

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения
— Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

А.А.Тарасенко

« 14 » декабря 2020 г.

Регистрационный № 004-1220



МЕТОДЫ ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ

ГРИБОВ РОДА CANDIDA

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.б.н. Циркунова Ж.Ф.; к.м.н., доцент Гудкова Е.И.; к.м.н.,
доцент Скороход Г.А.; Слабко И.Н.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее – Инструкция) изложены методы внутривидового типирования возбудителей кандидозов, в первую очередь *Candida albicans*.

Методы позволяют определять источники инфекции и факторы передачи возбудителей, устанавливать или исключать связь между отдельными случаями заболеваний, обеспечивать микробиологический мониторинг кандидозов, могут быть использованы при осуществлении эпидемиологического надзора за нозокомиальными кандидозами.

Предлагаемая инструкция включает 3 метода:

- метод, основанный на оценке макроморфологических признаков грибов при их росте на средах, содержащих 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ);
- метод, основанный на оценке уровня фенотипической чувствительности к антисептическим средствам;
- метод, основанный на использовании RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР.

Предлагаемые методы типирования могут быть использованы как самостоятельно, так и в комплексе друг с другом.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Внутривидовое типирование кандид с целью определения и характеристики взаимосвязи между выделенными клиническими изолятами кандид, их эпидемиологического маркирования, подтверждения связей между источниками инфекции и факторами ее передачи.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа в испытательной лаборатории должна проводиться в соответствии с системой обеспечения качества, предусматривающей контроль питательных сред и реактивов, контроль исправности измерительных приборов и методов стерилизации и условий инкубации.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

Оборудование и лабораторная посуда:

- паровой стерилизатор (автоклав);
- дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды ГОСТ 6709-72;
- облучатель бактерицидный,
- шкаф ламинарный (бокс биологической защиты);

- холодильник с температурой в камере от +4°C до +8°C и морозильной камерой на -20 °С.
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру 35±2°C;
- рН-метр, диапазон рН от 1 до 14, точность 0,01 рН;
- весы аналитические с точностью 0,01-0,1 мг;
- вортекс-шейкер для микропробирок;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл).
- стерильные чашки Петри, диаметр 90-100 мм;
- пробирки;
- штатив для пробирок;
- мерный цилиндр объемом 50 мл;
- микробиологические петли;
- горелка
- планшеты полимерные, 96-луночные стерильные однократного применения;
- денситометр DEN – 1В;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой.
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- программируемый термоциклер (амплификатор);
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8–12 тыс. об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5–3000 об/мин (или вортекс);
- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-трансиллюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- планшет для заливки геля, гребенки, держатели гребенок;
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;
- штативы для ПЦР-пробирок 0,2 мл;
- ПЦР-пробирки 0,5 мл, тонкостенные;
- 0,5 мл пробирки для хранения аликвот жидких реагентов;
- одноразовые наконечники до 10, 200 и до 1000 мкл;
- штативы для наконечников 10, 200 и 1000 мкл;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- одноразовые перчатки.

Питательные среды, реактивы и расходные материалы:

- декстрозный агар Сабуро;
- стерильный 0,85% раствор хлорида натрия;
- этиловый спирт;
- 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ);
- хлорамфеникол;
- Таq DNA полимераза;

- 10X Taq буфер;
- 25mM MgCl₂;
- 2mM dNTP;
- 10X TAE буфер.
- вода для молекулярно-биологических исследований, свободная от ДНКаз и РНКаз;
- маркеры длины ДНК для электрофореза;
- буфер для ПЦР;
- загрузочный буфер;
- агароза для электрофореза;
- раствор бромистого этидия;
- набор для выделения ДНК из грибов;
- праймеры:
 - 1) P1254-5-CCGCAGCCAA-3,
 - 2) CA2-5-GCGATCCCCA-3;
 - 3) OPB-17-5-AGGGAACGAG-3;
 - 4) ERIC-1- ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCAC
- антисептики:
 - 1) Перекись водорода (3%);
 - 2) Хлоргексидина биглюконат (0,5 мг/мл);
 - 3) Комбинированные антисептики, содержащие ПГМГ (полигексаметилен-бигуанидин), например, «Мукосанин», «Септаль» или аналоги.

1. МЕТОД ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ *CANDIDA* SPP., ОСНОВАННЫЙ НА ОЦЕНКЕ МАКРОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ГРИБОВ ПРИ ИХ РОСТЕ НА СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ТТХ

(морфотипирование)

Метод основан на оценке внутривидовых различий грибов при росте на питательных средах с ТТХ.

Дифференцирующими критериями служат: наличие или отсутствие окраски колонии, интенсивность окраски, наличие или отсутствие белой полосы по краю колонии, а также форма колонии, ее профиль, поверхность и др.

ЭТАПЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

1.1 Приготовление питательных сред

Качество питательных сред является одним из важнейших факторов, влияющих на достоверность результата анализа. Поэтому контроль качества питательных сред должен осуществляться на всех этапах технологического процесса, начиная от момента закупки среды до непосредственного использования в анализе. Требования к контролю качества питательных изложены в инструкции «Хранение, приготовление и контроль качества питательных сред». Инструкция по применению рег. № 079-0210, утв. Постановление Минздрава РБ от 19.03.2010.

1.1.1 Декстрозный агар Сабуро

Состав: декстроза – 40,0 г/л.; пептоны – 5,0 г/л., панкреатический гидролизат казеина – 5,0 г/л, агар-агар – 15,0 г/л.

Для предотвращения бактериальной контаминации в питательную среду следует добавить хлорамфеникол в концентрации 0,05 г/л.

Подготовка: растворяют компоненты или готовую сухую смесь питательной среды в воде, помешивая во время нагревания. Разливают раствор в подходящую посуду.

Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин.

После стерилизации уровень рН должен составить (5,6±0,2) при измерении его при комнатной температуре.

1.1.2 Декстрозный агар Сабуро с ТТХ

После приготовления и автоклавирования питательной среды, ее охлаждают до 55-60°C и добавляют 0,2 мл 1% водного раствора ТТХ в 20 мл питательной среды (конечная концентрация ТТХ в питательной среде 0,01 %).

Смесь выливают в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм, тщательно перемешивают круговыми движениями не допуская образование пузырьков.

Чашки, установленные на строго горизонтальной поверхности, оставляют при комнатной температуре для застывания.

Приготовленные чашки Петри используют немедленно или хранят в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4-8°C не более 7 сут.

При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсушить перед инокуляцией, что достигается выдерживанием при 37°C с приоткрытой крышкой в течение 10-20 мин.

1.2 Подготовка суспензий *Candida spp.*

Для проведения исследований используют чистую культуру дрожжей, выращенную в течение 24 часов на чашках Петри с агаром Сабуро при температуре 32±2,5°C.

Инокулом готовят путем суспензирования 5 отдельных колоний 24-часовой культуры (диаметром более 1 мм) в 3 мл 0,85% стерильного раствора NaCl. Тщательно размешивают интенсивным встряхиванием на вортексе 15 с. Доводят плотность суспензии до 1x10⁶ – 5x10⁶ КОЕ/мл добавлением 0,85% стерильного раствора NaCl (соответствует стандарту мутности 0,5 McFarland).

1.3 Подготовка шаблона для посева исследуемых культур

Для облегчения посева дрожжей на поверхность агара, их обозначения и последующего учета результатов рекомендуется использовать шаблон (трафарет), который представляет собой лист плотной бумаги, с обозначением мест посева культур и их номера (рисунок 1). Количество и расположение культур на шаблоне может быть произвольным.

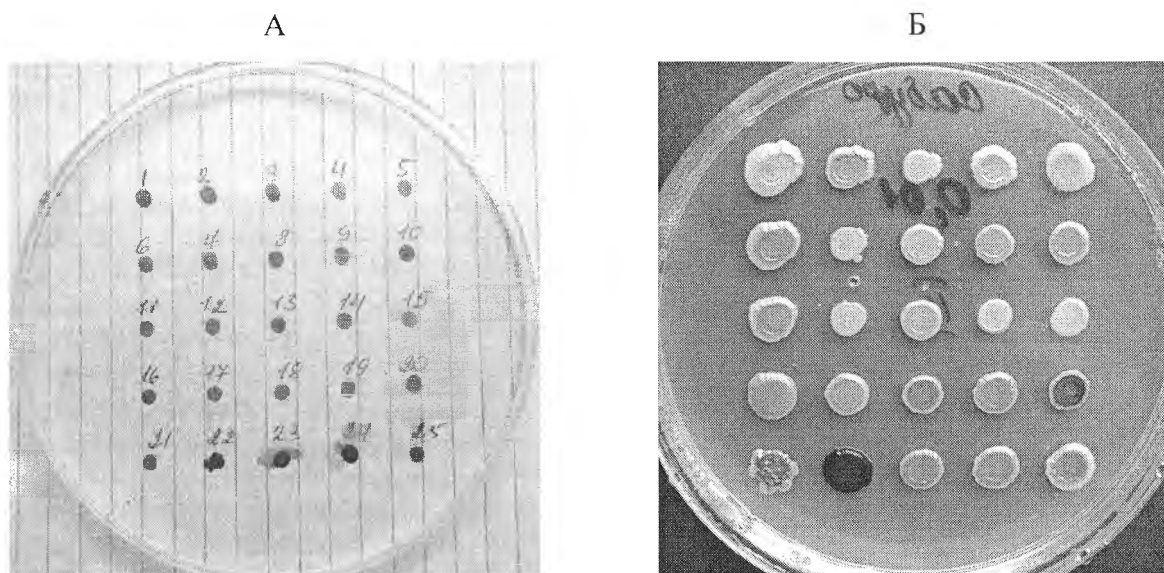


Рисунок 1 – Образец шаблона для посева и учета характера роста грибов (А) и результаты опыта, полученные при использовании шаблона (Б)

1.4 Проведение исследования

Не позднее чем через 15 мин после приготовления инокулюма на поверхность подсушенной в термостате питательной среды, наносят капли инокулюма исследуемых дрожжей в количестве 20 мкл на фоне шаблона.

После высыхания микробной взвеси на поверхности агара, чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре $32 \pm 2,5^\circ\text{C}$ в течение 7 сут.

После 7 сут культивирования проводят анализ макроморфологии выросших колоний. Для этого чашку ставят вниз дном на шаблон и учитывают морфологические характеристики грибов согласно таблице 1.

1.5 Запись вариантов грибов

Для каждого протестированного изолята записывается формула его морфоварианта (пример приведен в таблице 2). Выявленным макроморфологическим вариантам присваиваются порядковые номера, к которым добавляется маленькая английская буква «m».

1.6 Возможные осложнения и ошибки при использовании метода

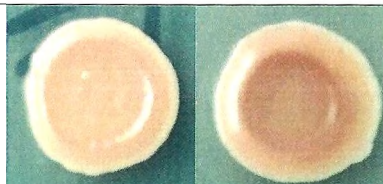
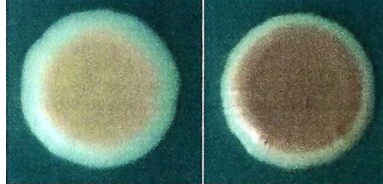



Культуральные методы типирования основаны на использовании пластичных метаболических процессов микробов, которые могут меняться в зависимости от условий постановки эксперимента, поэтому вероятность получения достоверных и сопоставимых результатов во многом определяется точным следованиям предложенным рекомендациям.

Полученная суспензия грибов должна строго соответствовать плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланд. Использование суспензии более высокой или низкой плотности может приводить к изменению результатов.

Таблица 1 – Макроморфологические (культуральные) признаки колоний грибов рода *Candida* и способ их кодирования

№ пп	Признак	Свойство	Обозначение	Код
I	Цвет	Белый	Б	I-Б
		Светло-розовый	свР	I-свР
		Розовый	Р	I-Р
		Темно-розовый	тР	I-тР
		Кремовый	Кр	I-Кр
		Светло-фиолетовый	свФ	I-свФ
		Фиолетовый	Ф	I-Ф
		Темно-фиолетовый	тФ	I-тФ
II	Поверхность	Гладкая	Гл	II-Гл
		Шероховатая	Ш	II-Ш
		Складчатая	Ск	II-Ск
		Морщинистая	М	II-М
		С концентрическими кругами	кКр	II-кКр
		Радиально исчерченная	РИ	II-РИ
III	Профиль	Плоский	Пл	III-Пл
		Выпуклый	В	III-В
		Конусовидный	К	III-К
		Кратерообразный	Крат	III-Крат
		Валикообразное утолщение по краю	ВУт	III-ВУт
IV	Форма	Круглая	Кр	IV-Кр
		Круглая с фестончатым краем	КрФ	IV-КрФ
		Ризоидные	Р	IV-Р
		С ризоидным краем	РКр	IV-РКр
		Амебовидная	Ам	IV-Ам
		Неправильная	Н	IV-Н
V	Край	Ровный	Р	V-Р
		Волнистый	В	V-В
		Зубчатый	З	V-З
		Бахромчатый	Б	V-Б
VI	Белый край	Узкий	Уз	VI-Уз
		Широкий	Ш	VI-Ш
		Отсутствует	От	VI-От

Таблица 2 – Пример оценивания макроморфологические варианты *C. albicans*

Морфоварианты			
формула	номер	описание	фото
1	2	3	4
I-Р-Кр / II-Гл / III-ВУт/ IV-Кр / V-Р / VI-От	1/m	Колонии розово-кремовые, гладкие, с валикообразным утолщением по краю, круглые, край ровный, белая полоса по краю колонии отсутствует	
I-свР-Кр / II-Гл / III-Пл / IV-Кр / V-Р / VI-Ш	2/m	Колонии светло-розово-кремовые, гладкие, плоские, круглые, край ровный, по краю колонии имеется широкая белая полоса	
I-тР / II-Гл / III-Пл / IV-Кр / V-Р / VI-Ш	3/m	Колонии темно-розовые, гладкие, плоские, круглые, край ровный, по краю колонии имеется белая широкая полоса	
I-свР-Кр / II-М / III-Крат/ IV-КрФ / V-В / VI-От	4/m	Колонии светло-розово-кремовые, морщинистые, кратерообразные, круглые с фестончатым краем, край волнистый, белая полоса по краю колонии отсутствует	
I-тР / II-Гл / III-Крат / IV-Кр / V-Р / VI-От	5/m	Колонии темно-розовые, гладкие, кратерообразные, круглые, край ровный, белая полоса по краю колонии отсутствует	

2. МЕТОД ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ *CANDIDA* SPP., ОСНОВАННЫЙ НА ОЦЕНКЕ ПРОФИЛЯ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ/УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИСЕПТИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ (резистентотипирование)

Метод основан на оценке уровней фенотипической чувствительности *Candida* spp. к антисептическим средствам (далее антисептикам).

Дифференцирующим критерием служат значения максимальных ингибирующих разведений (МИР).

МИР – соответствует максимальному разведению антисептика от его рабочей концентрации при котором отмечается ингибирование роста исследуемой культуры. Для определения МИР заданные концентрации антисептиков вносят в агаризованную питательную среду, которую засевают исследуемыми грибами и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

В качестве дифференцирующих антисептических средств рекомендуется использовать стандартные аптечные формы антисептиков – «Хлоргексидина биглюконат», «Перекись водорода», комбинированные антисептики, содержащие ПГМГ (полигексаметиленбигуанидин), например, «Мукосанин», «Септаль» или аналоги.

ЭТАПЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

2.1 Приготовление питательных сред

2.1.1 Декстрозный агар Сабуро

Аналогично п. 1.1.1

2.1.2 Декстрозный агар Сабуро с антисептиками

Для того чтобы избежать снижения концентрации веществ в питательной среде после добавления к ней раствора антисептика, следует готовить питательную среду более концентрированной (навеску, рекомендованную производителем, умножают на коэффициент 1,25 и разводят в рекомендованном объеме воды).

Пример1: Если в инструкции изготовителя написано, что 72,0 г среды размешивают в 1 л воды, то следует взвесить 90,0 г (72,0x1,25) и добавить 1 литр воды.

Далее среда автоклавируется и охлаждается до 45-50°C.

После этого в мерный цилиндр добавляют 5 мл раствора антисептика и доводят до 20 мл охлажденной до 45-50 °С питательной средой, тщательно перемешивают во флаконе и выливают в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм (установленные на строго горизонтальной поверхности). Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания.

При использовании чашек с диаметром 100 мм берут 6,25 мл раствора антисептика и доводят до 25 мл питательной средой.

Приготовленные чашки Петри используют немедленно или хранят в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4-8°C не более 7 сут.

При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсушить перед инокуляцией, что достигается выдерживанием при 37°C с приоткрытой крышкой в течение 10-20 мин.

2.2 Приготовление растворов антисептиков

Для определения уровня фенотипической чувствительности кандид готовят питательные среды, содержащие антисептики в конечных концентрациях 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 и т.д от их рабочих. Для этих целей предварительно делают последовательные двукратные разведения антисептиков в стерильной дистиллированной воде, которые добавляют к расплавленной агаризованной питательной среде разводя антисептическое средство еще в 4 раза.

Пример 2: при добавлении к 15 мл расплавленной питательной среды 4 мл антисептического средства, разведенного в 2 раза конечная концентрация антисептика будет равна 1/8.

Концентрацию 1/4 получают при добавлении к питательной среде рабочего раствора антисептика без предварительного разведения.

2.3 Подготовка суспензий *Candida spp.*

Аналогично п. 1.2

2.4 Подготовка шаблона для посева исследуемых культур

Аналогично п. 1.3

2.5 Проведение исследования

Не позднее чем через 15 мин после приготовления инокулюма на поверхность подсушенной в термостате питательной среды, содержащей раствор антисептика, наносят капли инокулюма исследуемых дрожжей в количестве 10-20 мкл на фоне шаблона (рис.1). После высыхания микробной взвеси чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре $32 \pm 2,5^\circ\text{C}$ в течение 48 ч.

Проводят учет выросших колоний. Для этого чашку ставят вниз дном на шаблон и отмечают номера выросших колоний.

2.5.1 Контроль

Параллельно с проведением опыта ставят контроль роста культур на среде без антисептика.

2.6 Учет результатов и их интерпретация

Учет результатов проводят по наличию или отсутствию роста дрожжей в сопоставлении с контрольным посевом. Определяют максимальное ингибирующее разведение, подавляющее видимый рост исследуемого микроорганизма (МИР).

Полученные данные заносят в таблицу.

Пример типирования *C. albicans* по уровню чувствительности к «Хлоргексидина биглюконат» приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Пример внутривидового типирование клинических изолятов *C.albicans* по чувствительности к антисептику «Хлоргексидина биглюконат»

№ пп	Клинический изолят, №	МИР				
		<1/4	1/4	1/8	1/16	1/32
1	1	+			+	
2	2		+			
3	3		+			
4	4			+		
5	5			+		
6	6				+	
7	7	+				
8	8			+		
9	9				+	
10	10					+

Количество антисептиков, используемых для внутривидового типирования кандид не должно быть менее 3.

2.7 *Запись вариантов грибов, с учетом профиля чувствительности к антисептикам:*

Выявленные варианты грибов могут быть записаны следующим образом:

ХБ: 1/4; С: 1/8; М: 1/8; ПВ: –, где

ХБ – хлоргексидана биглюконат; С – септаль; М – мукосанин; ПВ – перекись водорода; 1/4, 1/8, 1/32 – МИР.

Если для микроорганизма не проводилось определение чувствительности к антисептику, в соответствующей этому средству позиции в формуле ставится прочерк.

Выявленным вариантам кандид присваиваются порядковые номера, к которым добавляется маленькая английская буква «г».

Пример оценивания уровней фенотипической чувствительности *C.albicans* к антисептическим средствам приведен в таблице 4.

2.8 *Возможные осложнения и ошибки при использовании метода*

Полученная суспензия грибов должна строго соответствовать плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланд. Использование суспензии более высокой или низкой плотности может приводить к изменению результатов.

3. МЕТОД ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ CANDIDA SPP. ОСНОВАННЫЙ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ REP- И RAPD-ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (генотипирование)

Таблица 4 – Пример внутривидового типирования *C.albicans* путем оценивания уровней фенотипической чувствительности к антисептическим средствам

Клини- ческий изолят, №	Антисептики / МИР				Резистеновариант	
	ХБ	С	М	ПВ	формула	номер
1	1/16	1/8	1/4	1/32	ХБ:1/16; С:1/8; М:1/4; ПВ:1/32	1/r
2	1/32	1/64	1/16	1/128	ХБ:1/32; С:1/64; М:1/16; ПВ:1/128	2/r
3	1/4	1/32	1/16	1/64	ХБ:1/4; С:1/32; М:1/16; ПВ:1/64	3/r
4	1/4	1/32	1/8	1/32	ХБ:1/4; С:1/32; М:1/8; ПВ:1/32	4/r
5	1/16	1/8	1/4	1/32	ХБ:1/16; С:1/8; М:1/4; ПВ:1/32	1/r
6	1/16	1/8	1/4	1/32	ХБ:1/16; С:1/8; М:1/4; ПВ:1/32	1/r
7	1/32	1/64	1/16	1/128	ХБ:1/32; С:1/64; М:1/16; ПВ:1/128	2/r
8	1/4	1/32	1/16	1/64	ХБ:1/4; С:1/32; М:1/16; ПВ:1/64	3/r
9	1/4	1/32	1/16	1/64	ХБ:1/4; С:1/32; М:1/16; ПВ:1/64	3/r
10	1/4	1/32	1/16	1/64	ХБ:1/4; С:1/32; М:1/16; ПВ:1/64	3/r

ЭТАПЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

3.1 Требования, предъявляемые при проведении ПЦР, выделении ДНК и детекции продуктов амплификации

Выделение ДНК, постановка ПЦР, проведение ПЦР и детекция продуктов амплификации осуществляются в отдельных помещениях согласно основным принципам организации ПЦР-лабораторий и проведения молекулярно-биологического метода диагностики изложенным в инструкции по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.11.2008 г. №090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

В ходе реакции амплификации следует избегать контаминации проб чужеродной ДНК и защищать исследуемую ДНК от контаминации окружающего рабочего пространства.

Вся работа должна проводиться в специальных помещениях с ламинарными боксами. Рабочее пространство должно быть обработано УФ-облучателями с интенсивностью не менее 10 лк/м³/мин в течение не менее 20 мин.

Все используемые растворы должны храниться в замороженном виде в аликвотах.

С гелем агарозы следует работать в перчатках, так как бромистый этидий, содержащийся в геле, является сильным мутагеном.

Визуальную детекцию геля на трансиллюминаторе следует проводить только с защитным экраном либо в очках, не пропускающих УФ-излучение.

3.2 Выделение ДНК из кандид

Выделение ДНК проводят с использованием коммерческих наборов согласно инструкции по их применению.

Для выделения ДНК используют суточные культуры тестируемых грибов, выращенные на агаре Сабуро при 35±2°C.

Полученные пробы ДНК хранят при температуре от +2 до +8°C не более 1 недели, или при температуре – 20°C не более 6 мес. в аликвотах, избегая многократного размораживания.

3.3 Постановка и проведение ПЦР (амплификации)

3.3.1 Подготовка амплификационной смеси.

При приготовлении рабочей амплификационной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольными барьерами (фильтрами), в т.ч. для внесения в пробирку препарата ДНК.

Рабочие смеси следует готовить непосредственно перед амплификацией. После внесения образца пробирки сразу помещают в амплификатор.

За 20–30 мин до приготовления реакционной ПЦР-смеси следует извлечь все реагенты (кроме Таq ДНК-полимеразы) и исследуемые образцы ДНК из морозильника, разморозить их содержимое на льду и встряхнуть на вортексе в течение 5 с.

Приготовить и пронумеровать ПЦР-пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль (желательно на льду).

В отдельной пробирке вместимостью 1,5 мл приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на общее количество анализируемых проб +1 проба согласно таблице 4:

Таблица 4 – Реагенты для одной реакции ПЦР

Реагент	Объем на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
10 x реакционный Taq буфер	5	1x
Праймер	20-26 pM /реакцию	
Раствор dNTP (25 mM каждый: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	7	3,5 mM
MgCl ₂ (25 mM)	5	2,5 mM
Присадка CES (x50)	5	10
Taq полимеразы (5 ед/мкл)	0,6	0,06 ед
Вода	Довести объем реакционной смеси до 50 мкл	

После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

3.3.2 Праймеры и режим амплификации

Для типирования кандид используют праймеры;

- 1) P1254-5-CCGCAGCCAA-3,
- 2) CA2-5-GCGATCCCA-3;
- 3) OPB-17-5-AGGGAACGAG-3;
- 4) ERIC-1- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC

Амплификацию проводят в следующем режиме: 94°C – 6 мин, 40 циклов (94 °C – 1 мин, 42°C – 2 мин, 72°C – 3 мин), 72°C – 6 мин, 4°C – ∞.

3.3.2 Методика постановки ПЦР

Добавить по 40 мкл рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации.

Внести отдельными наконечниками по 10 мкл исследуемой ДНК во все пробирки согласно нумерации. Тщательно перемешать.

В качестве отрицательного контрольного образца внести дистиллированную воду в объеме 10 мкл.

На поверхность реакционных смесей в пробирках наложить по 2 капли минерального масла (если это необходимо).

Перенести все ПЦР-пробирки в программируемый термостат (амплификатор), задать режим и провести амплификацию.

После окончания полимеразной цепной реакции все ПЦР-пробирки извлечь из амплификатора. Штатив с пробирками поместить в холодильник до проведения электрофореза.

3.4 Разделение продуктов реакций амплификации методом горизонтального гель-электрофореза

Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 10xТАЕ в 10 раз (рН=8,3): 70 мл 10xТАЕ добавить к 630 мл дистиллированной воды.

Для приготовления 2,5% геля к 2,5 г агарозы добавить 2 мл 10x ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.

Приготовленную агарозную смесь расплавить в СВЧ-печи до однородности.

Добавить к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать до однородной окраски, избегая аэрации раствора.

Охладить расплавленную агарозу до температуры 50–60 °С и залить в кювету для заливки геля.

Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов нужно предварительно перед заливкой агарозы установить в кювету гребенку (ее зубцы не должны доставать до дна приметно 1 мм), при этом толщина гребенки и толщина геля должны обеспечить объем карманов не менее 20–25 мкл. После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести кювету с гелем в камеру для проведения электрофореза.

Подготовить к электрофорезу образцы ПЦР-амплифицированной ДНК, для чего смешать их с загрузочным буфером в соотношении 5 к 1.

Нанести в карманы геля по 15–20 мкл амплифицированной.

Для контроля длин полученных фрагментов использовать коммерческие маркеры длин ДНК при каждом электрофорезе наряду с образцами.

Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания.

Установить параметры электрофореза – 140 В, 70мА, 2,5 часа.

Провести электрофоретическое разделение продуктов в направлении от катода (-) к аноду (+).

3.5 Визуализация результатов электрофореза

Контроль электрофоретического разделения осуществляется визуально по движению полос красителей.

Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ- трансиллюминатора.

Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа.

Фрагменты амплифицированной ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ.

Длины фрагментов оцениваются относительно набора определенных фрагментов ДНК известной длины.

3.6 Учет результатов и их интерпретация

Примеры оценивания геномовариантов приведены на рисунке 2.

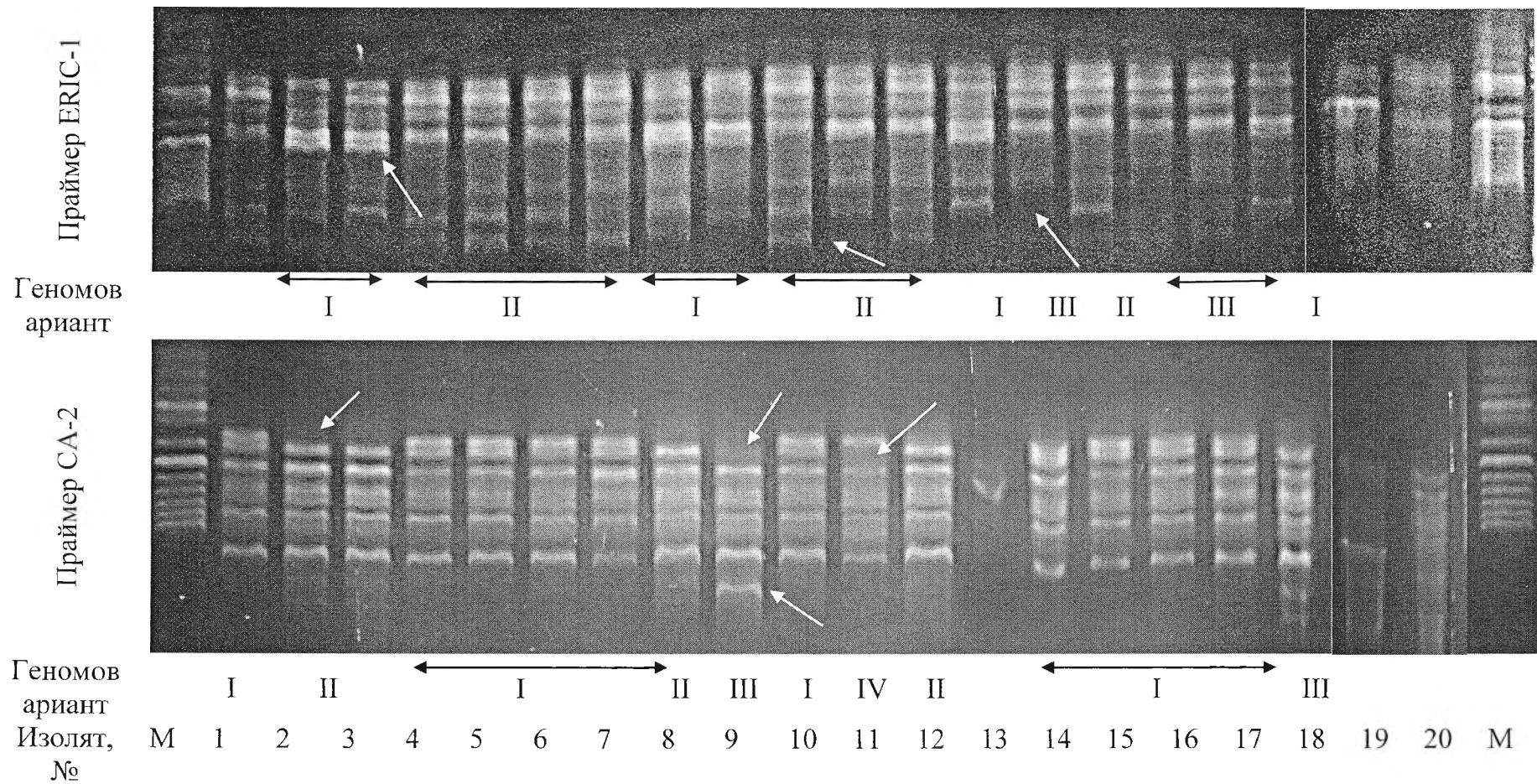


Рисунок 2 – Электрофореграммы продуктов амплификации и пример оценивания геномовариантов: М – маркер длины ДНК 50 бр. Различия в паттернах фрагментов отмечены стрелками

3.6 Запись вариантов грибов

Для каждого протестированного изолята кандидат записывается формула его геноварианта и присваивается порядковый номер, к которому добавляется маленькая английская буква «g».

Варианты грибов могут быть записаны следующим образом:

P1254:I / CA2:IV / OPB-17: II / ERIC 1: II где

P1254, CA2, OPB-17, ERIC 1 – праймеры использованные в RAPD-ПЦР; I, IV, II – номер геноварианта.

Пример внутривидового типирования *C. albicans* приведен в таблице 5.

3.7 Возможные ошибки при выполнении метода и способы их устранения

3.8.1 Контаминация чужеродной ДНК исследуемых образцов, что влечет за собой появление ложноположительных результатов.

Это можно исключить, соблюдая требования, предъявляемые при проведении ПЦР, выделении ДНК из биопроб и детекции продуктов амплификации.

3.8.2 Отсутствие продуктов реакции амплификации — не визуализируются на электрофореze продукты ПЦР по следующим причинам: либо ДНК не выделена из изолята грибов, либо не внесен образец выделенной ДНК в реакцию амплификации.

Необходимо проверить точность выполнения манипуляций, которые должны соответствовать инструкции.

3.8.3 Не визуализируются продукты реакций и ДНК-маркер на электрофореze (нет светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ).

Не внесен этидиум бромида в агарозный гель при подготовке.

КОМБИНИРОВАННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ *CANDIDA SPP.* ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГРИБОВ

Для увеличения разрешающей способности типирования следует проводить комплексную оценку фенотипических и молекулярно-генетических характеристик грибов (пример комплексной оценки приведен в таблице 6).

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КАНДИД ОДНОГО ВИДА К РАЗЛИЧНЫМ ВАРИАНТАМ

Кандиды, относящиеся к одному виду, принадлежат к различным вариантам в случае:

- 1) Установлены различия в макроморфологических характеристиках грибов при их росте на средах, содержащих ТТХ.
- 2) Установлены различия уровней фенотипической чувствительности кандид к антисептическим средствам.
- 3) Установлены различия в профилях фрагментов, образуемых в процессе амплификации нуклеотидных последовательностей, дисперсно рассеянных по геному.

Таблица 5 – Пример внутривидового типирования *C.albicans* методом, основанным на использовании RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР

Клини- ческий изолят, №	Праймеры /номер геномоварианта				Геномовариант	
	P 1254	OPB 17	ERIC 1	CA 2	формула	номер
1	-	I	-	I	P 1254:- / OPB 17: I / ERIC 1: - / CA 2: I	-
2	I	I	I	II	P 1254: I / OPB 17: I / ERIC 1: I / CA 2: II	1/g
3	I	II	I	II	P 1254: I / OPB 17: I / ERIC 1: I / CA 2: II	2/g
4	II	I	II	I	P 1254: II / OPB 17: I / ERIC 1: II / CA 2: I	3/g
5	II	I	II	I	P 1254: II / OPB 17: I / ERIC 1: II / CA 2: I	3/g
6	II	I	II	I	P 1254: II / OPB 17: I / ERIC 1: II / CA 2: I	3/g
7	II	I	II	I	P 1254: II / OPB 17: I / ERIC 1: II / CA 2: I	3/g
8	I	I	I	II	P 1254: I / OPB 17: I / ERIC 1: I / CA 2: II	1/g
9	II	I	I	III	P 1254: II / OPB 17: I / ERIC 1: I / CA 2: III	4/g
10	II	I	II	I	P 1254: II / OPB 17: I / ERIC 1: II / CA 2: I	3/g

Таблица 6 – Пример комплексного внутривидового типирования *C. albicans*

Клинический изолят	Морфовариант	Резистеновариант	Геномовариант	Вариант (комплексная оценка)
1	2/m	1/r	-	1/ m+r+g
2	2/m	2/r	1/g	2/ m+r+g
3	2/m	3/r	2/g	3/ m+r+g
4	3/m	4/r	3/g	4/ m+r+g
5	1/m	1/r	3/g	5/ m+r+g
6	1/m	1/r	3/g	5/ m+r+g
7	1/m	2/r	3/g	6/ m+r+g
8	3/m	3/r	1/g	7/ m+r+g
9	3/m	3/r	4/g	8/ m+r+g
10	1/m	3/r	3/g	9/ m+r+g
Общее количество выявленных вариантов	3	4	4	9