

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра


Ю.Л.Горбич

«31» _____ 2024 г.

Регистрационный № 127-1124

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОМИЦЕТ

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: к.м.н. М.А. Черновецкий, Е.Я. Скоповец, Н.В. Агеев

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетической идентификации микромицет, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний и патологических состояний, вызванных микромицетами.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-лаборантов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с микозами в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания, а также учреждениях, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Заболевания и патологические состояния, сопровождающиеся симптомами, характерными для микозов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Емкости стерильные пластиковые для взятия содержимого дыхательных путей, крови, мочи, биоптатов органов и тканей;

комплекты полуавтоматических дозаторов в диапазоне от 0,5 до 1000 мкл, с соответствующими одноразовыми наконечниками, для взятия биоматериала;

центрифуга для микропробирок с диапазоном центробежного ускорения до 14 000 g (RCF) включительно;

амплификатор (термоциклер) для проведения ПЦР в режиме «реального времени»;

вортекс (встряхиватель) для приготовления взвесей в процессе выделения геномного материала из микромицет;

бокс стерильный ламинарный для работы с нуклеиновыми кислотами;

твердотельный термостат для полипропиленовых пробирок вместимостью 0,2 мл с закрывающимися крышками, поддерживающий температуру +25...+100⁰ С;

реагенты для выделения ДНК микромицет из биологического материала;

смеси праймеров (олигонуклеотидов) для родовой и видовой идентификации дрожжевых и плесневых микромицет в нативном биологическом материале и в изолированных культурах;

реактивы для проведения ПЦР (компоненты реакционной смеси): смесь dNTP (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов), термостабильная ДНК-полимераза, MgCl₂, буферный раствор для ПЦР. Возможно использование коммерческого мастер-микса, содержащего указанные реактивы.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОМИЦЕТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Основными дрожжевыми микромицетами, вызывающими глубокие микозы с поражением различных органов и тканей являются отдельные представители рода *Candida* (Приложение 1).

Набор подобранных к применению праймеров для идентификации наиболее актуальных представителей *Candida spp.* приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – набор специфических праймеров для *C.albicans*, *C.krusei* и *C.glabrata*

№	Название олигонуклеотидов	К-во, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотидов, 5' → 3'	Метка 5'	Метка 3'
1	<i>Candida albicans</i> F	1	GCTGCCTCTTCTCTGGCTAA		
2	<i>Candida albicans</i> R	1	GGTCGCTAGTTTCGTGTTTG		
3	<i>Candida albicans</i> Pr	1	AGAGACTACCAAAATGGGATGGTT	FAM	BHQ1
4	<i>Candida krusei</i> F	1	CCTCCTTGCATTTCGGGATGT		
5	<i>Candida krusei</i> R	1	CAGTGGGTCCTCGTTCCAAA		
6	<i>Candida krusei</i> Pr	1	CACTGCAGTCAAATGGAGAGGC	HEX	BHQ1
7	<i>Candida glabrata</i> F	1	TGATTAGGCCAATTCGCTGC		
8	<i>Candida glabrata</i> R	1	CCGTTGGCTACTTTTATCAGCA		
9	<i>Candida glabrata</i> Pr	1	TCAGCCTTAACAGAAATGAATGCAA	ROX	BHQ2

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер; Pr – флуоресцентная метка.

Таблица 2 – набор специфических праймеров для *C.parapsilosis* и *C.guilliermondii*.

№	Название олигонуклеотидов	К-во, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотидов, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
1	<i>Candida parapsil</i> F	1	AACGACGAACAGTCGTACCC		
2	<i>Candida parapsil</i> R	1	ATCGTCAGCGATGTTTGCCA		
3	<i>Candida parapsil</i> Pr	1	AGGGCTCTCTTGAAAGATATTA	FAM	BHQ1
4	<i>Candida guillerm</i> F	1	GCACCTCCTGAACACCGTTA		
5	<i>Candida guillerm</i> R	1	GGGAACCAAGAGCCCAATCA		
6	<i>Candida guillerm</i> Pr	1	GGCATGGCCCAGATGGAGGA	HEX	BHQ1

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер; Pr – флуоресцентная метка.

Основными плесневыми микромицетами, вызывающими инвазивные мицелиальные микозы с поражением различных органов и тканей являются отдельные представители *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, Mucoraceae (Приложение 2). Наборы подобранных к применению праймеров приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – набор специфических праймеров для *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* и Mucoraceae.

№	Название олигонуклеотидов	К-во, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотидов, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
1	Pan <i>Fusarium</i> F	1	TGAAATCTGGCTCTCGGGCC		
2	Pan <i>Fusarium</i> R	1	GCAGCATTCCCAAACACTACTCG		
3	Pan <i>Fusarium</i> Pr	1	ACGGGACGCCATAGAGGGTG	ROX	BHQ2
4	Pan Mucoraceae F	1	TTACCRTGAGCAAATCAGARTG		
5	Pan Mucoraceae R	1	AATCYAAGAATTTACCTCTAGCG		
6	Pan Mucoraceae Pr	1	TTAGCATGGGATAACGGAATACGAC	HEX	BHQ1
7	Pan <i>Aspergillus</i> F	1	GTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTG		
8	Pan <i>Aspergillus</i> R	1	TCTAAGGGCATCACAGACCTGTT		
9	Pan <i>Aspergillus</i> Pr	1	CGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCG	FAM	BHQ1

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер; Pr – флуоресцентная метка.

Таблица 4 – набор специфических праймеров для *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*.

№	Название олигонуклеотидов	К-во, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотидов, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
1	<i>Asp. fumig.</i> F	1	TTACACGGAAGGCGCCG		
2	<i>Asp. fumig.</i> R	1	GGATGGCAGGACCGAGAAT		
3	<i>Asp. fumig</i> Pr	1	ATTCTCTGGGCGGCGGAAC	ROX	BHQ2
4	<i>Asp. flavus</i> F	1	TCAAGCGCGGAAATAACT		
5	<i>Asp. flavus</i> R	1	CGTATCTTCGAGATCAAAAGAGTT		
6	<i>Asp. flavus</i> Pr	1	TACGGAAGGTGCTGAATTGGTT	HEX	BHQ1
7	<i>Asp. niger</i> F	1	GCCGGAGACCCCAACAC		
8	<i>Asp. niger</i> R	1	TGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATT		
9	<i>Asp. niger</i> Pr	1	AATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAG	FAM	BHQ1

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер; Pr – флуоресцентная метка.

Этапы проведения исследования:

1. Экстракция ДНК из различных видов биологического материала, используя соответствующие системы выделения нуклеиновых кислот.

2. Приготовление, используя указанные в таблицах 1 – 4 праймеры, праймерных смесей (таблица 5), содержащих, наряду с прямыми и обратными праймерами, флюоресцентные метки, специфические для каждого вида наиболее актуальных (часто выявляемых) дрожжевых микромицет рода *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*), плесневых микромицет Мисогасеае, микромицет рода *Aspergillus spp.* *Fusarium spp.*, а также отдельных видов аспергилл (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*).

Таблица 5 – Состав праймерной смеси (микса)

Наименование компонента	Количество
Прямой праймер (100 пМ/мкл)	3 мкл
Обратный праймер (100 пМ/мкл)	3 мкл
Флюоресцентная метка (100 пМ/мкл)	2 мкл
Дистиллированная вода стерильная	42 мкл

Примечание: праймеры для семейства Мисогасеае разводятся до концентрации 10 пМ/мкл и н вносятся непосредственно в реакционную смесь без предварительного объединения в составе праймерной смеси.

3. Приготовление комплексных (мультипраймерных) реакционных смесей путем объединения указанных в таблицах 6 – 9 компонентов, без добавления анализируемой ДНК, исходя из рабочего объема смеси в 20 мкл на одну пробу. При исследовании нескольких ДНК-содержащих образцов конечный объем реакционной смеси рассчитывается из расчета плюс одна проба.

Таблица 6 – Состав комплексной реакционной мультипраймерной смеси №1 для постановки ПЦР в режиме «реального времени» для выявления микромицет *Candida albicans* (FAM), *Candida krusei* (HEX) и *Candida glabrata* (ROX):

Наименование компонента	Количество
МастерМикс	12,5 мкл
Микс <i>Candida albicans</i>	1,5 мкл
Микс <i>Candida glabrata</i>	1,5 мкл
Микс <i>Candida krusei</i>	1,5 мкл
Дистиллированная вода стерильная	3 мкл

Таблица 7 – Состав комплексной мультипраймерной реакционной смеси №2 для постановки ПЦР в режиме «реального времени» для выявления микромицет *Candida parapsilosis* (FAM), *Candida guilermundii* (HEX)

Наименование компонента	Количество
МастерМикс	12,5 мкл
Микс <i>Candida parapsilosis</i>	1,5 мкл
Микс <i>Candida guilermundii</i>	1,5 мкл
Дистиллированная вода стерильная	4,5 мкл

Таблица 8 – Состав комплексной мультипраймерной реакционной смеси №3 для постановки ПЦР в режиме «реального времени» для выявления микромицет *Aspergillus spp.* (FAM), *Fusarium spp.* (ROX), Mucoraceae (HEX)

Наименование компонента	Количество
МастерМикс	12,5 мкл
Микс <i>Aspergillus spp.</i>	1,5 мкл
Микс <i>Fusarium spp.</i>	1,5 мкл
Mucoraceae forward 10пМ/мкл	1 мкл
Mucoraceae reverse 10пМ/мкл	1 мкл
Mucoraceae probe 10пМ/мкл	0,5 мкл
Дистиллированная вода стерильная	2 мкл

Таблица 9 – Состав комплексной мультипраймерной реакционной смеси №4 для постановки ПЦР в режиме «реального времени» для выявления микромицет *Aspergillus fumigatus* (FAM), *Aspergillus flavus* (HEX), *Aspergillus niger* (ROX)

Компонент	Количество
МастерМикс	12,5 мкл
Микс <i>Aspergillus fumigatus</i>	1,5 мкл
Микс <i>Aspergillus flavus</i>	2 мкл
Микс <i>Aspergillus niger</i>	1 мкл
Дистиллированная вода стерильная	3 мкл

3. Приготовление рабочей смеси исследуемых образцов и реакционных смесей. В каждую отдельную ПЦР-микропробирку вносится по 18 мкл готовой реакционной смеси с последующим добавлением 2 мкл анализируемой ДНК. Все образцы для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов вносятся в дублях. В пробирку с отрицательным контролем добавляется 2 мкл дистиллированной воды. В пробирку с положительным контролем внести 2 мкл соответствующей смеси ДНК эталонных или госпитальных музейных штаммов соответствующих дрожжевых либо плесневых микромицет, предварительно подтвержденных микробиологическими, масс-спектрометрическими или молекулярно-генетическими методами идентификации.

4. Полученная смесь исследуемых и реакционных компонентов аккуратно перемешивается в ручном режиме, избегая образования пузырьков воздуха, и центрифугируется в течение 5 – 10 секунд при центробежном ускорении 3000 оборотах в минуту (RPM). В термоциклер вводятся нижеуказанные программы с техническими условиями проведения ПЦР для идентификации дрожжевых и плесневых микромицет (таблицы 10 и 11).

5. Учет и интерпретация результатов реакции проводится по

каналам (FAM, HEX, ROX) согласно параметрам, указанным в таблице 12.

6. Заключение об идентификации микромицет в исследованном биоматериале.

Перечень возможных ошибок при применении метода и пути их устранения указаны в таблице 13.

Таблица 10 – технические условия проведения ПЦР в режиме «реального времени» для идентификации дрожжевых микромицет

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 минут	1
Денатурация	95	15 секунд	40 – 45 циклов с фиксацией флуоресценции на стадии отжига/элонгации праймеров
Отжиг/элонгация	60	1 минута	

Таблица 11 – технические условия проведения ПЦР в режиме «реального времени» для идентификации плесневых микромицет

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	13 минут	1
Денатурация	95	13 секунд	40 – 45 циклов с фиксацией флуоресценции на стадии отжига праймеров
Отжиг	61	30 секунд	
Элонгация	72	15 секунд	

Таблица 12 – Интерпретация результатов ПЦР в

режиме «реального времени» для дрожжевых и плесневых микромицет

Наименование	Каналы детекции	Интерпретация результатов
Образцы ДНК микромицет в дублях	FAM, HEX, ROX,	<p>Положительный результат – регистрация восходящей кривой флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу детекции.</p> <p>Отрицательный результат – отсутствие флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу детекции.</p>
Положительный контроль в дубле		<p>Достоверность результатов исследования – регистрация восходящей кривой флуоресцентного сигнала по использованным каналам детекции.</p> <p>В обратном случае – результат не достоверен.</p>
Отрицательный контроль в дубле		<p>Достоверность результатов исследования – отсутствие флуоресцентного сигнала по всем каналам детекции.</p> <p>В обратном случае – результат не достоверен.</p>

Примечание: каналы детекции соответствуют флуоресцентным меткам вышеуказанных реакционных смесей.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕТОДА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Таблица 13 – Перечень ошибок, причины и пути их устранения

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложно-положительные результаты	Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Соблюдение принципов зонирования лаборатории; 2. Использование спецодежды (стерильные перчатки, халат, бахилы, шапочка); 3. Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов; 4. Использование отрицательных контрольных образцов в каждой серии исследований. Проведение исследования в дублях.
Ложно-отрицательные результаты	Разрушение ДНК в положительном контроле и/или образцах. Инактивация полимеразы, разрушение праймеров или флуоресцентной пробы	<ol style="list-style-type: none"> 1. Повторное выделение ДНК из образцов с исключением попадания в образец веществ способных ингибировать ПЦР; 2. Соблюдение правил хранения и транспортировки реагентов; 3. Использование альтернативных реагентов и праймеров для постановки ПЦР.

Приложение 1. Частота выявления дрожжевых микромицет у детей с инфекционными осложнениями на фоне онкогематологической патологии за период с 2002 по 2023 годы

№ п/п	Наименование микромицет	Наименование биоматериала						Всего	
		Кровь		БАЛ и ТБД		Моча****		К-во	%
		К-во	%	К-во	%	К-во	%		
1	<i>Candida albicans</i>	30	14,93	86	43,65	25	24,76	141	28,26
2	<i>Candida guilliermondii</i> *	48	23,88	10	5,08	17	16,83	75	15,03
3	<i>Candida parapsilosis</i>	52	25,87	19	9,64	8	7,92	79	15,84
4	<i>Candida glabrata</i> **	8	3,98	21	10,66	27	26,73	56	11,22
5	<i>Candida krusei</i> ***	16	7,96	17	8,63	8	7,92	41	8,22
6	<i>Candida tropicalis</i>	4	1,99	3	1,52	1	0,99	8	1,60
7	<i>Candida pelliculosa</i>	10	4,98	-	0,00	-	0,0	10	2,00
8	<i>Candida famata</i>	5	2,49	5	2,54	1	0,99	11	2,20
9	<i>Candida lusitanae</i>	4	1,99	9	4,57	1	0,99	14	2,81
10	<i>Candida kefyr</i>	-	0,00	5	2,54	-	0,0	5	1,00
11	<i>Candida norvegensis</i>	-	0,00	1	0,51	-	0,0	1	0,20
12	<i>Candida orthopsilosis</i>	-	0,00	1	0,51	-	0,0	1	0,20
13	<i>Candida inconspicua</i>	-	0,00	2	1,01	-	0,0	2	0,40
14	<i>Candida auris</i>	-	0,00	1	0,51	-	0,0	1	0,20
15	<i>Canida lipolitica</i>	1	0,50	-	0,00	-	0,0	1	0,20
16	<i>Candida caliculosa</i>	1	0,50	-	0,00	-	0,0	1	0,20
17	<i>Candida magnoliae</i>	2	0,99	-	0,00	-	0,0	2	0,40
18	<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	0,50	1	0,51	-	0,0	2	0,40
19	<i>Candida haemulonii</i>	-	0,00	-	0,00	1	0,99	1	0,20
20	<i>Candida spp.</i>	-	0,00	10	5,08	9	8,91	19	3,81
21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	2,98	6	3,04	1	0,99	13	2,61
22	<i>Rhodoturola mucilaginosa</i>	1	0,50	-	0,00	-	0,0	1	0,20
23	<i>Malassezia furfur</i>	2	0,99	-	0,00	-	0,0	2	0,40
24	<i>Cryptococcus spp.</i>	4	1,99	-	0,00	-	0,0	4	0,80
25	<i>Trichosporon spp.</i>	6	2,98	-	0,00	2	1,98	8	1,60
26	Всего	201	100,0	197	100,0	101	100,0	499	100,0

Примечание: * *Candida guilliermondii* – синоним *Myerozoma guilliermondii*

** *Candida glabrata* – синоним *Nakaseomyces glabratus*

*** *Candida krusei* – синоним *Pichia kudriavzevii*

**** Содержание микромицет в моче более 1000 КОЕ/мл

Приложение 2. Частота выявления плесневых микромицет у детей с инфекционными осложнениями на фоне онкогематологической патологии за период с 2002 по 2023 годы

№ п/п	Наименование микромицет	Наименование биоматериала						Всего	
		Кровь		БАЛ и ТБД		Моча*		К-во	%
		К-во	%	К-во	%	К-во	%		
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	0,0	31	36,05	-	0,0	31	25,62
2	<i>Aspergillus flavus</i>	-	0,0	14	16,28	-	0,0	14	11,57
3	<i>Aspergillus niger</i>	-	0,0	6	6,98	-	0,0	6	4,95
4	<i>Aspergillus sydowii</i>	-	0,0	2	2,33	-	0,0	2	1,65
5	<i>Aspergillus nidulans</i>	-	0,0	1	1,16	-	0,0	1	0,83
6	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	0,0	1	1,16	-	0,0	1	0,83
7	<i>Aspergillus spp.</i>	1	5,0	4	4,65	-	0,0	5	4,13
8	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	0,0	-	0,0	5	33,33	5	4,13
9	<i>Fusarium solani</i>	7	35,0	-	0,0	3	20,0	10	8,26
10	<i>Fusarium dimerum</i>	2	10,0	-	0,0	1	6,67	3	2,48
11	<i>Fusarium chamydosporum</i>	-	0,0	-	0,0	1	6,67	1	0,83
12	<i>Fusarium proliferatum</i>	-	0,0	-	0,0	1	6,67	1	0,83
13	<i>Fusarium spp.</i>	-	0,0	-	0,0	1	6,67	1	0,83
14	<i>Rhizopus spp.</i>	1	5,0	5	5,81	-	0,0	6	4,95
15	<i>Mucor spp.</i>	1	5,0	6	6,98	1	6,67	8	6,61
16	<i>Rhizomucor spp.</i>	-	0,0	1	1,16	-	0,0	1	0,83
17	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	-	0,0	1	1,16	-	0,0	1	0,83
18	<i>Paecilomyces variotii</i>	-	0,0	2	2,33	-	0,0	2	1,65
19	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	0,0	1	1,16	-	0,0	1	0,83
20	<i>Penicillium spp.</i>	-	0,0	5	5,81	2	13,32	7	5,79
21	<i>Trichophyton spp.</i>	-	0,0	1	1,16	-	0,0	1	0,83
22	<i>Scedosporium apiserpium</i>	-	0,0	2	2,33	-	0,0	2	1,65
23	<i>Epidermophyton spp.</i>	1	5,0	-	0,0	-	0,0	1	0,83
24	<i>Geotrichum capitatum</i>	2	10,0	-	0,0	-	0,0	2	1,65
25	Недифференцир. плесень	5	25,0	3	3,49	-	0,0	8	6,61
26	Всего	20	100,0	86	100,0	15	100,0	121	100,0

Примечание: * Содержание микромицет в моче более 1000 КОЕ/мл