modificarea Doroșkova, (Дорожкова И.П. Выделение L-форм микобактерий туберкулеза из патологического материала. Методические рекомендации, Москва, 1984) nu este necesară o strictă dozare a cantității mediului de antibiotice, din care cauză dispăre necesitatea utilizării unui mediu de control, pentru excluderea fenomenului de L-transformare a acestora. În consecință scade cu 1/3 cantitatea de mediu folosit și se simplifică tehnica de testare.

35 *Exemplul 6*

Studiul proprietăților mediului lichid, obținut din compoziția propusă, pentru creșterea micobacteriilor.

La prepararea unui litru de mediu se dizolvă 54,0 mL de compoziție propusă și 20,0 mL de glicerină în 926,0 mL de apă distilată. Se stabilește reacția mediului la nivelul pH = 7,0. Sterilizarea
40 se efectuează în autoclavă la regim de 0,5 atm, timp de 20 min. Aprecierea proprietăților culturale s-a efectuat în baza cantității de masă micobacteriană uscată, care s-a acumulat pe perioada de incubație în volumul mediului. În calitate de control au fost utilizate mediile lichide Sauton și Șkolnikov (Васильев В.Н. Микобактериозы и микозы легких. София, 1971, с. 156), iar ca tulpini de referință
45 *M. tuberculosis* H37RV și *M. tuberculosis* BCG (*Bacilles Calmet, Guerin*). În 40 mL de mediu au fost adăugate câte 0,8 mL de suspensie micobacteriană dozată după standardul optic a opalescenței №10. După 21 zile de incubație s-a apreciat puritatea culturilor prin examenul microscopic al frotiurilor colorate prin metoda Ziehl-Neelsen.

MD 4030 B1 2010.04.30

6

Cantitatea de biomasă s-a calculat după mortificarea și uscarea tulpinilor la balanța analitică. Rezultate sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Cantitatea de biomasă micobacteriană (mg)

Mediul	Tulpina <i>M. tuberculosis</i>	
	H37RV	BCG
Sauton	81	75
Șkolnikov	84	80
Experimental	114	110

5

Datele obținute demonstrează posibilitatea utilizării și eficacitatea înaltă în ceea ce privește acumularea de biomasă micobacteriană în mediul lichid obținut din compoziția revendicată.

Exemplul 7

10 Studiul proprietăților mediului lichid sintetic obținut din compoziția propusă, la diagnosticul formelor ultramici (FUM) a *M. tuberculosis*.

15 Mediul se prepară după metoda descrisă în exemplul 6, cu excepția, că suplimentar se adaugă 10,0 mL ser bovin. Au fost cercetate 83 probe de material diagnostic recoltat de la bolnavii cu tuberculoză pulmonară, la care formele bacteriene a *M. tuberculosis* nu au fost depistate. Au fost examinați indicii depistării *M. tuberculosis* ultramici și reversia lor în forma bacteriană. În calitate de control au fost utilizate mediile lichide semisintetice Sauton și Șkolnikov (Дорожкова И.П. Выделение L-форм микобактерий туберкулеза из патологического материала. Методические рекомендации. Москва, 1984; Васильев В.Н. Микобактериозы и микозы легких. София, 1971, с. 156).

20 Rezultatele sunt prezentate în tabele 4 și 5.

20

Tabelul 4

Izolarea formelor ultramici ale *M. tuberculosis* pe diferite medii

Total	Mediul					
	Sauton		Șkolnikov		Experimental	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
83	20	24,1	20	24,1	25	30,1

Tabelul 5

Indicii reversiei *M. tuberculosis* în forma bacteriană

Mediul	FUM	Reversii	
		Abs.	%
Sauton	20	1	5,0
Șkolnikova	20	1	5,0
Experimental	25	3	12,0

25

Datele obținute demostrează că mediul propus poate fi folosit cu succes în diagnosticul bacteriologic al *M. tuberculosis* ultramici.

Așadar, utilizarea compoziției propuse la prepararea mediilor de cultură contribuie la perfecționarea și unificarea metodelor bacteriologice clasice în diagnosticul tuberculozei.

30

Procedeul de obținere este simplu, nu necesită utilaj special, componentele sunt accesibile, termenul de păstrare îndelungat.

(57) Revendicări:

5 1. Bază pentru prepararea mediilor nutritive pentru cultivarea microorganismelor din genul *Mycobacterium*, care conține: sulfat de magneziu, citrat de sodiu, dihidrogenofosfat de potasiu, acid glutamic, hidroxid de sodiu de 20%, alaun de fier și amoniu, glicerină și apă distilată în următorul raport al componentelor, în % masă:

	sulfat de magneziu	0,25...0,9
	citrat de sodiu	0,25...1,5
	dihidrogenofosfat de potasiu	4,5...25,0
10	acid glutamic	4,5...20,0
	hidroxid de sodiu de 20%	1,5...3,5
	alaun de fier și amoniu	0,01...0,1
	glicerină	8,0...35,0
	apă distilată	restul.

15 2. Procedeu de obținere a bazei definite în revendicarea 1, care include dizolvarea în apă distilată a sulfatului de magneziu, citratului de sodiu și dihidrogenofosfatului de potasiu, încălzirea soluției până la temperatura de 90°C, dizolvarea în ea a acidului glutamic și adăugarea hidroxidului de sodiu de 20%, răcirea și dizolvarea în soluția obținută a alaunului de fier și amoniu și a glicerinei, cu
20 sterilizarea ulterioară la o presiune de 0,5 atm, timp de 15 min.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Финкель Е.А., Погребинская Ю.Б. Сухие питательные среды для диагностики туберкулеза. Фрунзе, 1977, 128 p.
2. SU 1476901 A1
3. SU 1555358 A1 1990. 04.07
4. DIFCO MANUAL. BACTO LOWENSTEIN MEDIUM BASE.TENTH Edition, 1984, p. 531-533

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

UNGUREANU Mihail