

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

Н.П.Жукова

«*10*» *сентября* 2019 г.

Регистрационный № 008-1119



МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ И МИЦЕАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ–РАЗРАБОТЧИКИ: государственное научное учреждение
«Институт биоорганической химии НАН Беларуси», государственное
учреждение «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д.х.н., профессор, чл.-корр. НАН Беларуси Усанов С.А., к.х.н.
Гилеп А.А., к.б.н. Белевцев М.В., Шкель Т.В., Секацкая Т.В.,
Кульбицкая Т.Т., Кондаурова С.Л., Райко Т.В., Скоповец Е.Я.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
20.12.2019
Регистрационный № 008-1119

**МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ И МИЦЕЛИАЛЬНЫХ
ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГНУ «Институт биоорганической химии
НАН Беларуси», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской
онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д-р хим. наук, чл.-корр. С. А. Усанов, канд. хим. наук А. А. Гилеп,
канд. биол. наук М. В. Белевцев, Т. В. Шкель, Т. Е. Секацкая, Т. Т. Кульбицкая,
С. Л. Кондаурова, Т. В. Райко, Е. Я. Скопонец

Минск 2019

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью быстрого и эффективного определения видовой принадлежности дрожжевых и мицелиальных грибковых патогенов на основе данных микробиологических, молекулярно-биологических и масс-спектрометрических исследований, а также анализа нуклеотидных последовательностей гена *CYP51*. Разработанная инструкция и данные молекулярного анализа гена *CYP51* позволят прогнозировать развитие резистентности штаммов дрожжевых и мицелиальных патогенных микромицетов к определенным антимикотикам азолового ряда и осуществлять соответствующий отбор эффективных лекарственных средств.

Настоящая инструкция предназначена для сотрудников микробиологических лабораторий, а также специалистов профильных научно-исследовательских учреждений, занимающихся вопросами лабораторной диагностики инфекционных заболеваний человека, вызванных дрожжевыми и мицелиальными патогенными грибами.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инвазивные дрожжевые и мицелиальные микозы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

При работе с химическими веществами необходимо соблюдать обычные меры предосторожности:

- избегать контакта с глазами и кожей;
- избегать вдыхания пыли, газа, паров, аэрозолей;
- пользоваться защитными перчатками, одеждой, средствами защиты глаз и лица;
- после работы тщательно очищать кожу;
- обеспечить достаточную вентиляцию помещения с местной вытяжной вентиляцией на рабочем месте. Работу с трифторуксусной кислотой (ТФУ) выполнять в вытяжном шкафу, т. к. кислота крайне летучая и обладает резким неприятным запахом.

При работе с биоматериалом необходимо соблюдать правила работы и поведения в бактериологической лаборатории:

1. В помещении лаборатории нельзя входить без специальной одежды (халат, шапочка, сменная обувь).
2. Запрещается в помещении прием и хранение пищи, курение.
3. Нельзя использовать лабораторную спецодежду за пределами лаборатории.
4. Зараженный материал подлежит уничтожению, инструменты и поверхность рабочего стола — дезинфекции после окончания работ.
5. После работы с культурой и животными перед уходом из лаборатории, необходимо вымыть руки.

6. Штаммы микроорганизмов, заразный материал должны храниться в закрытом и опечатанном сейфе или холодильнике.

7. В случае если разбился сосуд с инфицированным материалом или произошел неосторожный разлив заразного материала необходимо обеззаразить предметы, одежду, стол и комнату.

8. В лаборатории должна быть инструкция по технике безопасности, которую персонал обязан знать и строго выполнять. Необходимо немедленно сообщить руководителю лаборатории обо всех аварийных ситуациях, создающих угрозу биологической безопасности и осуществлять все мероприятия для предотвращения последствий.

9. Каждая бактериологическая лаборатория должна иметь лицензию на право работы с возбудителями.

1 МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Перечень необходимого оборудования, медицинских изделий и реактивов представлен в таблицах 1–8.

Таблица 1. — Оборудование для выделения патогенных дрожжевых грибов из клинического материала, их идентификации и определения антимикотикорезистентности

Наименование оборудования	Количество
Весы электронные или механические с точностью $\pm 0,1$ г	1
pH-метр с диапазоном от 1 до 14 и точностью $\pm 0,01$ pH	1
Шкаф сушильно-стерилизационный с диапазоном 160 ± 5 °C	1
Термостаты суховоздушные с диапазоном от 25 ± 2 до 45 ± 2 °C	2
Стерилизатор паровой	1
Дистилятор	1
Облучатель бактерицидный	2
Холодильник с температурой в камере от 4 до 6 °C	1
Морозильная камера с температурой в камере до -70 °C	1
Универсальная роторная центрифуга для пробирок до 2 мл	1
Микроскоп биологический	1
Микроскоп стереоскопический	1
Шкаф ламинарный	1
Электроплитка бытовая	1
Вортекс	1
Анализатор полуавтоматический типа mini API	1
Анализатор автоматический типа Vitek 2 Compact	1
Гемакультиватор микробиологический типа VacT/Alert	1
Гемакультиватор микробиологический типа Vactek	1
Комплект полуавтоматических дозаторов (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)	1

Продолжение таблицы 1.

Одноразовые медицинские перчатки без талька	
Бактериологические чашки Петри и петли	
Пластмассовые емкости для биоматериала	
Одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема	

Таблица 2. — Среды, реактивы и реагенты для выделения патогенных дрожжевых грибов из клинического материала, их идентификации и определения антимикотикорезистентности

Наименование оборудования	Назначение
Среда Sabouraud Dextrose Agar	Среда для выделения дрожжей
Среда Sabouraud Dextrose Broth	Среда для накопления дрожжей
Дистиллированная вода	Компонент питательных сред и реагентов
NaCl 0,85 %	Компонент реагентов
CHROMAgarCandida	Среда для экспресс-диагностики дрожжей
RPMIAgar	Среда для антимикотикочувствительности
Планшета диагностическая apiCandida	Для идентификации дрожжей
Планшета диагностическая ID32C	Для идентификации
Карта идентификационная YST	Для идентификации
Флаконы гемакультуральные аэробные	Для выделения дрожжей
Флаконы гемакультуральные грибные	Для выделения дрожжей
Гентамицина сульфат	Компонент питательной среды
Хлорамфеникол	Компонент питательной среды
Тест-полоски с антимикотиками	Для антимикотикочувствительности дрожжей
Планшета с антимикотиками ATB Fungus 3	Для антимикотикочувствительности дрожжей
Карта с антимикотиками AST-YS07	Для антимикотикочувствительности дрожжей

Таблица 3. — Оборудование для пробоподготовки патогенных дрожжевых грибов для масс-спектрометрического анализа

Наименование оборудования	Количество
Центрифуга для микропробирок 13 000 g	1
Миницентрифуга-Вортекс	1
Аналитические весы с точностью не менее 0,1 мг	1
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)	1
Металлический шпатель для точного забора порошков из пробирок	1
Стекланный или металлический резервуар для чистки мишеней MALDI (диаметр ~100 мм, высота ~50 мм)	1
Штатив рабочее место для 1,5 и 0,2 мл пробирок	1
Бокс абактериальной воздушной среды	1
Пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл	Количество образцов × 2
Одноразовые медицинские перчатки без талька	
Бактериологические петли	
Одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема	
Салфетки безволоконные	

Таблица 4. — Реактивы для пробоподготовки патогенных дрожжевых грибов для масс-спектрометрического анализа

Наименование реактива	Назначение
α -циано-4-гидроксикоричная кислота, фасованная	Матрица для масс-спектрометрического анализа
Бактериальный стандарт	Стандарт для масс-спектрометрического анализа
Ацетонитрил хроматографической чистоты	Компонент буфера для раствора матрицы, реагент для экстракции белков
Ультрачистая вода	Компонент буфера для раствора матрицы, раствор для лизиса клеток
Этанол хроматографической чистоты	Очистка от остатков питательной среды, реагент для экстракции белков
Муравьиная кислота	Реагент для экстракции белков
Трифторуксусная кислота	Компонент буфера для раствора матрицы

Таблица 5. — Оборудование и материалы для ПЦР

Наименование оборудования	Количество
Амплификатор с нагревающейся крышкой	1
Миницентрифуга	1
Вортекс	1
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10; 2-20; 20-200; 200-1000 мкл)	1
Стерильный ламинарный бокс	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Штативы для пластиковых пробирок (1,5 и 0,2 мл) и стрипов	2
Одноразовые резиновые хирургические перчатки без талька	
Одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 48/96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объемом 0,2 мл	
Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом 0,5-10; 10-200 мкл	
Полипропиленовые пробирки вместимостью 0,5 и 1,5 мл с закрывающимися крышками	
Контейнер для сброса наконечников и использованных пробирок	1
Твердотельный термостат для полипропиленовых пробирок вместимостью 0,2 мл с закрывающимися крышками, настроенный на температуру 25-100 °С	1

Таблица 6. — Реактивы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и очистки продуктов амплификации

Наименование реактива	Назначение
Вода milli-Q	
10-кратный буфер для PCR	Смесь реактивов для создания оптимальных условий для работы Taq ДНК-полимеразы
25 mM MgCl ₂	Источник Mg ²⁺ ионов для работы Taq ДНК-полимеразы
Смесь dNTP (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов) (концентрация каждого dNTP 2,5 mM)	Мономер для синтеза ДНК
Олигонуклеотидные праймеры	«Затравка» для синтеза новой цепочки ДНК
Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл)	Фермент, осуществляющий синтез ДНК
Образец геномной ДНК	Матрица для синтеза ДНК
Набор реагентов для очистки продуктов амплификации	

Таблица 7. — Оборудование и материалы для секвенирования

Наименование оборудования	Количество
Секвенатор	1
Источник питания с постоянным током	1
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10; 2-20; 20-200; 200-1000 мкл)	1
Одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 48/96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объемом 0,2 мл	
Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом 0,5-10; 10-200 мкл	
Полипропиленовые пробирки вместимостью 0,5 и 1,5 мл с закрывающимися крышками	
Вортекс	1
Амплификатор с нагревающейся крышкой	1

Таблица 8. — Реактивы для секвенирования

Наименование реактива	Назначение
Вода milli-Q	
Набор реагентов для постановки реакции секвенирования	
Набор для очистки продуктов секвенирования от избытка нуклеотидов и реагентов	
Формаид	Реагент для растворения очищенных продуктов амплификации

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Микробиологические исследования для идентификации патогенных дрожжевых грибов

Приготовление питательных сред и реагентов для микробиологических исследований

1. Для приготовления агаризованной среды Сабуро нужно взвесить 60 г готовой среды Sabouraud Dextrose Agar, развести навеску в 1 л дистиллированной воды и автоклавировать 15 мин при температуре 121 °С. Остудить до 50 °С и добавить по 1 мл хлорамфеникола и гентамицин сульфата. Разлить в асептических условиях по 20 мл в стерильные чашки Петри. Остудить чашки Петри с агаром до комнатной температуры и использовать для микробиологического посева.

2. Для приготовления жидкой среды Сабуро необходимо взвесить 30 г готовой среды Sabouraud Dextrose Broth, внести навеску в 1 л дистиллированной воды и растворить при нагревании. Разлить в пробирки с пробками по 5 мл и автоклавировать 15 мин при температуре 121 °С. Остудить пробирки со средой до комнатной температуры и использовать для микробиологического посева.

Забор биологического материала

Взятие биологического материала для микробиологического исследования у пациентов рекомендуется производить до начала антибактериальной терапии. Материалом для исследования являются: венозная кровь, содержимое респираторного тракта (мокрота, трахеальный аспират, плевральная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж), образцы кала и мочи, содержимое ран, прочие стерильные в норме биологические жидкости, биопсийный материал. Отбор проб осуществляется в соответствии с общепринятыми методиками. Объем забираемого биоматериала должен быть не менее 1 мл.

Забор крови из вены осуществляется в специальные гемафлаконы, предназначенные для выделения аэробной либо грибной микрофлоры на фоне гипертермии не менее 3-х раз в сут. Сроки доставки в лабораторию — не более 24 ч с момента забора. Гемафлаконы для аэробной микрофлоры до момента доставки хранить в темноте при температуре 35±2 °С.

Взятие мокроты осуществляют утром натощак после гигиенических процедур при глубоком откашливании в стерильный одноразовый флакон с широким горлом и завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл. Сроки доставки — не более 24 ч с момента забора. Хранить при температуре от 4 до 8 °С.

Промывные воды бронхов, бронхоальвеолярный лаваж, плевральный экссудат помещают в стерильную пробирку либо банку, плотно закрытую пробкой либо крышкой, и хранят при температуре от 4 до 8 °С. Срок доставки в лабораторию — не более 24 ч.

Кусочки легочной ткани (биоптаты и аутоптаты) отбирают в объеме не менее 1 см³ и помещают в пробирку со стерильной дистиллированной водой. Транспортировка материала осуществляется как можно быстрее, допускается хранение материала до начала исследования при температуре от 4 до 8 °С не более 24 ч.

Взятие проб мочи для исследования осуществляют в полипропиленовые контейнеры с крышкой. Хранят и транспортируют в герметично закрытых контейнерах при температуре от 4 до 8 °С в течение 2 ч.

Для исследования методом ПЦР материал транспортируют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами при температуре от 4 до 8 °С в течение 6 ч, в замороженном виде — в течение 24 ч. С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды.

При заборе секционного материала образцы пораженных участков легочной ткани, печени, селезенки (по 2-3 кусочка размером 1x1 см) вырезают обработанным 70 %-м спиртом и прожженными в пламени спиртовки инструментами, помещают в стерильные пробирки или флаконы, плотно закрывают резиновыми пробками. Транспортировку материалов осуществляют при температуре от 4 до 8 °С в течение 24 ч.

Посев биологического материала на питательные среды и выделение чистой культуры дрожжей

Этап 1. Исследуемый материал вносят в соответствующие гемакультуральные флаконы либо засевают на селективные питательные среды, предназначенные для культивирования дрожжей. С этой целью применяют питательные среды с соответствующими ростовыми и селективными добавками (Sabouraud Dextrose Agar, Sabouraud Dextrose Broth). Для ингибирования роста посторонней микрофлоры в вышеуказанные питательные среды добавляются антибиотики (хлорамфеникол и гентамицин сульфат).

Посевы инкубируют в гемафлаконах при температуре 35 ± 2 °С в автоматических культиваторах либо на чашках Петри с агаризованной средой или в пробирках с жидкой средой; в термостате — при 30 ± 2 °С. Рост колоний из клинического материала наблюдается на 3-5 сут инкубации. Подозрительные колонии просматривают на чашках Петри с помощью бинокулярного стереомикроскопа. При этом внешний вид колоний зависит от разновидности микроорганизмов. Дополнительно с целью установления принадлежности выросших колоний к дрожжевым микромицетам проводится фазово-контрастная микроскопия на стекле.

Этап 2. При подозрении на рост дрожжей колонии пересевают на среду с хромогенными индикаторами типа CHOMA_g Agar Candida для получения чистой культуры микроорганизмов и ускоренной (экспресс) идентификации.

Идентификация патогенных дрожжевых грибов

Этап 1. Рост колоний дрожжей на средах с индикаторами наблюдается через 24 ч с момента посева. Экспресс-идентификацию дрожжей выполняют на основании изучения морфологии и цвета колоний.

Этап 2. Для определения видовой принадлежности выросших культур дрожжей используют специальные идентификационные панели (типа apiCandida, ID32C) для полуавтоматизированных анализаторов (типа mini API) и карты (типа YST) для автоматического оборудования (типа Vitek 2 Compact). С помощью бактериологического тампона отбирают выросшие колонии, тщательно суспендируют и измеряют плотность по стандарту MacFarland. Полученная суспензия с оптической плотностью в диапазоне от 1,8 до 3 единиц

MacFarland (в зависимости от используемого диагностикума) вносится в лунки идентификационных планшетов или карт с последующей инкубацией в аэробных условиях в течение 18-48 ч при температуре в диапазоне от 29 до 36 °С (в зависимости от используемого реагента). Учет результатов производится приборами в автоматическом режиме.

Для непосредственного выявления дрожжей в биологическом материале либо для подтверждения результатов фенотипической диагностики отдельных видов дрожжевых грибов осуществляются молекулярно-биологические исследования методом ПЦР в режиме «реального времени». Для ПЦР в режиме реального времени используются различные коммерческие тест-системы (Реал-Бест ДНК *Candida albicans*/Fungi, Реал-Бест ДНК *Candida famata*/*Candida quilliermondii*, Реал-Бест ДНК *Candida krusei*/*Candida glabrata*). Постановка и учет реакции производятся согласно инструкции по применению набора реагентов.

При наличии необходимого оборудования возможна идентификация дрожжей с помощью масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ

Приготовление растворов

1. Раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты: растворить навеску α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (матрицы) в стандартном растворителе (ацетонитрил 50 %, вода 47,5 % и трифторуксусная кислота 2,5 %). Конечная концентрация матрицы в растворе 10 мг/мл.

2. Бактериальный стандарт: согласно инструкции производителя.

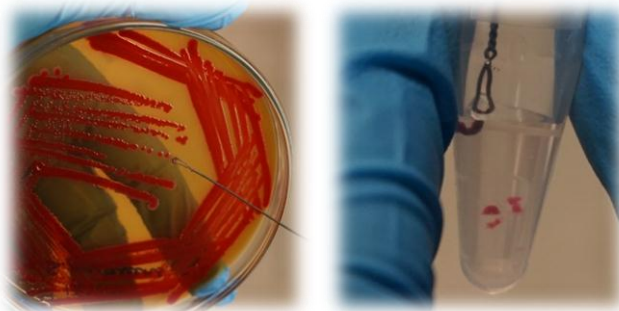
Идентификация патогенных грибов с помощью масс-спектрометрического анализа (2 этапа):

Этап 1. Пробоподготовка дрожжевых патогенных грибов для масс-спектрометрического анализа

Приготовление образца при культивировании на агаризованной среде:

1. Внести в пробирки по 300 мкл воды для MALDI (стерильная или деионизированная вода).

2. При помощи бактериологической петли поместить небольшое видимое количество дрожже-содержащего биологического материала (БМ) (5-10 мг) в пробирку типа эппендорф, содержащий 300 мкл воды. Как правило, достаточно биоматериала размером со спичечную головку.



Затем перемешать на вортексе на средних скоростях (происходит лизис клеток в воде).

3. Добавить 700 мкл 96 %-го этанола. Перемешать на вортексе на средних скоростях (ВАЖНО! в таком состоянии клетки можно хранить при -20°C в течение нескольких недель, а также транспортировать их).

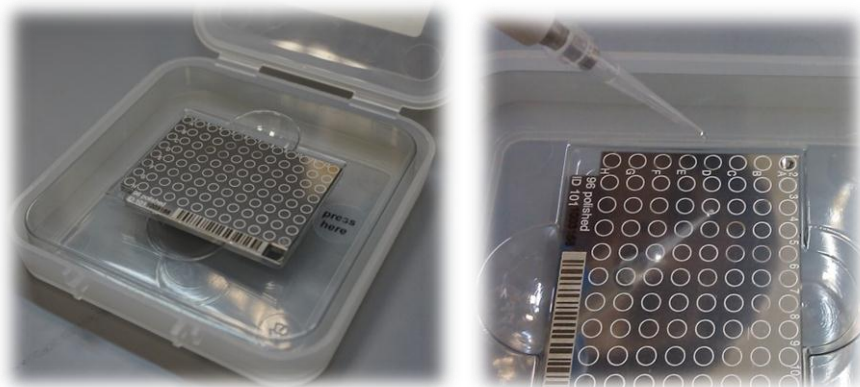
4. Центрифугировать на максимальной скорости около 2 мин, удалить супернатант. Если не удалось удалить спирт полностью, пробы можно подсушить на воздухе или в термостате при $37-42^{\circ}\text{C}$.

5. Добавить 50 мкл 70 % муравьиной кислоты к осадку и очень хорошо перемешать пипетированием и/или на вортексе.

6. Добавить 50 мкл ацетонитрила и осторожно перемешать.

7. Центрифугировать на максимальной скорости 2 мин, перенести супернатант в новую пробирку, если планируются повторные измерения или хранение образцов.

8. Нанести 1 мкл (от 0,5 до 2 мкл) полученного супернатанта на металлическую мишень и высушить на воздухе.

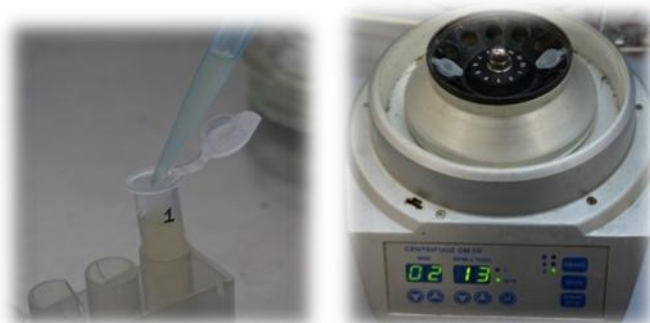


9. Сразу после высыхания сверху нанести 1-2 мкл раствора матрицы, не касаясь поверхности лунки. Если касание произошло — заменить наконечник.

10. Оставить мишень на 5-10 мин до полного высыхания. Убедиться, что капля препарата полностью высохла, приподняв мишень на уровень глаз. После того, как МАЛДИ матрица полностью высохнет, мишень готова для выполнения анализа.

Приготовление образца при культивировании микормицетов в жидкой питательной среде:

1. В пробирку типа эппендорф поместить 1,5 мл жидкой культуры и центрифугировать 2 мин при 13 000 об/мин.



2. Визуально оценить количество образовавшегося осадка БМ. Желательно, чтобы он покрывал дно пробирки. Если БМ очень мало, то надосадак слить и к

имеющемуся осадку добавить еще 1,5 мл жидкой культуры и повторить центрифугирование.

3. Надосадок слить и приступить к процессу очистки БМ от остатков питательной среды. Для этого: к осадку добавить 1 мл 70 % этанола (ВАЖНО! в таком состоянии клетки можно хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких недель).

4. Центрифугировать на максимальной скорости около 2 мин, удалить



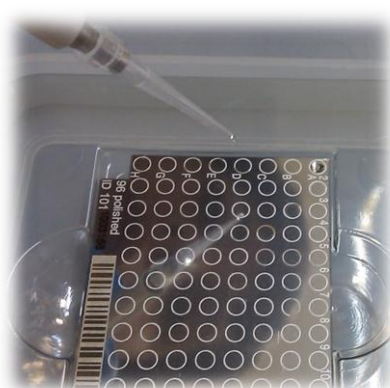
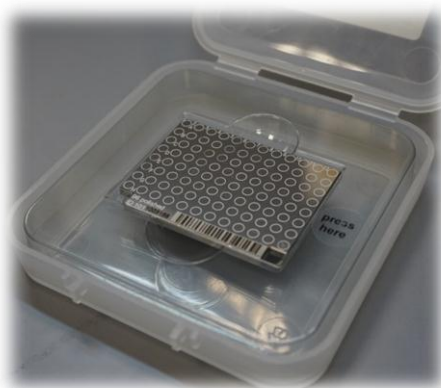
супернатант. Если не удалось удалить спирт полностью, пробы можно подсушить на воздухе или в термостате при $37\text{-}42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Добавить 50 мкл 70 % муравьиной кислоты к осадку и очень хорошо перемешать пипетированием и/или на вортексе.

6. Добавить 50 мкл ацетонитрила и осторожно перемешать.

7. Центрифугировать на максимальной скорости 2 мин, перенести супернатант в новую пробирку, если планируются повторные измерения или хранение образцов.

8. Нанести 1 мкл (от 0,5 до 2 мкл) полученного супернатанта на металлическую мишень и высушить на воздухе.



9. Сразу после высыхания сверху нанести 1-2 мкл раствора матрицы, не касаясь поверхности лунки. Если касание произошло — заменить наконечник.

10. Оставить мишень на 5-10 мин до полного высыхания. Убедиться, что капля препарата полностью высохла, приподняв мишень на уровень глаз. После того, как МАЛДИ матрица полностью высохнет — мишень готова для выполнения анализа.

Этап 2. Масс-спектрометрический анализ

МАЛДИ масс-спектрометрия исследуемого образца осуществлялась на времяпролетном масс-спектрометре серии Microflex LRF (Bruker Daltonik GmbH,

Германия) с источником MALDI, оснащенным азотным лазером (335 нм) с частотой 60 Гц, в режиме детектирования положительных ионов в линейном режиме при следующих настройках ионного источника: напряжение — 20 кВ; напряжение на линзах (Lens) — 8,0 кВ. Ионы детектировали в диапазоне m/z от 2000 до 20 000. Масс-спектры регистрировали при помощи программы FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). В качестве стандарта использовали Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Обработку спектров, полученных при помощи масс-спектрометра MALDI-TOF Microflexs LRF, выполняли в программе FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Для идентификации микроорганизмов использовали программы MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Определение резистентности выделенных возбудителей дрожжевых грибов к противогрибковым лекарственным средствам

С этой целью используются коммерческие наборы для ручной, полуавтоматической и автоматической диагностики (тест-полоски типа ETEST и MICTestStrip, планшеты типа ATB Fungus, а также карты типа AST-YS06). Взвеси чистых культур с оптической плотностью в диапазоне 1,8-2,2 MacFarland (в зависимости от используемых реагентов) наносятся тампоном на чашку Петри с агаризованной средой типа RPMI с последующим внесением тест-полосок с различной концентрацией антимикотика, либо вносятся в ячейки планшетов или карт с рядом противогрибковых лекарственных средств в различных диапазонах концентраций. Учет минимальной ингибирующей концентрации (МИК) осуществляется через 24-48 ч инкубации при температуре 35 °С и соответствует наименьшей концентрации, полностью ингибирующей рост дрожжевой микрофлоры. Результаты исследований учитываются визуально при использовании тест-полосок либо автоматически при использовании планшетов (с помощью прибора mini API) или карт (с помощью анализатора Vitek 2 Compact). Интерпретация полученных результатов выполняется в соответствии с критериями, рекомендованными CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) или EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) и выражается с виде трех категорий оценки: чувствительный, умеренно устойчивый и устойчивый.

Необходимо отметить, что отдельные возбудители микозов имеют исходную резистентность к ряду антимикотиков.

Таблица 9. — Виды микромицет, резистентных к антимикотикам

Виды микромицет, для которых описана исходная устойчивость			
Флуконазол	Амфотерицин В	Кетоконазол, итраконазол	Эхинокандины (каспофунгин)
<i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. ciferrii</i> <i>C. inconspicua</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. tropicalis</i>	<i>C. lipolytica</i> <i>C. lusitaniae</i>	<i>C. norvengensis</i>	<i>C. glabrata</i>

При наличии необходимого оборудования возможно молекулярные исследования по определению мутаций гена *CYP51 C. albicans* с целью выявления вероятности возникновения резистентности к азолам в краткосрочный период.

Молекулярные исследования по определению мутаций в гене CYP51

Определение мутаций, влияющих на развитие резистентности к лекарственным средствам азолового ряда, гена *CYP51* патогенного гриба *Candida albicans* включало в себя следующие этапы:

Этап 1. Приготовление суспензии дрожжевых клеток, используемых в качестве матрицы при ПЦР.

Этап 2. ПЦР и очистка продуктов амплификации.

Этап 3. Секвенирование.

Этап 4. Выявление мутаций в анализируемых последовательностях гена *CYP51* патогенного гриба *Candida albicans*.

Этап 5. Интерпретация результатов молекулярного анализа гена *CYP51*.

Приготовление суспензии дрожжевых клеток, используемых в качестве матрицы при ПЦР

1. Внести по 10 мкл 0,02 М NaOH в пробирки согласно количеству образцов, предварительно промаркировав их.

2. Используя стерильный наконечник для дозатора или бактериологическую петлю, отобрать небольшую колонию и ресуспендируйте в NaOH. Если раствор получился мутным — добавлено достаточное количество клеток. Добавление слишком большого количества дрожжевых клеток может ингибировать реакцию.

3. Проинкубировать пробирки с образцами при 99 °С в течение 10 мин. После инкубации образцы стабильны при комнатной температуре в течение некоторого времени. В случае более длительного хранения, держите образцы на льду или заморозьте.

ПЦР и очистка продуктов амплификации

Для определения мутаций, влияющих на развитие резистентности к лекарственным средствам азолового ряда, гена *CYP51*, проводили ПЦП.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих анализируемый участок гена *CYP51*, представлены в таблице 10.

Таблица 10. — Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевого фрагмента гена *CYP51*

Регион	Последовательность праймера
CA_F	gtaaacgacggccagtgatgtatttcatttatg
CA_R	caggaaacagctatgactgctggttcagtaggtaaac

1. В каждую пробирку добавить по 2 мкл суспензии дрожжевых клеток, используемых в качестве матрицы.

2. Приготовить реакционные смеси согласно таблицам 10 и 11 в количестве, соответствующему числу анализируемых образцов. Конечный объем реакционной смеси в пробирке 25 мкл.

Таблица 11. — Состав реакционной смеси для амплификации анализируемого участка гена *CYP51*

Компонент	Конечная концентрация в реакционной смеси
H ₂ O (milli-Q)	-
10x буфер для амплификации	1x
MgCl ₂	2 мМ
dNTPs	200 мкМ
CA_F	0,4 мкМ
CA_R	0,4 мкМ
Taq ДНК-полимераза	1,5 ед.
DNA	-

3. Разлить смесь для амплификации в ПЦР-пробирки по 23 мкл.
4. Промаркировать ПЦР-пробирки.
5. Поместить пробирки в амплификатор с нагревающейся крышкой.
Температурный режим амплификации задать согласно таблице 12.

Таблица 12. — Температурный режим амплификации

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	5 мин	1
95	20 с	35
55	20 с	
72	30 с	
72	5 мин	1
10		∞

В результате амплификации получался продукт длиной 1309 п.н.о.

Продукты амплификации очищали при помощи набора Macherey-Nagel «NucleoSpin Gel and PCR Clean up» (Германия).

Секвенирование

Нуклеотидную последовательность ампликонов определяли на секвенаторе Applied Biosystems 3130 с использованием наборов для постановки реакции секвенирования «ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cyclor Sequencing Kit» (согласно инструкции производителя), набора для очистки продуктов секвенирования от избытка нуклеотидов и реагентов «BigDye XTerminator Purification Kit» (согласно инструкции производителя).

В качестве праймеров для секвенирования анализируемого ампликона использовали следующие олигонуклеотидные последовательности:

M13-F: GTAAAACGACGGCCAG

M13-R: CAGGAAACAGCTATGAC

CA_HP2: TTGACCGTTCATTTGCTC

Выявление мутаций в анализируемых последовательностях гена CYP51 гриба *Candida albicans*

Визуализацию нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена CYP51 гриба *Candida albicans* осуществляли с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems):

1. Скопировать нуклеотидную последовательность, соответствующую высокой степени достоверности в режиме автоматического секвенирования.
2. На сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> выбрать функцию «blastx» (рисунок 1).

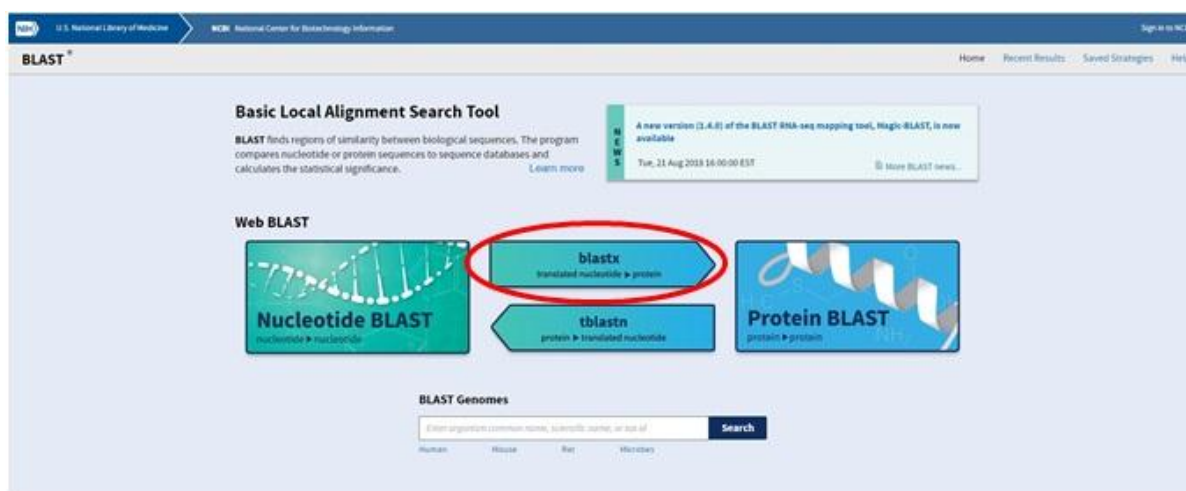


Рисунок 1. — Главная страница онлайн-сервиса BLAST

3. В поле «Enter Query Sequence» скопировать нуклеотидную последовательность анализируемого образца, полученную в результате секвенирования; «Database» — выбрать «Non-redundant protein sequences (nr)»; «Entrez Query» — ввести код доступа P10613.2 (референсная аминокислотная последовательность чувствительного штамма *Candida albicans* SC5314). Нажать кнопку «BLAST» (рисунок 2).

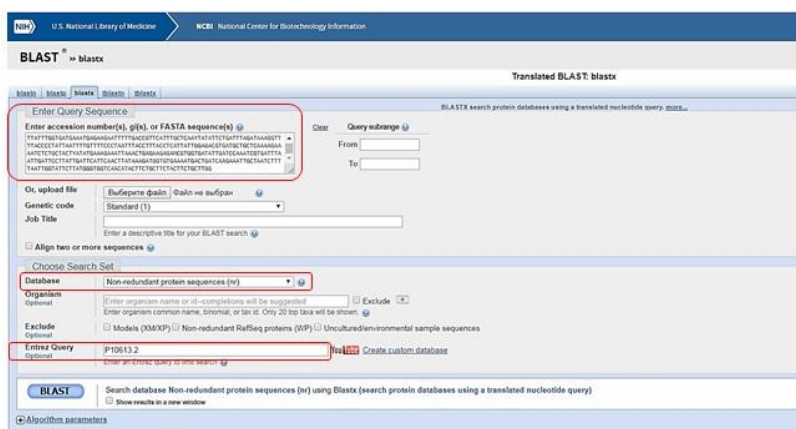


Рисунок 2. — Страница для введения параметров поиска на онлайн-сервисе BLAST

4. В результате анализа в открывшемся окне приводится выравнивание введенной нуклеотидной последовательности анализируемого образца (Query), транслированной в аминокислотную последовательность белка, относительно аминокислотной последовательности референсного штамма (Sbjct).

Alignments

Download v GenPept Graphics

RecName: Full=Lanosterol 14-alpha demethylase; AltName: Full=CYP1I; AltName: Full=Cytochrome P450 €
 Sequence ID: P10613.2 Length: 528 Number of Matches: 1

Range 1: 35 to 446 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
847 bits(2188)	0.0	Compositional matrix adjust.	406/412(99%)	409/412(99%)	0/412(0%)	+3

Query	3	LWQVLYSLRKDRAPLVFVWIPMFGSAASVGGQPYEFFESCROKYGQVDFSMLLGKIMTV	182
Sbjct	35	LWQVLYSLRKDRAPLVFVWIPMFGSAASVGGQPYEFFESCROKYGQVDFSMLLGKIMTV	94
Query	183	YLGPKGHEFVFNAKLSQVSAEDAYKHLTPVFGKGVYDCPNISRLMEQKFAKALTDS	362
Sbjct	95	YLGPKGHEFVFNAKLSQVSAEDAYKHLTPVFGKGVYDCPNISRLMEQKFAKALTDS	154
Query	363	FKRYVPKIREEILNYFVTDSEFLLKETHGVANMKTOPEITIFTASRSLFGDEMRIFD	542
Sbjct	155	FKRYVPKIREEILNYFVTDSEFLLKETHGVANMKTOPEITIFTASRSLFGDEMRIFD	214
Query	543	RSFAQLYSPLDVGFTPIINFVFNPLPHYVIRROAAQKKISATYMKELSRREGDIDPIR	722
Sbjct	215	RSFAQLYSPLDVGFTPIINFVFNPLPHYVIRROAAQKKISATYMKELSRREGDIDPIR	274
Query	723	DLIDSLLIHSTYKDGVMQDQEIANLLIGILVGGHTSASTSAHFLLHLGKPHLQDVIY	902
Sbjct	275	DLIDSLLIHSTYKDGVMQDQEIANLLIGILVGGHTSASTSAHFLLHLGKPHLQDVIY	334
Query	903	QEWELLKKEGGDLIDLTYEDLQKLPVMNITIKETLRHPLHSIFRKVTIPLRIPETIY	1082
Sbjct	335	QEWELLKKEGGDLIDLTYEDLQKLPVMNITIKETLRHPLHSIFRKVTIPLRIPETIY	394
Query	1083	IVPKGHVYLVSPGYAHTSERYFDNPEDFDPTNRHDTAAAKANSVSNSSQDND	1238
Sbjct	395	IVPKGHVYLVSPGYAHTSERYFDNPEDFDPTNRHDTAAAKANSVSNSSQDND	446

Рисунок 3. — Результаты выравнивания

Если в консенсусной последовательности (расположена между анализируемой и референсной) находится пробел или «+» (в случае замены на аминокислоту со сходными свойствами) — это соответствует наличию несовпадения (мутации) в данном положении. На рисунке 3 представлено выравнивание, где в анализируемой последовательности присутствует 6 мутаций: K179E, L224I, S263L, E266D, G307C, M372T. Номер позиции, в которой произошла аминокислотная замена, определяется по нумерации в строке «Sbjct».

Интерпретация результатов молекулярного анализа гена CYP51 гриба Candida albicans

Интерпретация результатов молекулярного анализа гена *CYP51* патогенного гриба *Candida albicans* при обнаружении мутаций, влияющих на развитие резистентности к лекарственным средствам азолового ряда:

1. Обнаружение мутаций A114S, G129A, Y132H/F, K143R, Y257H, D278N/E, G307S, S405F, F449V/E, G450E/V, G464S по отдельности или в комбинации с другими аминокислотными заменами свидетельствует о высокой вероятности того, что данный штамм резистентен к азолам.

2. Обнаружение мутаций K108E, T123I, F126L, A149V, M258L, I261V, Y286D, A317T, K344E, V404L, G448E, V452A, G465S, I483V по отдельности или в комбинации с другими аминокислотными заменами (не перечисленными в пункте 1) свидетельствует о высокой вероятности возникновения резистентности к азолам в краткосрочный период.

3. Не обнаружено мутаций — низкая вероятность возникновения резистентности к азолам в краткосрочный период.

II МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Перечень необходимого оборудования, медицинских изделий и реактивов представлен в таблицах 13-16.

Таблица 13. — Оборудование для выделения патогенных мицелиальных грибов из клинического материала, их идентификации и определения антимикотикорезистентности

Наименование оборудования	Количество
Весы электронные или механические с точностью $\pm 0,1$ г	1
pH-метр с диапазоном от 1 до 14 и точностью $\pm 0,01$ pH	1
Шкаф сушильно-стерилизационный с диапазоном 160 ± 5 °C	1
Термостаты суховоздушные с диапазоном от 25 ± 2 до 45 ± 2 °C	2
Водяная баня с диапазоном температуры до 96 °C	1
Стерилизатор паровой	1
Дистиллятор	1
Облучатель бактерицидный	2
Холодильник с температурой в камере от 4 до 6 °C	1
Морозильная камера с температурой в камере до -70 °C	1
Универсальная роторная центрифуга для пробирок до 2 мл	1
Микроскоп биологический	1
Микроскоп стереоскопический	1
Микроскоп люминесцентный	1
Шкаф ламинарный	1
Электроплитка бытовая	1
Вортекс	1
Гемакультиватор микробиологический типа VacT/Alert	1
Гемакультиватор микробиологический типа Vactek	1
Комплект полуавтоматических дозаторов (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)	1
Одноразовые медицинские перчатки без талька	
Бактериологические чашки Петри и петли	
Пластмассовые емкости для биоматериала	
Предметные и покровные стекла для микроскопии	
Одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема	

Таблица 14. — Среды, реактивы и реагенты для выделения патогенных мицелиальных грибов из клинического материала, их идентификации и определения антимикотикорезистентности

Наименование оборудования	Назначение
Среда Sabouraud Dextrose Agar	Среда для выделения плесеней
Среда Sabouraud Dextrose Broth	Среда для накопления
Дистиллированная вода	Компонент среды
RPMIAgar	Среда для чувствительности
Флаконы гемакультуральные аэробные	Среда для выделения грибов
Флаконы гемакультуральные грибные	Среда для выделения грибов
Гентамицина сульфат	Компонент среды
Хлорамфеникол	Компонент среды
Тест-полоски с антимикотиками типа	Определение чувствительности
Краситель типа Calcufluor White Reagent	Визуализация грибов
Краситель типа Methenamine Silver Stain Kit	Визуализация грибов
Краситель типа Lactophenol Cotton Blue	Визуализация грибов

Таблица 15. — Оборудование для пробоподготовки патогенных мицелиальных грибов для масс-спектрометрического анализа

Наименование оборудования	Количество
Центрифуга для микропробирок 13 000 g	1
Миницентрифуга-Вортекс	1
Аналитические весы с точностью не менее 0,1 мг	1
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)	1
Металлический шпатель для точного забора порошков из пробирок	1
Стеклянный или металлический резервуар для чистки мишеней MALDI (Ø ~100 мм, высота ~50 мм)	1
Штатив-рабочее место для 1,5 и 0.2 мл пробирок	1
Бокс абактериальной воздушной среды	1
Пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл	Количество образцов × 2
Одноразовые медицинские перчатки без талька	
Бактериологические петли	
Одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема	
Салфетки безволоконные	

Таблица 16. — Реактивы для пробоподготовки патогенных мицелиальных грибов для масс-спектрометрического анализа

Наименование реактива	Назначение
α-циано-4-гидроксикоричная кислота, фасованная	Матрица для масс-спектрометрического анализа
Бактериальный стандарт	Стандарт для масс-спектрометрического анализа
Ацетонитрил хроматографической чистоты	Компонент буфера для раствора матрицы; реагент для экстракции белков

Продолжение таблицы 16

Ультрачистая вода	Компонент буфера для раствора матрицы; раствор для лизиса клеток
Этанол хроматографической чистоты	Очистка от остатков питательной среды; реагент для экстракции белков
Трифторуксусная кислота	Компонент буфера для раствора матрицы; реагент для экстракции

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Микробиологические исследования

Приготовление питательных сред и реагентов для микробиологических исследований

1. Для приготовления агаризованной среды Сабуро взвесить 60 г готовой среды Sabouraud Dextrose Agar, развести навеску в 1 л дистиллированной воды и автоклавировать 15 мин при температуре 121 °С. Остудить до 50 °С и добавить по 1 мл хлорамфеникола и гентамицин сульфата. Разлить в асептических условиях по 20 мл в стерильные чашки Петри. Остудить чашки Петри с агаром до комнатной температуры и использовать для микробиологического посева.

2. Для приготовления жидкой среды Сабуро взвесить 30 г готовой среды Sabouraud Dextrose Broth, внести навеску в 1 л дистиллированной воды и растворить при нагревании. Разлить в пробирки с пробками по 5 мл и автоклавировать 15 мин при температуре 121 °С. Остудить пробирки со средой до комнатной температуры и использовать для микробиологического посева.

Забор биологического материала

Взятие биологического материала для микробиологического исследования у пациентов рекомендуется производить до начала антибактериальной терапии. Материалом для исследования являются: венозная кровь, содержимое респираторного тракта (мокрота, трахеальный аспират, плевральную жидкость, бронхоальвеолярный лаваж), образцы кала и мочи, содержимое ран, прочие стерильные в норме биологические жидкости, биопсийный материал. Отбор проб осуществляется в соответствии с общепринятыми методиками. Объем забираемого биоматериала должен быть не менее 1 мл.

Забор крови из вены осуществляется в специальные гемафлаконы, предназначенные для выделения аэробной либо грибной микрофлоры, на фоне гипертермии, не менее 3 раз в сут. Сроки доставки в лабораторию — не более 24 ч с момента забора. Гемафлаконы для аэробной микрофлоры до момента доставки хранить в темноте при температуре 35±2 °С.

Взятие мокроты осуществляют утром натощак после гигиенических процедур при глубоком откашливании в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл. Сроки доставки — не более 24 ч с момента забора. Хранить при температуре от 4 до 8 °С.

Промывные воды бронхов, бронхоальвеолярный лаваж, плевральный экссудат помещают в стерильную пробирку либо банку, плотно закрытую

пробкой либо крышкой, и хранят при температуре от 4 до 8 °С. Срок доставки в лабораторию — не более 24 ч.

Кусочки легочной ткани (биоптаты и аутоптаты) отбирают в объеме не менее 1 см³ и помещают в пробирку со стерильной дистиллированной водой. Транспортировка материала осуществляется как можно быстрее, допускается хранение материала до начала исследования при температуре от 4 до 8 °С не более 24 ч.

Для исследования мочи взятие проб мочи производят в полипропиленовые контейнеры с крышкой. Хранение и транспортировку проб мочи осуществляют в герметично закрытых контейнерах при температуре от 4 до 8 °С в течение 2 ч.

Для исследования методом ПЦР материал транспортируют в специальном термоконтэйнере с охлаждающими элементами при температуре от 4 до 8 °С в течение 6 ч, в замороженном виде — в течение 24 ч. С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды.

При заборе секционного материала образцы пораженных участков легочной ткани, печени, селезенки (по 2-3 кусочка размером 1x1 см) вырезают обработанными 70 %-м спиртом и прожженными в пламени спиртовки инструментами, помещают в стерильные пробирки или флаконы, плотно закрывают резиновыми пробками. Транспортировку материалов осуществляют при температуре от 4 до 8 °С в течение 24 ч.

Микроскопия нативного биологического материала

В рамках неотложной диагностики мицелиальных микозов производится люминесцентная (с помощью Calcufluor White Reagent) и световая (с помощью Methenamine Silver Stain Kit) микроскопия нативного биологического материала, взятого при инвазивных диагностических процедурах (бронхоскопия, биопсия и аутопсия органов и тканей).

Посев биологического материала на питательные среды и выделение чистой культуры мицелиальных грибов

Исследуемый материал вносят в соответствующие гемакультуральные флаконы либо засевают на селективные питательные среды, предназначенные для культивирования мицелиальных грибов. С этой целью применяют питательные среды с соответствующими ростовыми и селективными добавками (Sabouraud Dextrose Agar, Sabouraud Dextrose Broth). Для ингибирования роста посторонней микрофлоры в вышеуказанные питательные среды добавляются антибиотики (хлорамфеникол и гентамицина сульфат).

Посевы инкубируют в гемафлаконах (при температуре 35±2 °С) в автоматических культиваторах либо на чашках Петри с агаризованной средой или в пробирках с жидкой средой, в термостате при температуре 30±2 °С. Рост колоний из клинического материала наблюдается до 14 сут с момента посева с ежедневным визуальным просмотром чашек Петри. При появлении роста микрофлоры в гемафлаконах выполняется высев на чашки Петри с агаризованной средой Сабуро с целью получения чистой культуры микроорганизмов.

Идентификация патогенных мицелиальных грибов

Этап 1. При появлении роста микромицетов осуществляется макроморфологическая идентификация мицелиальных грибов с учетом внешнего вида, характера и скорости роста, фактуры, размера и цвета колоний.

Этап 2. Дополнительно с целью установления родовой и видовой принадлежности выросших колоний грибов проводится световая микроскопия с помощью красителя типа Lactophenol Cotton Blue.

Для непосредственного выявления мицелиальных грибов в биологическом материале либо для подтверждения результатов фенотипической диагностики отдельных видов мицелиальной флоры выполняются молекулярно-биологические исследования методом ПЦР в режиме реального времени. Для этого используются различные коммерческие тест-системы (типа Fungiplex Aspergillus). Постановка и учет реакции проводятся согласно инструкции по применению набора реагентов.

При наличии необходимого оборудования возможна идентификация мицелиальных грибов с помощью масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ

Приготовление растворов

1. Раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты: растворить навеску α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (матрицы) в стандартном растворителе (ацетонитрил — 50 %, вода — 47,5 % и ТФУ — 2,5 %). Конечная концентрация матрицы в растворе — 10 мг/мл.

2. Бактериальный стандарт: согласно инструкции производителя.

Идентификация патогенных мицелиальных грибов с помощью масс-спектрометрического анализа включало в себя 2 этапа:

Этап 1. Пробоподготовка мицелиальных патогенных грибов для масс-спектрометрического анализа

Приготовление образца при культивировании на агаризованной среде:

1. В пробирку типа эппендорф налить 50 мкл 80 % ТФУ. Работу выполнять в вытяжном шкафу, т. к. кислота крайне летучая и обладает резким неприятным запахом.

2. При помощи бактериологической петли поместить небольшое видимое



количество мицелий-содержащего биологического материала (БМ) (5-10 мг) в пробирку типа эппендорф, содержащий 50 мкл ТФУ. Как правило, достаточно одной колонии. Петлю перед каждым последующим использованием прокалывать над пламенем спиртовки. **ВНИМАНИЕ!** Стараться не захватывать частички агара!

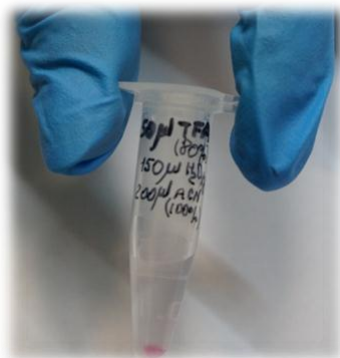
3. Ресуспендировать БМ пипетированием или встряхиванием на вортексе до полного растворения/денатурации (в случае со спорообразующими бактериями раствор будет оставаться мутным). Инкубировать при комнатной температуре 30 мин.



4. К имеющейся смеси добавить 3 объема дистиллированной воды (150 мкл).

5. Добавить равный объем 100 % ацетонитрила (200 мкл) и тщательно встряхнуть на вортексе.

6. Полученную смесь центрифугировать 2 мин при 13 000 g. Полученный супернатант — это готовый препарат для нанесения на МАЛДИ мишень.

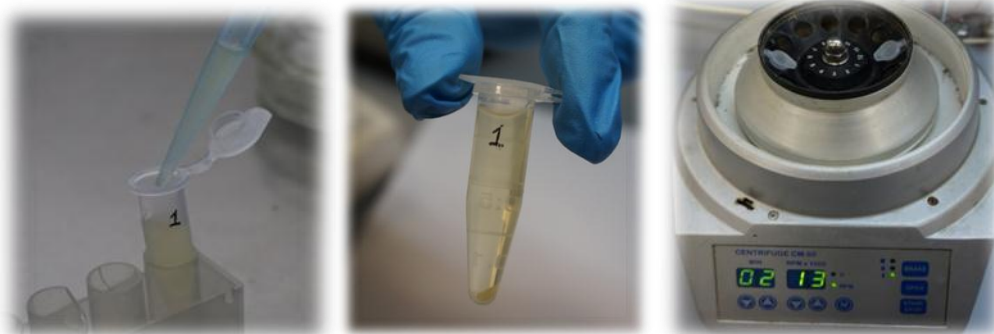


Приготовление образца при культивировании в жидкой питательной среде:

1. В пробирку типа эппендорф поместить 1,5 мл жидкой культуры мицелиальных грибов и центрифугировать 2 мин при 13 000 g.

2. Визуально оценить количество образовавшегося осадка БМ. Желательно, чтобы он покрывал дно пробирки типа эппендорф. Если БМ очень мало, то надосадонок слить и к имеющемуся осадку добавить еще 1,5 мл жидкой культуры и повторить центрифугирование.

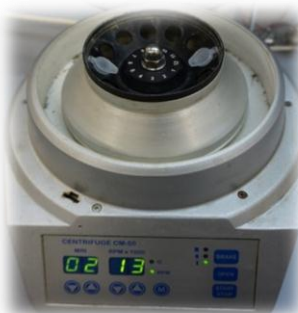
3. Надосадонок слить и приступить к процессу очистки БМ от остатков питательной среды. Для этого: к осадку добавить 1 мл 70 % этанола (ВАЖНО! в таком состоянии клетки можно хранить при -20°C в течение нескольких недель), тщательно встряхнуть на вортексе и центрифугировать 2 мин при 13 000 g. Слить надосадонок и добавить к осадку 50 мкл 80 % ТФУ. Тщательно ресуспендировать.



4. К имеющейся смеси добавить 3 объема дистиллированной воды (150 мкл).

5. Добавить равный объем 100 % ацетонитрила (200 мкл) и тщательно встряхнуть на вортексе.

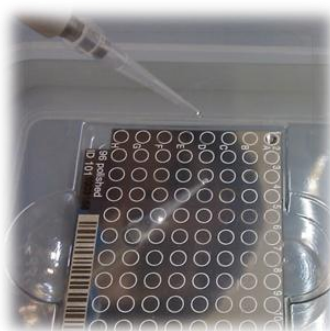
6. Полученную смесь центрифугировать 2 мин при 13 000 g. Полученный супернатант — это готовый препарат для нанесения на МАЛДИ мишень.



7. Нанести 1 мкл (от 0,5 до 2 мкл) полученного супернатанта на металлическую мишень и высушить на воздухе.

8. Сразу после высыхания сверху нанести 1-2 мкл раствора матрицы, не касаясь поверхности лунки. Если касание произошло — заменить наконечник.

9. Оставить мишень на 5-10 мин до полного высыхания. Убедиться, что капля препарата полностью высохла, приподняв мишень на уровень глаз. После того как МАЛДИ матрица полностью высохнет — мишень готова для проведения анализа.



Этап 2. Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрия исследуемого образца осуществлялась на времяпролетном масс-спектрометре серии Microflex LRF (Bruker Daltonik GmbH, Германия) с источником MALDI, оснащенным азотным лазером (335 нм) с

частотой 60 Гц, в режиме детектирования положительных ионов в линейном режиме при следующих настройках ионного источника: напряжение — 20 кВ; напряжение на линзах (Lens) — 8.0 кВ. Ионы детектировали в диапазоне m/z от 2000 до 20 000. Масс-спектры регистрировали при помощи программы FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). В качестве стандарта использовали Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Обработку спектров, полученных при помощи масс-спектрометра MALDI-TOF Microflexs LRF, выполняли в программе FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Для идентификации микроорганизмов использовали программы MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Определение резистентности выделенных возбудителей мицелиальных инвазивных микозов к противогрибковым лекарственным средствам

С этой целью используются коммерческие наборы для ручной диагностики (тест-полоски типа ETEST и MICTestStrip). Взвеси чистых культур с оптической плотностью 0,5 MacFarland наносятся тампоном на чашку Петри с агаризованной средой типа RPMI с последующим внесением тест-полосок с различной концентрацией антимикотика. Учет минимальной ингибирующей концентрации (МИК) осуществляется через 24-72 ч инкубации при температуре 35 °С и соответствует наименьшей концентрации, полностью ингибирующей рост мицелиальной микрофлоры. Результаты исследований учитываются визуально и выражаются в МИК в мг/л.

Необходимо отметить, что отдельные возбудители микозов имеют исходную резистентность к ряду антимикотиков.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложно-положительные результаты	Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом	Соблюдение принципов зонирования лаборатории Использование спецодежды (стерильные перчатки, халат, бахилы, шапочка) Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов Использование отрицательных контрольных образцов в каждой серии исследований. Исследование в повторе