

MEDII NUTRITIVE PENTRU IDENTIFICAREA BACTERIILOR SPECIEI HELICOBACTER PYLORI

Valentina Turanscaia, Natalia Sainsus

Catedra Microbiologie, Virusologie și Imunologie USMF „N. Testemițanu”

Summary

Nutritive medium in the identification of *Helicobacter pylori* species

This work includes to nutritive medium used in the microbiological diagnosis of the gastrointestinal diseasesa caused by bacteria of *Helicobacter pylori* species.

Rezumat

Studiul dat se referă către mediile nutritive utilizate în diagnosticul microbiologic a maladiilor gastrointestinale cauzate de bacterii speciei *Helicobacter pylori*.

Actualitatea

Actualmente în diagnosticul ulcerului gastric și duodenal cauzat de bacterii *Helicobacter pylori* se utilizează preponderent metoda microscopică și mai puțin cea bacteriologică. Această situație este argumentată științific și se bazează pe durata primirii rezultatelor finale. Dacă în primul caz datele informative pot fi obținute timp de 2 ore, apoi în al doilea – numai peste 4–7 zile, mai mult ca atât ultima metodă este foarte costisitoare și neacesibilă. Cauza nominalizată creează în laboratoare condiții nefavorabile pentru a evidenția în mod urgent și a păstra timp îndelungat tulpinile de *Helicobacter pylori*, ceea ce prezintă un obstacol în stabilirea diagnosticului bolilor gastrointestinale. Însă metoda bacteriologică ne permite studierea proprietăților nutritive și determinarea sensibilității bacteriilor genului nominalizat (*H. Pylori*) la antibiotice și chimioterapice. De aceea și este considerat, că metoda bacteriologică este mai informativă referitor la tipul de aplicare a terapiei antimicrobiene eficiente.

Primele tulpini ai bacteriilor genului *Helicobacter* au fost identificate în Australia în 1982. S-a dovedit faptul participării lor în patogenia tulburărilor recidevante a stomacului și duodenului. Genul *Helicobacter* se referă la familia Campilobacteriaceae și include *H. pylori*, *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. mustilae*. Diferențierea acestora poate fi efectuată prin utilizarea metodelor de diagnostic (bacteriologică și microscopică). Ca material de cercetare servește bioptatul mucoasei gastrice și duodenale. Diagnosticul bacteriologic e bazat pe determinarea particularităților tipice a bacteriei. Pentru cercetarea mobilității se utilizează microscopierea în fază de contrast. Se cercetează preparate histologice colorate cu hematoxilin-eozin sau prin imprignarea cu argint după metoda Wort-Stari. Rezultate veridice pot fi obținute prin microscopierea luminiscentă a frotiurilor colorate cu acridin oranj. Există metode de depistare indirectă a helicobacteriilor în bioptat recoltate: determinarea activității ureazice. Pentru obținerea culturilor pure de helicobacter se utilizează des mediu geloza sânge 5-7%, îmbogățite cu antibiotici (ca exemplu cefsulodin). La a 5-7 zi de cultivare la temperatura de 37°C se observă creștere. Apartinența culturii bacteriene către genul *Helicobacter* se verifică prin studierea proprietăților morfologice și culturale, mobilitate, proprietate de creștere în condiții microanaerofile și lipsa creșterii în condiții aerobe și anaerobe, la temperatura de 25-42°C [5].

Din toate proprietățile biochimice se atrage atenția studierii activității ureazice, oxidazei, catalazei. Actual sunt elaborate teste imunologice de determinare a antigenilor helicobacteriilor în ser prin reacție de fixare a complimentului. A fost dovedit că în cazul gastritelor acute și a acutizărilor inflamației cronice a ulcerelor gastrice și duodenale, au fost depistate pe mucoasa gastrică a antrului bacterii *Helicobacter pylori* în cantități destul de mari. De obicei, bacteriile populează în mare densitate regiunile inflamate, regiunile învecinate fiind populate neuniform. Concentrația bacteriilor într-un gram de țesut este de $10^2 - 10^5$ bacterii *H.pylori*[5].

Analizând literatura de specialitate au fost selectate următoarele medii nutritive utilizate pentru evidențierea bacteriilor genului *Helicobacter*:

1. Geloza-Campy I.C. (Institutul Cantacuzino, București). Este un preparat comercial, care include : (gr la 1000 ml): tripticar lichid 185 ml (15 gr % o), tripticar lichid 65 ml (5 gr % o), extract de drojdii 60 ml (5 gr % o), tripticord 108 ml (3 gr % o), amidon de porumb 1 gr, clorură de sodiu 5 gr, Bibigel 13,5 gr, apă distilată 1000 ml. La mediul topit și răcit la temperatura 50°C se adaugă 70-100 ml sânge defibrinat de berbec și un amestec selectiv, format din vancomicină 100 mcg/ml, trimetoprim 5 mcg/ml, cefalotină 15 mcg/ml și colistină 35 U.I./ml)[2].
2. Geloză – sânge (Zeisler). Acest mediu este compus din geloză peptonată 3%, glucoză 1-2%, pH-ul 7,2 -7,4. Compoziția obținută se fierbe în baia de apă 45 de min, se răcește până la temperatura 50⁰ C și se adaugă 15-20% sânge defibrinat. Mediul căpătat se distribuie în cutii Petri sterile, câte 15 ml, care se răcesc fiind sterilizate la lampa de cuarț [4].
3. Geloză – ciocolat. Pentru prepararea mediului la cantitatea necesară de geloză peptonată de 2%, topită și răcită până la temperatura 45⁰ C se adaugă 10% de sânge defibrinat steril de cal sau de berbec, amestecându-se în permanent mediul până ce capătă culoarea ciocolatei. Apoi mediul se distribuie în cutii Petri, prealabil încălzite și se usucă în termostat până la solidificare [4].
4. Mediul pentru conservare îndelungată a culturilor pure de Campylobacter la temperaturi joase. Este constituit din apă distilată (75,0 ml), glicerină (25,0 ml), peptonă bacteriologică uscată (1,0 gr) și clorură de sodiu (0,5 gr) la un pH 7,2-7,4. Mediul se sterilizează timp de 15 min la temperatura 121°C și presiunea de 1,1 atm. Mediul asigură viabilitatea Campylobacter la temperatura 20°C timp de 1-2 ani. Determinarea productivității mediilor de referință, cât și ale celor elaborate ulterior de a fost realizată prin metoda Gold [3].
5. Mediul algal selectiv ES. Este compus din geloză peptonată uscată 45,0g, apă distilată 1000 ml. La 100 ml de compoziție obținută se adaugă 20 ml extract de Spirulina platensis, pH-ul 7,0-7,2, se sterilizează la 0,5 atm timp de 15-20 min., apoi în mediul răcit până la temperatura 50⁰ C se adaugă colimicină 0,6, C 2 H 5 OH 2-3 pic., rifampicină 1,2 mg, cefazolină natriu 2,4 mg, nizoral 2,8 mg [3].
6. Mediul Campy – BAP. Acest mediu include extract de carne 5,0 g, peptonă de carne 10,0 g, peptonă de drojdie 10,0 g, glucoză 10,0 g, clorură de sodiu 5,0 g, geloză 15,0 g, apă distilată 1000 ml, vancomicină 10 mg/ml, trimetoprim 5,0 mg/ml, polimixin B 2,5 UI/ml, amfotericin B 2,0 mg/ml, cefalotin 15,0 mg/ml, sânge de berbec 10% [2].
7. Mediul Butzler (pentru cultivarea Campylobacteriilor). Pentru prepararea lui, la geloză de bază cu tioglicolat de sodiu se adaugă bacotraconă 25,0 UI/ml, novobiocină 5,0 mg/ml, actidin 50,0 mg/ml, colistin 10,0 mg/ml, cefazolin 15,0 mg/ml, sânge de berbec 10 % [2].
8. Bulion Blaser (pentru cultivarea Campylobacteriilor). Mediul include bulion tioglicolic cu 0,16 % agar, la care se adaugă vancomicină 10,0 mg, polimexină B 2,5 UI/ml, trimetoprim 5,0 mg/ml, amfotericin B 2,0 mg/ml, cefalotin 15,0 mg/ml [2].
9. Bulion Osterom modificat (pentru îmbogățirea mediului de cultivare a Campylobacteriilor). Include bulion tioglicolic, sânge defibrinat de cal 7%, bilă 1,5%, vancomicină 40,0 mg, polimexină 10,0 UI/ml, trimetoprim 10,0 mg/ml, cicloheximid 100 mg/ml [2].

În rezultatul cercetărilor efectuate la Catedra Microbiologie, Virusologie și Imunologie, cu utilizarea mediilor nutritive enumerate a fost elaborat un mediu de cultură nou, fiind selectiv pentru cultivarea, izolarea, acumularea și determinarea rapidă a ureazei bacteriilor H.pylori (MIR-H.p) (Brevet de invenție MD 1906 G2 2002.04.30)[1].

Mediu propus se pregătește în felul următor: într-o retortă sterilă și chimic curată se introduc hidrogenofosfat de potasiu 210 mg, dihidrogenofosfat de sodiu – 875 mg, 29,0 ml de apă purificată, în care se dizolvă bulion peptonat 20% - 3,6 ml, gelatină 10% - 3,7 ml, hidrolizat de cazeină 925 mg, ureea – 925 mg, zaharoza 75,0 mg, bromtimol bleu 3,0 mg. Retortă cu compoziția obținută se sterilizează la baie cu apă timp de 45 min, iar după răcire până la 45 0 C se adaugă mediul 199 – 35,0 ml, ciprinol 15 mg, cefazolină 75 mg și se amestecă. Astfel se obține mediu de cultură lichid, care cu pipeta dozator se distribuie câte 0,2 ml în 500 flacoane, se

usucă la temperatura +37 0 C timp de 24 ore, obținând mediul de cultură în forma peliculară fixat la fundul flaconului. Se sterilizează în raze ultraviolete timp de 60 min, apoi flacoanele se închid cu dop de cauciuc și capac metalic.

Pentru indicarea H.pylori bioptatul se introduce în flacon, la care se adaugă 2,0 ml de apă purificată, sterilă. Flaconul se închide ermetic evacuând aerul cu ajutorul unei seringi, astfel creând condiții microaerofile. Flaconul se incubează la temperatura + 42 0 C pe 1-1,5 ore. După incubare mediul din flacon își schimbă culoarea din verde-pal în albastru, ceea ce indică prezența H.pylori.

Mediile prezentate mai sus sunt utilizate de diverse laboratoare de diagnostic ale helicobacteriilor, însă ele nu pe deplin satisfac necesitățile metabolice ale speciei de bacterii H.pylori, doar numai ultimul poate fi utilizat în cultivarea, izolarea și acumularea biomasei de asemenea bacterii.

Bibliografia

1. Gheorghiu T., Sainsus Natalia. Mediu de cultură pentru indicarea bacteriilor Helicobacter pylori (Brevet de invenție MD 1906, 2002).
2. Mănescu S. Microbiologia sanitară. București. – 1989. - P.338-348.
3. Sicinski L. Infecția cu Campylobacter. Chișinău. - 1998. - P.329.
4. Лабинская А . С . Микробиология. Москва – 1978.- Стр.437.
5. Покровского В.И Медицинская микробиология. Москва. - 2002. - Стр. 390-391.