

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393136** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.07.31

(51) Int. Cl. **G01N 33/53 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки
2023.12.06

(54) **СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ИНВАЗИВНОГО КАНДИДОЗА И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЕГО ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

(31) **2022135395**

(32) **2022.12.30**

(33) **RU**

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "СЕВЕРО-
ЗАПАДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.И. МЕЧНИКОВА"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

(72) Изобретатель:

**Тараскина Анастасия Евгеньевна,
Гольцева Ирина Сергеевна, Оганесян
Эллина Григорьевна, Васильева
Наталья Всеволодовна (RU)**

(74) Представитель:

Кашина Н.И. (RU)

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и молекулярной генетики и может быть использовано в медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической лабораторной диагностике для диагностики инвазивного кандидоза. Способ диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени включает две мультиплексные реакции на базе уникального набора праймеров и зондов. Технический результат состоит в обеспечении возможности точной диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

A2

202393136

202393136

A2

Способ диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

Изобретение относится к области биотехнологии и молекулярной генетики, и может быть использовано в медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической лабораторной диагностике для диагностики инвазивного кандидоза (ИК), вызванного актуальными возбудителями - *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris*, их видовой идентификации, эпидемиологического расследования внутрибольничных вспышек ИК, решения научно-исследовательских задач по мониторингу и изучению свойств дрожжевых патогенов. В дальнейшем изобретение предполагается к внедрению в лечебно-диагностическую практику клинических микробиологических лабораторий, при обследовании пациентов отделений интенсивной терапии, в том числе COVID-центров, а также отделений онкологии, гематологии и трансплантологии и др.

За последние два десятилетия инфекционные заболевания, обусловленные микроскопическими грибами, стали важной проблемой здравоохранения. Миллионы людей (более 300 млн.) страдают тяжелыми острыми или хроническими грибковыми инфекциями [1-5]. Внедрение в практику новых медицинских технологий (трансплантации органов и тканей, высокодозной цитостатической и иммуносупрессивной терапии и пр.) наряду с пандемией ВИЧ/СПИД и COVID-19 привело к увеличению частоты микотических поражений, при этом инвазивные микозы характеризуются тяжестью клинических проявлений и очень высокой летальностью. По данным Всемирного фонда борьбы с грибковыми инфекциями (GAFFI) инвазивные грибковые инфекции являются причиной более 1,5 миллионов летальных исходов в год [6-8], что сопоставимо с летальностью от туберкулеза и в четыре раза превышает летальность от малярии. Проблему усугубляет новый фактор развития инвазивных микозов – COVID-19. Установлено, что у больных тяжелой формой COVID-19 на фоне выраженного нарушения местного и системного иммунитета, обусловленного как самой вирусной инфекцией, так и применением глюкокортикостероидов и иммуносупрессоров, могут также возникать тяжелые грибковые инфекции (инвазивный кандидоз, аспергиллез, мукоморикоз).

Наиболее частыми возбудителями грибковых инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются грибы рода *Candida*. Инвазивный кандидоз (ИК) – самый распространенный внутрибольничный микоз. Ежегодно в мире регистрируется более 400000 случаев ИК. Распространенность ИК составляет от 2,4 – 29 / 100000

населения в год. По данным многоцентровых исследований, частота развития ИК в стационарах различных стран составляет от 0,33 до 24 случаев на 1000 госпитализированных. В РФ внутрибольничный ИК в многопрофильном стационаре встречается с частотой 0,3 на 1000 госпитализированных больных, в отделениях реанимации и интенсивной терапии – 2,6 на 1000 [9-11].

Методы идентификации на основе культуральных технологий до недавних пор были золотым стандартом диагностики грибковой инфекции, но, к сожалению, требуют не только много времени и трудозатрат, но и допускают ошибочную идентификацию. Проблемы в диагностике инфекций кровотока в ОРИТ и ХОРИТ приводят к необоснованному применению антибиотиков (вместо антимикотиков) у больных ИК, что способствует не только высокой летальности при инвазивных микозах, но и нарастанию бремени антибактериальной резистентности [12].

В настоящее время молекулярные технологии, такие как ИФА и ПЦР в реальном времени (с коротким временем проведения анализа), представляют альтернативные методы культуральной диагностики микотической инфекции. В таблице 1 приведена сравнительная характеристика некультуральных диагностических тестов, используемых для постановки диагноза «кандидемия» и других типов инвазивных кандидозов [13].

Таблица 1 – Использование некультуральных тестов для диагностики инвазивного кандидоза [модифицировано по Clancy C.J., Nguyen M.H., 2018]

Подход	Используемая тест-система	Изучаемые группы пациентов	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Определение маннана-антиманнана	PLATELIA™ Candida Ab/Ag PLUS, Bio-Rad, США	с интраабдоминальным кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК	40	67
Непрямой иммунофлуоресцентный метод определения антител к маннопротеину	Candida sp. IFA Ig G; Vircell Laboratories, Испания	с интраабдоминальным или урологическим кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК и здоровые лица	73	54
Определение 1,3-β-D-глюкана	Fungitell STAT® Assay	с интраабдоминальным кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК	56	73
		с интраабдоминальным кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК	65	78
		с интраабдоминальным или урологическим	64	83

		кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК и здоровые лица		
ПЦР в реальном времени	Candida real-time PCR panel1	с интраабдоминальным кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК	88	70
	Multiplex Candida real-time PCR2	с интраабдоминальным или урологическим кандидозом vs ОРИТ с факторами риска ИК и здоровые лица	91	97

¹ *Candida* real-time PCR panel Компании Viracor Eurofins (США) определяет виды *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, и *C. krusei*.

² Multiplex *Candida* real-time PCR Испанского Национального Микробиологического центра Госпиталя Рамона и Кахала (Мадрид, Испания) определяет виды *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. guilliermondii*.

Несмотря на самую высокую чувствительность и специфичность ПЦР-тестов среди некультуральных методов диагностики, повышение их чувствительности и специфичности необходимо. В настоящее время не существует ни одного мультиплексного диагностикума на основе ПЦР, одобренного FDA (управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США), но коммерческие «домашние» тест-системы и структуры праймеров, применяемые для научных исследований, широко доступны.

Ниже приведены аналоги, представляющие собой методы диагностики микозов, вызванных дрожжевыми патогенами, на основе ПЦР.

Известен патент РФ № RU 2510856 (опубл. 10.04.2014) «Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления ДНК пародонтопатогенного микроорганизма *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции».

Известен патент РФ № RU 2663454 (опубл. 06.08.2018) «Набор синтетических олигонуклеотидов для количественного определения ДНК возбудителей вульвовагинального кандидоза в слизистой оболочке влагалища».

Известен патент РФ № RU 2676099 (опубл. 26.12.2018) «Способ идентификации дрожжей рода *Pichia* на основе ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зонда».

Известен способ диагностики с использованием набора "АмплиСенс® *Candida albicans*-FL" с детекцией в режиме "реального времени" ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия). Позволяет определять вид *C. albicans*.

Известен способ диагностики с использованием ПЦР-панели в реальном времени Candida Компании Viracor Eurofins (США). Позволяет определять виды *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, и *C. krusei*. Анализ не предлагается на коммерческой основе.

Известен способ диагностики с использованием мультиплексной ПЦР в реальном времени Candida Испанского Национального Микробиологического центра Госпиталя Рамона и Кахала (Мадрид, Испания). Позволяет определять виды *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. guilliermondii*.

Известен способ диагностики с использованием ПЦР-теста «YEAST PANEL multiplex PCR assays» Института грибного биоразнообразия имени Вестердейк (Нидерланды). Позволяет определять 21 вид клинически важных дрожжей *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Geotrichum* в ходе трехмультиплексных реакций с электрофоретической детекцией [14].

Известен способ диагностики с использованием ПЦР тест-системы в реальном времени для идентификации клинических изолятов *Candida spp.* на основе анализа кривых плавления с высоким разрешением Университет медицинских наук Кермана (Иран). Позволяет определять 8 видов (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. albicans*, *C. lusitaniae*) [15].

Известен способ диагностики с использованием ПЦР тест-системы в реальном времени для идентификации клинических изолятов *Candida spp.* на основе анализа кривых плавления с высоким разрешением Центр оценки и биологических исследований (FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США), США). Позволяет определять 8 видов (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C. lusitaniae*) [16].

Однако большинство опубликованных наборов праймеров для ПЦР, как и зарегистрированных тест-систем либо не являются видоспецифичными для грибов рода *Candida*, либо разработаны исключительно для диагностики инфекции, вызываемой *Candida albicans* [17-20]. Количество мультиплексных диагностикумов, присутствующих на современном рынке, ограничено, интерпретация получаемых результатов затруднена, осложняется неоднородностью анализов и дизайнов исследования, зачастую достаточна сложна (требует большого количества проставляемых контролей в случае анализа кривых плавления с использованием красителя SYBR Green для дифференциации видов) и исполнение тестов трудозатратно (из-за большого количества отдельных реакций проставляемых в рамках одного теста возможно допущение ошибок) и требует высокой квалификации персонала [14-16, 21].

В настоящее время нет ни одного ПЦР-теста, который был бы валидирован для диагностики инвазивного кандидоза в многоцентровых исследованиях, и нет убедительных доказательств преимущества какого-либо коммерческого теста, несмотря на несомненный потенциал ПЦР-диагностики микозов даже по сравнению с тестами дающими 100% идентификацию (MALDI-TOFF масс-спектрометрия и таргетное секвенирование рДНК) за счет сокращения времени исполнения и стоимости проводимого исследования. Кроме того, поскольку этиология микозов может иметь географические особенности и отличаться между медицинскими центрами, тест-системы, используемые в клинических лабораториях, должны учитывать локальные эпидемиологические данные.

Наиболее близким аналогом заявляемого изобретения является способ диагностики инвазивного кандидоза с использованием мультиплексного диагностикума на основе ПЦР – набора реагентов для выявления и типирования возбудителей грибковых инфекций рода *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* и *Debaryomyces* методом ПЦР в реальном времени (МИКОЗОСКРИН) ООО "ДНК-Технология" [23]. Заявленный способ диагностики имеет регистрационное удостоверение и предназначен для выявления и типирования возбудителей грибковых инфекций рода *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* и *Debaryomyces*: *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii* (*C.krusei*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae* (*C.lusitaniae*), *Debaryomyces hansenii* (*C.famata*), *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia* spp., *Kluyveromyces marxianus* (*C.kefyr*), *Malassezia furfur*.

К недостаткам ближайшего аналога можно отнести унификацию тестирования - предназначение для выявления и типирования широкого спектра дрожжевых грибов - возбудителей грибковых инфекций как поверхностных микозов (вульвовагинальный кандидоз, орофарингеальный, а также дерматозы, ассоциированные с дрожжевыми грибами), так и инвазивной инфекции - затрудняет процесс интерпретации результатов; отсутствие пан-грибковых или родо-специфичных диагностических конструкций в составе данного способа диагностики – возможность получения ложноотрицательных результатов (в случаях, если микоз вызван редким возбудителем); большое количество независимых реакционных смесей (комплекс из восьми пробирок) - повышает риск инструментальных ошибок, усложняет процесс диагностики; совместимость набора только с детектирующими амплификаторами фирмы ДНК-технология – ограничение возможностей пользователя.

Технической проблемой является необходимость разработки точного и простого в использовании способа диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его

основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, лишенной вышеприведенных недостатков.

Технический результат состоит в обеспечении возможности точной диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Технический результат достигается тем, что в способе диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени осуществляют две мультиплексные реакции, причем используют ПЦР-смесь I реакции со следующим составом: в объеме 50 мкл содержится 50 нг ДНК, 2,5мМ MgCl₂, 75мМ Tris-HCl с рН 8,8, 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы, а также пять пар праймеров и пять зондов по 40 fM каждого за исключением диагностической конструкции для *S.aureus*, содержащейся в объеме 20 fM), со следующими нуклеотидными последовательностями:

<i>C. auris_F</i>	CAGACGTGAATCATCGAATCT (SEQ:NO1)
<i>C. auris_R</i>	TTTCGTGCAAGCTGTAATTT (SEQ:NO2)
<i>C. auris_Proba</i>	FAM-AATCTTCGCGGTGGCGTTGCATTCA-RTQ1 (SEQ:NO3)
<i>C. guilliermondii_For</i>	AGTGCTGTCGACCTCTCAAT (SEQ:NO4)
<i>C. guilliermondii_Rev</i>	CCGGGCCAACAATACCAGA (SEQ:NO5)
<i>C. guilliermondii_Proba</i>	R6G-TCCAACCTCGTTGAATGGTGTGGC-BHQ1 (SEQ:NO6)
<i>C. glabrata_For</i>	GCGGCGGGGGTTAATACTG (SEQ:NO7)
<i>C. glabrata_Rev</i>	TTAAAGACGTCTGTCTGCCA (SEQ:NO8)
<i>C. glabrata_Proba</i>	ROX-ATAAGTGAGTGTTTTGTGCGTGC-RTQ2 (SEQ:NO9)
<i>C. tropicalis_For</i>	CTTAGGTTTATCCAAAACGCTT (SEQ:NO10)
<i>C. tropicalis_Rev</i>	CGGGTAGTCCTACCTGATTT (SEQ:NO11)
<i>C. tropicalis_Proba</i>	Cy5-TTGCTAGTGGCCACCACAATTTAT-BHQ3 (SEQ:NO12)
<i>Glob_For</i>	GTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCT (SEQ:NO13)
<i>Glob_Rev</i>	CCACATGCCAGTTTCTATTGGTCT (SEQ:NO14)
<i>Glob_Proba</i>	Cy5.5-ACCTCAACCAGACACCATGGTGCACCT-BHQ3 (SEQ:NO15)

кроме того, используют ПЦР-смесь II реакции со следующим составом: в объеме 50 мкл содержится 50 нг ДНК, 2,5мМ MgCl₂, 75мМ Tris-HCl с pH 8,8, 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы, четыре пары праймеров и четыре зонда по 40 fM каждого со следующими нуклеотидными последовательностями:

<i>C. parapsilosis</i> _For	GGTTTGGTGTGAGCGATACG (SEQ:NO16)
<i>C. parapsilosis</i> _Rev	TTTGAGTTTGTACCAATGAGTG (SEQ:NO17)
<i>C. parapsilosis</i> _Proba	FAM-GTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGT-RTQ1 (SEQ:NO18)
<i>C. albicans</i> _For	GGGTTTGCTTGAAAGACGGT (SEQ:NO19)
<i>C. albicans</i> _Rev	TTACCGCCGCAAGCAATGTT (SEQ:NO20)
<i>C. albicans</i> _Proba	R6G-GATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCT-BHQ1 (SEQ:NO21)
<i>C. krusei</i> _For	CTTGCGCGTGCGCAGAGTT (SEQ:NO22)
<i>C. krusei</i> _Rev	TAGTTCGCTCGGCCAGCTTC (SEQ:NO23)
<i>C. krusei</i> _Proba	ROX- CGGACGACGTGTAAAGAGCGTC-RTQ2 (SEQ:NO24)
Pan_Fun_For	CAACGGATCTCTTGGTTCT (SEQ:NO25)
Pan_Fun_Rev	GGCGCAATGTGCGTTCAAAG (SEQ:NO26)
Pan_Fun_Proba	Cy5-TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-BHQ3 (SEQ:NO27).

Спектр идентифицируемых микроскопических грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. auris*, наличие грибковой инфекции в общем (применение универсальных пангрибковых праймеров) – спектр возбудителей ИК, определяемых предлагаемым способом диагностики, является оптимальным, что упрощает и ускоряет проведения исследования, при этом, он включает все наиболее распространенные этиологические агенты ИК, встречающиеся на территории РФ, и микромицеты любой родовой принадлежности. В случае, если заболевание будет вызвано редким видом дрожжевого патогена или грибом другой родовой принадлежности, не включенным в диагностический профиль, то диагноз инвазивный микоз будет подтвержден с помощью универсальных пангрибковых праймеров.

Использование низкоспецифичных универсальных пангрибковых праймеров и зондов позволяет не только диагностировать инвазивный микоз, вызванный редким возбудителем, но и использовать данную диагностическую конструкцию в качестве

контроля выделения ДНК и прохождения реакции для идентификации основных возбудителей ИК при работе с культурами дрожжевых патогенов, полученными из стерильных в норме субстратов.

Точная диагностика инвазивного кандидоза обеспечивается за счет флуорогенных зондов Taq-Man при проведении ПЦР в реальном времени и мультиплицирования фрагментов-мишеней изучаемых грибов рода *Candida* в двух пробирках с использованием четырех и пяти пар олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов с не пересекаемыми спектральными зонами: FAM, VIC, ROX, Cy5 и Cy5.5), соответственно. Кроме видоспецифичных конструкций (прямой, обратный праймер и Taq-Man зонд), необходимых для видовой идентификации, в реакции были использованы олигонуклеотидные последовательности специфичные для гена β -глобина человека Glob – в качестве эндогенного контроля реакции при работе с биосубстратами, и пан-грибковая конструкция, которая работала и как эндогенный контроль реакции при работе с культурами дрожжевых грибов, и как маркер ИК, вызванного другими видами дрожжевых грибов, при анализе клинического материала.

При разработке заявляемого способа диагностики ИК первоначально был проведен биоинформационный анализ варибельных участков генома актуальных возбудителей инвазивного кандидоза - *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris*, обладающих уникальной последовательностью, позволяющей проводить межвидовую дискриминацию. Среди отобранных нами последовательностей-мишеней по мировым литературным данным наиболее часто используемой последовательностью является ядерная рибосомная ДНК (рДНК), поскольку (1) ITS1 и ITS2 регионы рДНК обладают высокими межвидовыми вариациями; (2) она присутствует в геноме грибов в виде тандемно повторяющихся копий, что обеспечивает большое количество изучаемой матрицы. На основании этих данных в качестве «мишени» определения вида возбудителей инвазивного кандидоза был использован ITS2 регион рибосомальных генов. Целевые локусы геномов дрожжевых грибов для дизайна праймеров были взяты из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), и затем сопоставлены с полученными в ходе работы нуклеотидными последовательностями. Праймеры первоначально были подобраны с помощью программного пакета Vector NTI 10, позволяющего автоматически рассчитывать температуру плавления (T_m), GC-состав (GC%) и степень комплементарности по 3' концу. Вторым этапом был отбор более оптимальных наборов олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченного зонда на основании следующих критериев:

1. Видоспецифичные праймеры не должны давать перекрестную реакцию с другими видами грибов,
2. Совместимость размеров ампликонов одного целевого вида с остальными целевыми видами для проведения мультиплексной ПЦР,
3. Совместимость праймеров по температуре плавления в рамках одной мультиплексной реакции;
4. Расположение праймеров в наиболее стабильном сегменте целевых локусов,
5. Высокая комплементарность по 3` региону (для предотвращения перекрестных реакций с нецелевыми областями геномов).

Затем эмперическим путем были определены для каждого анализируемого вида дрожжевых грибов комбинации из олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченного зонда, обладающие наибольшей аналитической чувствительностью и 100-% специфичностью на панели тестируемых образцов.

С использованием положительных контролей для каждого вида изучаемых дрожжевых патогенов эмперическим путем подобрана оптимальная температура отжига диагностических конструкций, которая отличалась от теоретической, рассчитанной с использованием компьютерных программ. Также эмперическим путем установлена аналитическая чувствительность заявляемого способа диагностики ИК и идентификации его ключевых возбудителей. Используемые диагностические конструкции обладают 100%-ной специфичностью на панели отрицательных образцов, не имеют гомологии и не взаимодействуют с геномной ДНК человека.

Таким образом, из приведенных доводов заявителя следует, что заявленный способ диагностики ИК и идентификации его основных возбудителей методом ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов соответствует критерию «изобретательский уровень».

Способ диагностики ИК и идентификации его ключевых возбудителей осуществляют в три лабораторных этапа:

1. Выделение ДНК из культур дрожжевых патогенов, возбудителей ИК, или биологического материала стерильных в норме субстратов;
2. Проведение мультиплексной ПЦР;
3. Анализ и интерпретация результатов.

Материалы и реактивы. В работе были использованы следующие материалы и реактивы: 25Мм MgCl₂ (НПК «Синтол», Россия), 2,5Мм дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) (НПК «Синтол», Россия), Taq ДНК-полимераза (New England BioLabs, США).

Штаммы грибов, возбудителей инвазивного кандидоза. В качестве положительных контролей были использованы клинические изоляты грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris*) из Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, выделенные из стерильных в норме биосубстратов пациентов с подозрением на ИК, с экспертно подтвержденной методами MALDI-TOF-MS (Autoflex, Bruker Daltonics) и таргетного ДНК-секвенирования видовой принадлежностью. В работе использовали агаризованную питательную среду Сабуро с хлорамфениколом. Культивирование штаммов грибов рода *Candida* проводили при температуре 37 °С в течение 18-24 ч.

Выделение ДНК возбудителей инвазивного кандидоза. ДНК, используемую в качестве матрицы для постановки реакции, выделяли из биологического материала стерильных в норме субстратов и культур грибов рода *Candida* с помощью солевого метода [22] и коммерческого набора Monarch® Genomic DNA purification Kit (New England BioLabs, США), соответственно. Концентрацию измеряли с помощью флуориметра Qubit 4.0 и коммерческого набора для количественной оценки ДНК Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Рабочая концентрация образцов ДНК, выделенных из культур грибов рода *Candida*, достигалась путем разведения и составляла 10 нг ДНК/мкл. Количество копий генома рассчитывали с помощью формулы:

Количество копий генома = (количество ДНК [нг] * 6.022 x 10²³) / (длина генома [п.о.] * 1 x 10⁹ * 650),

Расчёты производились исходя, что размер генома для *C. albicans* составляет 14.69 Mb, *C. krusei* – 10.92 Mb, *C. glabrata* – 12.51 Mb, *C. tropicalis* – 14.61 Mb, *C. parapsilosis* – 13.03 Mb, *C. guilliermondii* - 10.64 Mb и *C. auris* – 12.37 Mb.

Проведение мультиплексной ПЦР. Способ осуществляют с использованием амплификаторов Rotor Gene 6000 (“Corbett Research”, Австралия), CFX96 (“BioRad”, США) и ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия) в ходе двух мультиплексных реакций.

Состав ПЦР-смеси I реакции: в объеме 50 мкл содержится 50 нг ДНК, 2,5мМ MgCl₂, 75мМ Tris-HCl (pH 8,8), 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (New England BioLabs, США), пять пар праймеров и зондов (НПК «Синтол», Россия) по 40 fM каждого (исключение - диагностическая конструкция для *C. auris* - 20 fM) со следующими нуклеотидными последовательностями:

<i>C. auris</i> _F	CAGACGTGAATCATCGAATCT
<i>C. auris</i> _R	TTTCGTGCAAGCTGTAATTT

C. auris_Proba	FAM-AATCTTCGCGGTGGCGTTGCATTCA-RTQ1
C. guilliermondii_For	agtgctgtcgacctctcaat
C. guilliermondii_Rev	ccgggccaacaataaccaga
C. guilliermondii_Proba	R6G-tccaactcgttgaatgggtggc-BHQ1-
C. glabrata_For	gcggcgggggttaataactg
C. glabrata_Rev	ttaaagacgtctgtctgccca
C. glabrata_Proba	ROX-ataagtgagtgtttgtgcgtgc-RTQ2
C. tropicalis_For	CTTAGGTTTATCCAAAAACGCTT
C. tropicalis_Rev	cgggtagtctacctgatt
C. tropicalis_Proba	Cy5-TTGCTAGTGGCCACCACAATTTAT-BHQ3
Glob_For	gtcagggcagagccatctaTTgct
Glob_Rev	ccacatgccagtttctattggtct
Glob_Proba	Cy5.5-acctcaaccagacaccatggtgcacct-BHQ3

Состав ПЦР-смеси II реакции: в объеме 50 мкл содержится 50 нг ДНК, 2,5мМ MgCl₂, 75мМ Tris-HCl (pH 8,8), 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (New England BioLabs, США), пять пар праймеров и зондов (НПК «Синтол», Россия) по 40 fM каждого со следующими нуклеотидными последовательностями:

C. parapsilosis_For	ggtttggtttgagcgatacg
C. parapsilosis_Rev	tttgagttgtaccaatgagtg
C. parapsilosis_Proba	FAM-gtttgcttgaagaaaggcggagt-RTQ1
C. albicans_For	gggtttgcttgaagacggt
C. albicans_Rev	ttaccgccgaagcaatggt
C. albicans_Proba	R6G-gatcgcttgacaatggcttaggtct-BHQ1
C. krusei_For	CTTGCGCGTGCGCAGAGTT
C. krusei_Rev	tagttcgctcgccagcttc
C. krusei_Proba	ROX- CGGACGACGTGTAAGAGCGTC-RTQ2
Pan_Fun_For	caacggatctcttgggtct
Pan_Fun_Rev	GGCGCAATGTGCGTTCAAAG
Pan_Fun_Proba	Cy5-tgaagaacgcagcgaatgcgata-BHQ3

Для двух мультиплексных реакций был подобран единый оптимальный режим амплификации (таблица 2):

Таблица 2. Программа проведения ПЦР в реальном времени.

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
95	05:00	1
95	00:30	35
55	00:30	
72	00:30	
72	07:00	1
4	∞	хранение

Анализ и интерпретация результатов.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции (характерной сигмовидной формы) для каждого из 5 используемых каналов флуоресцентной детекции пороговой линии (таблица 3).

Анализ данных для ПЦР-смеси I и II следует проводить индивидуально, выделив область лунок, относящихся к анализируемому комплекту реагентов (ПЦР-смеси).

Таблица 3. Соответствие наименованию ПЦР-смеси и каналов детекции возбудителей ИК

№ ПЦР-смеси	Канал детекции флуорофора	FAM	HEX	ROX	Cy5	Cy5.5
I	ДНК-мишень	ДНК <i>C. auris</i>	ДНК <i>C. guilliermondii</i>	ДНК <i>C. glabrata</i>	ДНК <i>C. tropicalis</i>	ДНК человека
	Область амплификации	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	ген <i>Glob</i>
II	ДНК-мишень	ДНК <i>C. parapsilosis</i>	ДНК <i>C. albicans</i>	ДНК <i>C. krusei</i>	ДНК	-
	Область амплификации	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>ITS-2</i>	<i>5.8S</i>	

Принцип интерпретации результатов следующий:

-ДНК возбудителей ИК обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая

флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- ДНК возбудителей ИК не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение порогового цикла C_t

- результат анализа считается невалидным, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла по соответствующему каналу детекции возбудителей ИК (см. табл. 3). И по каналу значение также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и результатов по гену *Glob* (контроль экстракции ДНК из биологического материала) и фрагменту 5.8S рибосомальной ДНК грибов (контроль экстракции ДНК из культур микромицетов).

Диагностические конструкции (праймеры и флуорогенные зонды), используемые в заявляемом способе диагностике инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей обладают уникальными последовательностями (исключение составляют олигонуклеотидные последовательности, используемые для идентификации *S. aureus* и гена *Glob*, заимствованные из литературных источников [24, 25]). Предлагаемые диагностические конструкции никогда не использовались вместе в мультиплексных реакциях. Основной задачей при подборе комплекса праймеров и флуорогенных зондов было проведение нескольких независимых ПЦР в одной пробирке, с целью одновременной идентификации всех распространенных в РФ этиологических агентов ИК. Решение данной задачи позволяет уменьшить в лаборатории затраты труда и времени на проведение анализа и повысить экономическую эффективность метода.

Заявленный способ подтверждается примерами.

Пример 1. Оценка аналитической специфичности способа диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей

Аналитическая специфичность заявляемого способа диагностики была оценена на ДНК микроскопических грибов, депонированных в Российскую коллекцию патогенных грибов (НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина), в концентрации 60 нг ДНК/реакцию (около 5×10^6 копии/реакция). Было протестировано по 10 штаммов

каждого из детектируемых/идентифицируемых данным способом диагностики видов грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris* и 20 штаммов других видов грибов, потенциальных патогенов человека: *Nannizzia persicolor*, *Arthroderma gertleri*, *Trichophyton simii*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton rubrum*, *Lophophyton gallinae*, *Sarocladium kiliense*, *Corallomycesella repens*, *Nannizzia incurvata*, *Arthroderma phaseoliforme*, *Arthroderma insingulare*, *Falciformispora senegalensis*, *Aureobasidium melanogenum*, *Cladophialophora bantiana*, *Phialophora macrospora*, *Fonsecaea monophora*, *Aspergillus versicolor*, *Emmonsia crescens*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chermesinum*.

Анализ данных для ПЦР-смеси I и II показал высокую аналитическую специфичность разрабатываемого способа диагностики: отсутствие перекрестных реакций на ДНК других видов грибов, и специфические кинетические кривые флуоресценции на ДНК детектируемых/идентифицируемых видов грибов рода *Candida*, в реакции с универсальными пангрибковыми праймерами и зондом положительный сигнал был зарегистрирован для всех анализируемых грибов.

Пример 2. Оценка аналитической чувствительности способа диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей

Для определения предела обнаружения заявляемого способа диагностики проводили серийные 10-кратные разведения ДНК от 10^6 до 10 копий генома на реакцию. Было протестировано минимум по 5 штаммов детектируемых/идентифицируемых видов грибов рода *Candida* в двух повторах, процент тестируемых штаммов грибов рода обнаруженный заявляемым способом диагностики для каждой из анализируемых концентраций представлен в таблице 4. Для грибов *C. krusei*, *C. guilliermondii* и *C. tropicalis* предел обнаружения составил 10 копий генома на реакцию, для 20, 100 и 80% тестируемых штаммов; для 20% штаммов *C. auris* и *C. albicans* – 100 копий/реакция; для 60% *C. glabrata* - 10^3 копий/реакция и самый низкий порог обнаружения был зарегистрирован для *C. parapsilosis* – порог для 40% тестируемых штаммов составил 10^4 копий/реакция.

Таблица 4. Результаты оценки аналитической чувствительности (порог обнаружения) заявляемого способа диагностики исходя из копий генома на реакцию

Анализируемые виды грибов рода <i>Candida</i>	10-кратные разведения ДНК (количество копий генома на реакцию)					
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10
<i>C. albicans</i>	100%	100%	60%	40%	20%	н/о
<i>C. krusei</i>	100%	100%	100%	100%	60%	20%
<i>C. glabrata</i>	100%	100%	80%	60%	н/о	н/о

<i>C. tropicalis</i>	100%	100%	100%	100%	100%	80%
<i>C. parapsilosis</i>	100%	100%	40%	н/о	н/о	н/о
<i>C. guilliermondii</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>C. auris</i>	100%	100%	100%	20%	20%	н/о

Также было оценено влияние ДНК человека и компонентов крови на эффективность работы заявляемого способа диагностики инвазивного кандидоза. Подготовленные суспензии анализируемых грибов в физрастворе (натрия хлорид 0,9%) эквивалентные стандарту McFarland 0,5 (10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл) добавляли в кровь человека в соотношении 1:10 и готовили последовательные 10-кратные разведения цельной кровью, в качестве контроля для разведений использовали физраствор. Предварительные эксперименты показали, что получаемые растворы имели концентрации от 10 до 10^5 КОЕ/мл. Точные концентрации КОЕ/мл определяли путем посева 100 мкл образцов крови с добавлением суспензий грибов на агаризованную питательную среду Сабуро с хлорамфениколом, подсчет колоний осуществляли после 48-часовой инкубации при 37°C. ДНК выделяли из 500 мкл соответствующих образцов крови с использованием солевого метода [22] с предварительным лизисом эритроцитов по методу Канкеля (29 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 5% сахараза, 1% тритон X100), элюировали в 50мкл буфера, 10 мкл которого использовали в качестве матрицы для проведения реакции амплификации без дополнительных этапов разведений (расчётная концентрация составляла 10^4 -1.0 КОЕ на реакцию).

Таблица 5. Результаты оценки аналитической чувствительности (порог обнаружения) заявляемого способа диагностики исходя из копий генома на реакцию

	Анализируемые виды грибов рода <i>Candida</i>						
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. auris</i>
Порог чувствительности (кровь) (КОЕ/мл)	10^2	10^2	10^4	10^5	10^2	10^3	10^4
Порог чувствительности (физраствор) (КОЕ/мл)	10	10	10^3	10^3	10^2	10^2	10^3

Результаты оценки эффективности представляемого способа диагностики инвазивного кандидоза приведены в таблице 5: предел обнаружения патогенов в крови составил $1.0-10^4$ КОЕ/мл анализируемого биосубстрата в зависимости от вида гриба. Для большинства анализируемых видов кровь на порядок снижала порог детекции

возбудителей инвазивного кандидоза за счет естественной микробицидной/микростатической активности. Образцы чистой крови, взятые в качестве контроля, не приводили к ложноположительным результатам или полному ингибированию ПЦР анализа. Для инактивации микробицидных свойств крови и повышения чувствительности заявляемого способа диагностики (за счет увеличения концентрации потенциальных возбудителей) при подозрении на кандидемию рекомендуется использовать для анализа подращённые гемокультуры на селективных средах.

Пример 3. Апробация способа диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей на клиническом материале пациентов

Пациент КЛА № 11865/5

29.03.2022 у пациента, находящегося на стационарном лечении в отделение ОРИТ неврологического профиля (по основному диагнозу G70.2 врожденная или приобретенная миостения), была зарегистрирована клиническая картина сепсиса. Для исключения инвазивного кандидоза (кандидемии) взят клинический материал (венозная кровь, забранная в вакуумтейнер с ЭДТА) и апробирован заявляемый способ диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей. Получен технический результат – положительный результат на микромицеты в целом и *C. parapsilosis*. Результаты апробации способа диагностики совпали с результатами культурального метода: рост дрожжевых грибов из среды накопления гемокультуратора на кровяном агаре и среде Сабуро.

Таким образом, в результате апробации предложенного способа диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей получен обеспечиваемый заявленным образом технический результат, а именно, показана возможность одновременной индикации в биологическом материале и идентификации культур актуальных возбудителей инвазивного кандидоза - *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* и *C. auris*.

Убедительно продемонстрировано, что для проведения диагностики инвазивного кандидоза в рутинной клинической практике в РФ наиболее доступным, быстрым и простым в исполнении является предложенный способ диагностики.

Список литературы

1. de Boer MGJ, Walzer PD, Mori S. Healthcare related transmission of Pneumocystis pneumonia: From key insights toward comprehensive prevention // *Transpl Infect Dis*. 2018 Oct;20(5):e12942. doi: 10.1111/tid.12942. Epub 2018 Jun 28.
2. Patel G, Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis // *Allergy Asthma Proc*. 2019 Nov 1;40(6):421-424. doi: 10.2500/aap.2019.40.4262.
3. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jenks JD, Koehler P, Krause R, Cornely OA, S Perlin D, Lass-Flörl C, Hoenigl M. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)-From Immunology to Treatment // *J Fungi (Basel)*. 2020 Jun 24;6(2):91. doi: 10.3390/jof6020091.
4. McCarty T.P., White C.M., Pappas P.G. Candidemia and Invasive Candidiasis // *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Jun;35(2):389-413. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.007.
5. Suleyman G, Alangaden GJ. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention // *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Dec;35(4):1027-1053. doi: 10.1016/j.idc.2021.08.002.
6. Brown G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections // *Sci Transl Med* 4: 165rv13. – 2012.
7. GAFFI (Global Action Fund for Fungal Infections). Improving outcomes for patients with fungal infections across the world // *A road map for the next decade*. 2018. Esher et al., 2018
9. Е.Р. Рауш, Н.В. Васильева, А.Г. Полищук, Е.В. Шагдилеева, Д.М. Лавникевич, М.В. Руднева, Ю.В. Михайлова, Н.Н. Клишко. Определение видов возбудителей инвазивного кандидоза: в поиске быстрых решений // *Проблемы медицинской микологии*. 2013. Т. 15, №4. С. 87-91.
10. Vasilyeva N. V. et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey // *Frontiers of medicine*. – 2018. – Т. 12. – №. 1. – С. 84-91.
11. Клишко Н. Н., Козлова О. П. Инвазивный кандидоз у детей // *Журнал инфектологии*. 2021. 13(2):14-26. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-2-14-26>
12. Denning D. W. et al. Delivering on antimicrobial resistance agenda not possible without improving fungal diagnostic capabilities // *Emerging infectious diseases*. – 2017. – Т. 23. – №. 2. – С. 177.
13. Clancy C.J., Nguyen M.H. Diagnosing invasive candidiasis // *Journal of Clin Microbiol*. 2018. 56 (5): e01909-17.

14. Arastehfar A., Fang W., Pan W., Lackner M., Liao W., Badiee P., Zomorodian K., Badali H., Hagen F., Lass-Florl C., Boekhout T. YEAST PANEL multiplex PCR for identification of clinical important yeast species: stepwise diagnostic strategy, useful for developing countries // *Diagnostic Microbiol & Inf Disease*. 2019. 93: 112-119.
15. Nejad E.E., Almani P.G.N., Mohammadi M.A., Salari S. Molecular identification of *Candida* isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species // *J Clin Lab Anal*. 2020. 34: e23444.
16. Zhang J., Hung G.-C., Nagamine K., Li B., Tsai S., Lo S.-C. Development of *Candida*-specific real-time PCR assay for the detection and identification of eight medically important *Candida* species // *Microbiology Insights*. 2016. 9: 21-28.
17. Kanbe T., Kurimoto K., Hattori H., Iwata T., Kikuchi A. Rapid identification of *Candida albicans* and its related species *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* by a single PCR amplification using primers specific for the repetitive sequence (RPS) of *Candida albicans* // *Journal of Dermatolog Sci*. 2005. 40: 43-50.
18. Galan A., Veses V., Murgui A., Casanova M., Martinez J.P. Rapid PCR-based test for identifying *Candida albicans* by using primers derived from the pH-regulated *KER1* gene // *FEMS Yeast Res*. 2006. 6: 1094-1100.
19. Alonso G.C., Pavarina A.C., Sousa T.V., Klein M.I. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples // *Journal of Microbiol Methods*. 2018. 147: 1-13.
20. Busser F.D., Coelho V.C., Fonseca C. de A., Negro G.M.B.D., Shikanai-Yasuda M.A., Lopes M.H., Magri M.M.C., de Freitas V.L.T. A real time PCR strategy for the detection and quantification of *Candida albicans* in human blood // *Rev Inst Trop Sao Paulo*. 2020. 62: e9.
21. Innings A., Ullberg M., Johansson A., Rubin C.J., Noreus N., Isaksson M., Herrmann B. Multiplex real-time PCR targeting the *RNase P RNA* gene for detection and identification of *Candida* species in blood // *Journal of Clin Microbiol*. 2007. 45(3): 874-880.
22. Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). 2012. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
23. <https://www.dna-technology.ru/equipmentpr/nabory-reagentov-dlya-pcr-vozbuditeli-gribkovyh-infekciy/mikozoskrin>
24. Leach L., Zhu Y., Chaturvedi S. Development and validation of real-time PCR assay for rapid detection of *Candida auris* from surveillance samples // *Journal of Clin Microbiol*. 2018. 56(2): e01223-17.

25. Кладова А.Ю., Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Киселев В.И., Молочков В.А. разработка и апробация количественного метода определения концентрации вета-папилломавирусов в коже // Молекулярная медицина. 2007. № 4. С. 33-40.

Формула изобретения

Способ диагностики инвазивного кандидоза и видовой идентификации его основных возбудителей методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, в ходе которого осуществляют две мультиплексные реакции, причем используют ПЦР-смесь I реакции со следующим составом: в объеме 50 мкл содержится 50 нг ДНК, 2,5мМ MgCl₂, 75мМ Tris-HCl с pH 8,8, 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы, а также пять пар праймеров и пять зондов по 40 fM каждого за исключением диагностической конструкции для *C.auris*, содержащейся в объеме 20 fM), со следующими нуклеотидными последовательностями:

<i>C. auris</i> _F	CAGACGTGAATCATCGAATCT
<i>C. auris</i> _R	TTTCGTGCAAGCTGTAATTT
<i>C. auris</i> _Proba	FAM-AATCTTCGCGGTGGCGTTGCATTCA-RTQ1
<i>C. guilliermondii</i> _For	AGTGCTGTTCGACCTCTCAAT
<i>C. guilliermondii</i> _Rev	CCGGGCCAACAATACCAGA
<i>C. guilliermondii</i> _Proba	R6G-TCCAACCTCGTTGAATGGTGTGGC-BHQ1-
<i>C. glabrata</i> _For	GCGGCGGGGGTTAATACTG
<i>C. glabrata</i> _Rev	TTAAAGACGTCTGTCTGCCCA
<i>C. glabrata</i> _Proba	ROX-ATAAGTGAGTGTTTTGTGCGTGC-RTQ2
<i>C. tropicalis</i> _For	CTTAGGTTTATCCAAAAACGCTT
<i>C. tropicalis</i> _Rev	CGGGTAGTCCTACCTGATTT
<i>C. tropicalis</i> _Proba	Cy5-TTGCTAGTGGCCACCACAATTTAT-BHQ3
Glob_For	GTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCT
Glob_Rev	CCACATGCCAGTTTCTATTGGTCT
Glob_Proba	Cy5.5-ACCTCAACCAGACCATGGTGCACCT-BHQ3

кроме того, используют ПЦР-смесь II реакции со следующим составом: в объеме 50 мкл содержится 50 нг ДНК, 2,5мМ MgCl₂, 75мМ Tris-HCl с pH 8,8, 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы, четыре пары праймеров и четыре зонда по 40 fM каждого со следующими нуклеотидными последовательностями:

<i>C. parapsilosis</i> _For	GGTTTGGTGTGAGCGATACG
<i>C. parapsilosis</i> _Rev	TTTGAGTTTGTACCAATGAGTG
<i>C. parapsilosis</i> _Proba	FAM-GTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGT-RTQ1
<i>C. albicans</i> _For	GGGTTTGCTTGAAAGACGGT
<i>C. albicans</i> _Rev	TTACCGCCGCAAGCAATGTT

C. albicans_Proba	R6G-GATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCT-BHQ1
C. krusei_For	CTTGCGCGTGCGCAGAGTT
C. krusei_Rev	TAGTTCGCTCGGCCAGCTTC
C. krusei_Proba	ROX- CGGACGACGTGTAAAGAGCGTC-RTQ2
Pan_Fun_For	CAACGGATCTCTTGGTTCT
Pan_Fun_Rev	GGCGCAATGTGCGTTCAAAG
Pan_Fun_Proba	Cy5-TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-BHQ3