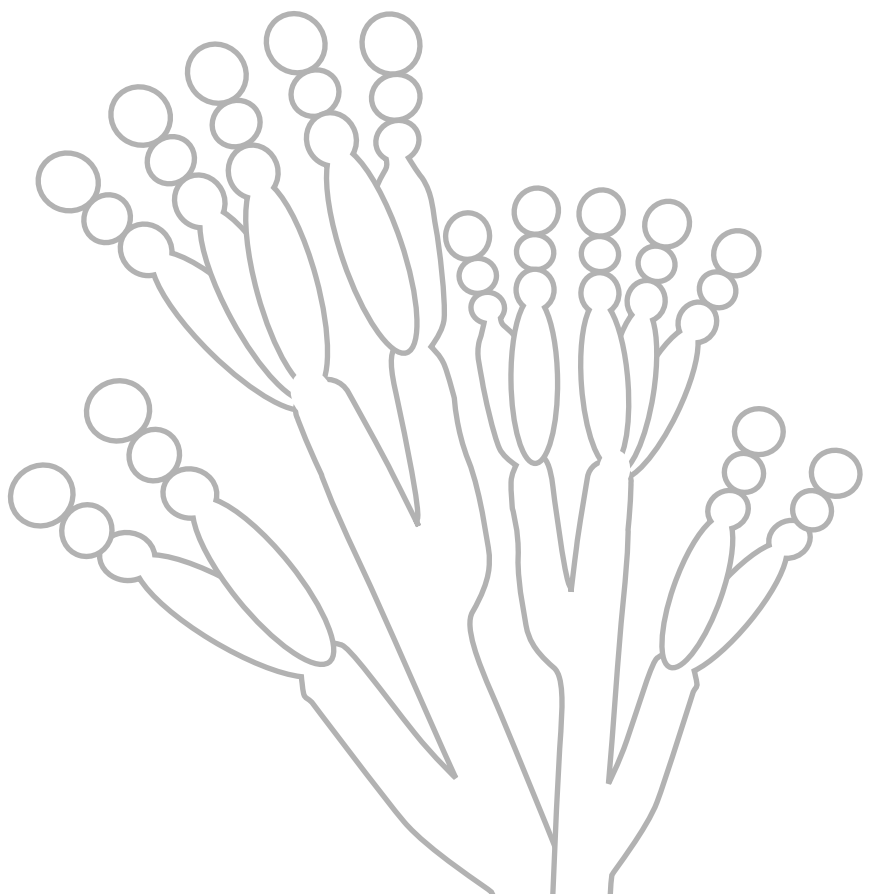
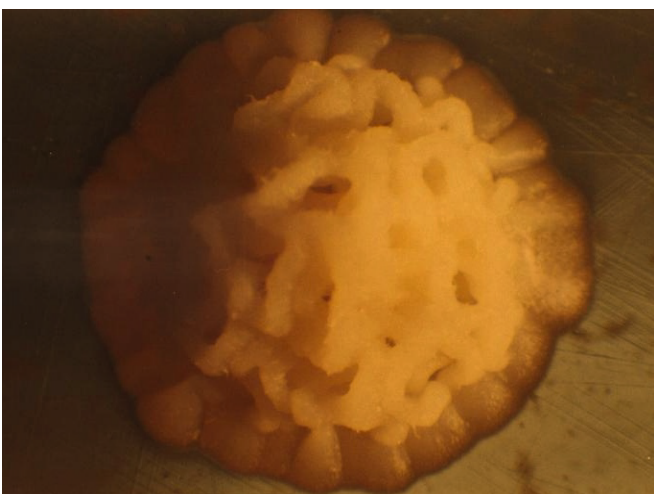
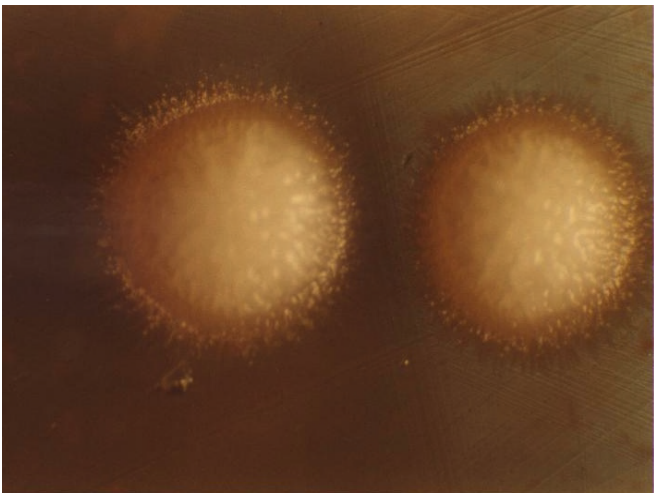


# КЛАСИФИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ГЪБИ

Анна Куюмджиева  
Траяна Недева  
Емилия Писарева



# Съдържание

## **1. Основи на систематиката на гъби**

## **2. Методи за изучаване на гъбни съобщества**

*2.1. Изолационни методи*

*2.2. Директно наблюдение*

*2.3. Молекулярни методи*

2.3.1. Флуоресцентни и ензимно – свързани имунни техники.

(Имунофлуоресцентни методи)

2.3.2. ДНК техники

## **3. Определяне на гъбна биомаса**

## **4. Определяне на гъбната активност**

## **5. Характеристики, използвани за класификация и идентификация на гъби.**

*5.1. Морфология*

*5.2. Хранене и физиология*

*5.3. Химия на нискомолекулни съединения*

*5.4. Антигенни свойства*

*5.5. Състав на клетъчната стена*

*5.6. Белтъчен състав*

*5.7. Нуклеинови киселини*

5.7.1. Състав на ДНК базите

5.7.2. Реасоциация и хибридизация на нуклеотидните бази

5.7.3. Полиморфизъм в дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP)

5.7.4. РНК последователност

## **Приложение 1:**

### **1. Въведение**

### **2. Основни характеристики**

### **3. Протоколи за идентификация**

### **4. Използвани техники при идентификацията на плесенни гъби**

- 4.1. *Характеристики на колонииите*
- 4.2. *Потвърждаване на диморфизъм*
- 4.3. *Потвърждаване на *Coccidioides immitis**
- 4.4. *Резистентност към циклохексимид*
- 4.5. *Активно освобождаване на конидии и спори*
- 4.6. *In vitro тест с коса*
- 4.7. *Хранителни тестове*
- 4.8. *Тест оризено зърно*
- 4.9. *Лактофенолни препарати*
- 4.10. *Термотолерантност*
- 4.11. *Хидролиза на урея*
- 4.12. *Екзоантигенен тест*
- 4.13. *Мини инкубационна камера*

## **Приложение 2:**

### **1. Въведение**

### **2. Протокол**

- 2.1. *Получаванена безклетъчен екстракт*
- 2.2. *Определяне на белтък*
- 2.3. *Провеждане на електрофореза в денатуриращи условия*
  - 2.3.1. *Приготвяне на плаки за 10% SDS (натриев додецил сулфат) полиакриламидна гел електрофореза (PAGE).*
  - 2.3.2. *Провеждане на електрофореза*

## *2.4. Провеждане на електрофореза на нативни белтъци (ензими)*

2.4.1. Приготвяне на плаки за нативна PAGE

2.4.2. Провеждане на електрофореза

2.4.3. Изчисляване на относителна електрофоретична подвижност

2.4.4. Изчисляване на степента на сходство (S, %) между два  
щама

### **Приложение 3:**

- 1. Среди за спорулация и/или за субкултивиране на плесенни гъби**
- 2. Използвани реагенти в идентификацията на плесенни гъби**
- 3. Среди за микроскопско наблюдение**

### **Литература**

# КЛАСИФИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ГЪБИ

## 1. Основи на систематиката на гъби

Гъбите представляват обширна хетерогенна група организми, различаващи се по морфология, начин на размножаване, цикли на развитие, начини на хранене и местообитание. Към тях се отнасят около 80 000 описани вида. Гъбите са еукариотни организми, характеризиращи се с редица важни особености, по които се различават от прокариотите, като една от най-важните е наличието на ясно оформено ядро.

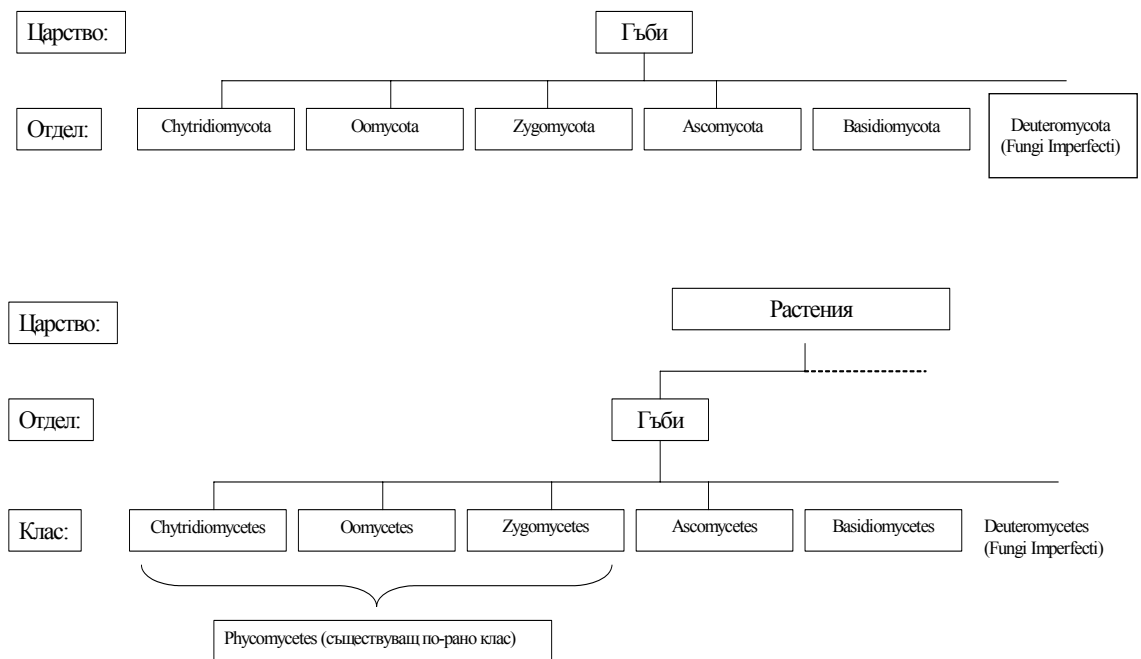
С изучаване на гъбите се занимава науката микология (от гръцки: *mykes* – гъба). Това е едно от направленията в микробиологията и голяма част от методологията, която се използва при изследването на гъби (начини на стерилизация, култивиране и други), практически не се отличава от методите, използвани при изучаването на прокариоти.

Гъбите имат статус на отделно царство в живия свят. Най-съществените различия между тези 3 царства (на растенията, на животните и на гъбите) са типът на хранене и типът на обмяна на веществата. При гъбните видове храненето е хетеротрофно, осъществяващо се чрез адсорбция.

Изучаването на различните групи гъби и тяхната биология, цикли на развитие, особености на морфологичния строеж и размножаване, тяхната екология е спомогнало да се уточни систематичното положение на отделните таксономични групи и установяването на тяхната филогенетична връзка с други такива.

Гъбите се отнасят към най-древната форма организми. Счита се, че съвременните класове гъби са възникнали в процеса на еволюция от различни нисши организми, т.е. имат полифилетичен произход.

В резултат на развитието на съвременните методи за изследване и на таксономичната наука се е оформила следната схема, дефинираща таксономичния статус на гъбите.



**Фиг. 1. Систематика на гъби**

*I - Съвременна схема. II - Традиционна схема*

*При схема I за означаване на отдел се използва наставка ‘ – mycota’, която отговаря на наставката ‘-phyta’ в растителното царство. На схема II ‘-mycota’ е заменено с ‘ –mycetes’.*

Двете най-големи и най-високо организирани групи са *Ascomycota* и *Basidiomycota*.

Систематичната принадлежност на гъбите се определя въз основа на комплекс от характерни морфологични и културални признаци, особености на тяхната биология, цикъла на развитие, цитологични и биохимични свойства. Съществува последователност при установяване на принадлежността на гъбите към отдел, клас (подклас), разред (подразред), семейство, род, вид.

Културалните признаци включват морфологията на колонията на дадения щам при култивиране на определени среди или при разграждане на различни субстрати. Към елементите на морфологията се отнасят:

- Размер, форма и големина;
- Строеж на ръба и центъра на колонията;
- Интензивност на растеж и характер на повърхността на колонията;
- Цвят на колонията и мицела;
- Вид на репродуктивните органи;
- Оцветяване на обратната страна на колонията и средата;
- Наличие на видоизменени мицеларни структури (склероции, нишки) и начин на образуване на репродуктивните тела.

Към морфологичните признаци се отнасят и особеностите на микроскопичния субклетъчен строеж на мицела, особено този на репродуктивните органи, цитохимични признаци (например включване на липиди), локализация и специфични методи за оцветяване на отделни клетъчни структури и ензими, особености на строежа на клетъчната стена, наличие и характеристика на ядра и други клетъчни структури.

## **2. Методи за изучаване на гъбни съобщества**

Съществуват много методи за изучаване на микроорганизмите, в това число и гъбите, развиващи се в природни условия. **Изоляционните методи** дават възможност за растеж на гъбите до получаване на чиста култура, идентифициране и обобщаване на видовете. Разработени са различни методики за **микроскопско изследване на проби в определен хабитат**, при които гъбите се развиват и успоредно с това се наблюдават при определени условия, след което получената гъбна биомаса се изследва за метаболитна активност. Много от тези методи биха могли да бъдат използвани за различни хабитати, за паразити и мутуалистични симбионти и сапротрофи. Напоследък все по – успешно се прилагат молекулярно биологичните техники при изучаване на микроорганизмите от околната среда. Повечето молекулярни методи, за пръв път се използват при изучаване на бактериите, след което и при гъби с икономическо значение – патогени по човек или растения със стопанско значение, мутуалистични симбионти, причиняващи микориза.

Тези методи, в комбинация с други, имат голямо значение при изучаване на сапрофитни гъби.

### **2.1. Изолационни методи**

За идентифициране на гъби посредством пряко наблюдение, е нужно да се наблюдават структурите образувани по време на спорулация. В случаите, когато те липсват или са трудно различими, идентификацията на видовете е възможна само тогава, когато гъбата е инокулирана върху хранителна среда, която спомага растежа и спорообразуването.

В повечето природни субстрати се откриват различни микроорганизми: гъби, бактерии, алги, както и миниатюрни животни като протозои и нематоди. Методите за изолация на единични гъбни видове могат да бъдат разделени на **директни методи**, при които изследваните спори или мицелен материал се пренасят на стерилна хранителна среда и **индиректни методи**. При директните методи, изследваната проба от субстрата се използва за инокулиране на средата, като от получените множество колонии – източници на единични клетки, се избират няколко, които в последствие се прехвърлят на свежа стерилна среда. Получената по този начин чиста култура се нарича „изолат”.

Директните методи са приложими тогава, когато изследваните гъбни култури образуват ясно обособени спори по повърхността на субстрата. Спорулацията на гъби, населяващи растителните повърхности, може да бъде индуцирана чрез бавно изпаряване на водата на изследвания материал (кора, зрели семена или друг растителен материал) в продължение на няколко седмици. Спори на деутеромицети и някои плесени в повечето случаи се развиват бързо и могат да бъдат пренесени чрез стерилна игла на хранителна среда – картофен агар. Гъби, населяващи почвата, могат да бъдат изолирани директно след подбиране на единични хифи от почвената суспензия под микроскоп, пречистване и последващо култивиране. Директните методи за изолация са продължителни и трудоемки, но посредством тях се избягват основните проблеми на индиректните методи за изолация, при



които в субстрата много от изследваните гъби могат да бъдат представени по-често от активно развиващ се мицел, отколкото от латентни форми.

При **индиректните методи**, пробата от субстрата се инкубира в стерилна хранителна среда до получаване на множество колонии. Трите най – често използвани индиректни метода за изследване на повени микроорганизми са **метод на разрежданията** и **повърхностен метод**, използвани за почвени суспензии и **метод на почвените бучици** – използван за почвени частици. При метода на разрежданията на почвената суспензия се изготвят падащи разреждания със стерилна вода и стандартен обем от всяко разреждане се смесва с определен обем от разтопен на 40°C агар. Сместа се излива в петрита и се инкубира. Целта на разрежданията е да се получат единични колонии, от чиито спори или мицелен материал да бъде получена чиста култура. При метода на повърхностното култивиране, почвената суспензия се посява по повърхността на агара. Методът е по-опростен и при него не се допуска развитие на потъващи организми в топлия агар. Недостатък на тези методи е, че бързо растящите култури, бързо инвазират петритото. При метода на почвените бучици малко количество от изследваната почва (5 – 15 mg) се нанася в разтопен агар без предварително разреждане с вода. Тази опростена техника, дава възможност за сравнение на голям брой почвени проби.

При всеки от описаните методи, наличието на развити колонии в петритото е доказателство за присъствие на изследваната форма в почвата. Не всички микроорганизми, намиращи се в почвената проба обаче, образуват колонии в петритото. Някои хранителни среди са силно селективни, поради наличието на специфични хранителни компоненти, които създават определени, благоприятни условия в тях. Гъби от родовете *Aspergillus* и *Penicillium* се развиват на богатата хранителна среда. Продуцираните от тях антибиотици обаче подтискат растежа на други организми. Честотата на изолирането им от петритата с посят в тях почвен екстракт не е еднаква с тази в природни условия. Тези видове са изключително „плодовити”. Една единствена спора може да даде начало на хиляди нови. Базидиомицети, хитридиомицети, оомицети и плесени,

които според едни методи са широко разпространени в почвата се развиват изключително рядко върху петрита с посят почвен екстракт. Списъкът с гъби, изолирани по един или друг метод, неминуемо остава непълен, поради което е желателно използването на разнообразни методи.

Селективността на средата за култивиране е важна в случаите, в които целта е да бъдат изолирани точно определени микроорганизми. При изолиране на почвени гъби по описаните методи, е желателно към средата да се добавят антибиотици (пеницилин и стрептомицин) или да се приложи кисело рН (4.0), като по този начин тя става селективна за гъби и се подтиска бактериалния растеж. Така например при инкубиране на инфектирана почва върху среда, съдържаща арсенови съединения, инхибиращи растежа на повечето микроорганизми, почвеният патоген *Phaeolus schueinitzii*, образува почти чиста култура. Алтернативни микроорганизми, използващи необичайни субстрати, се изолират от смесена популация чрез добавяне на субстрат към почвената проба. Това довежда до повишаване на техния брой в сравнение с този на другите микроорганизми. Този метод е известен като обогатяване на пробата. Кератинът и целулозата разложени в почвата се изолират от материали заровени в нея. Селективните методи могат да се базират също така на принципи различни от хранителните. Подвижните спори на оомицетите, могат да бъдат привлечени от някои органични съединения, което прави тяхното изолиране по-лесно след добавяне на малки дози от това съединение към разредената проба или почвената суспензия. Такива са стерилни семена, растителен или животински материал. Хитридиомицети могат да бъдат изолирани с помощта на парчета стерилен «целофан», тъй като техните спори са подвижни и притежават целулолитична активност. Тези методи се прилагат в случаите, при които гъбите (хитридиомицети) имат слабо развит мицел или изобщо нямат такъв и не биха могли да бъдат изолирани с помощта на петрита с агар.

Описаните методи дават възможност да се изолират нови видове гъби. Това е първата крачка за осмисляне на ролята на гъбите в природните местообитания. Недостатъчна обаче остава информацията за вида на мицела, метаболитната активност, разнообразието на

различните видове и разположението им в микрохабитата, който населяват. Необходимо е използването и на други методи, даващи възможност за изучаване на гъбите *in situ*, като най – достъпен сред тях е методът на директно наблюдение.

## **2.2. Директно наблюдение**

Посредством директно наблюдение може да се получи информация за формата и разположението на гъбите в техния хабитат, но видовете трудно биха могли да бъдат определени, тъй като прякото наблюдение рядко съвпада с момента на спорулация. Използват се светлинни и електронни микроскопи. Части от субстрата се фиксират, закрепват, нарязват на сегменти и се изучават чрез светлинна или трансмисионна електронна микроскопия. Този метод се използва за определяне на модела на разпределение на бактерии и гъби, разположени по корените на растенията в почвата. Нарязването на сегменти дава възможност да бъдат наблюдавани някои вътрешни структури, но не се получава информация за триизмерното им подреждане. При наблюдение на повърхността на клетките, под светлинен или сканиращ електронен микроскоп на слабо увеличение, може да се види разположението на гъбните хифи по повърхността. При сканираща електронна микроскопия на лист, се откриват филопленни гъби, които минават през повърхността и навлизат в субстомалното въздушно пространство през stomите. Това е трудно забележимо при наблюдение на сегменти от листа. Почвената повърхност също се наблюдава по този начин. Алтернативен метод за изучаване на субстрата е изолирането на гъбите от почвата или листата чрез създаването на контакт между него и стъкло или агарова повърхност. Мицелът на някои почвени гъби расте и може да адхезира върху стъклени повърхности, заровени в почвата. За целта в почвата се заравят предметни стъкла, които след изваждането им след няколко седмици, се изучават чрез метода на предметните стъкла на Росси – Холодни. Винаги се установява наличие на базидиомицетни мицели, които лесно се разпознават по кламп връзката, която не се наблюдава

при култури, посети върху агаризирана среда. Друг метод се основава на краткотраен контакт с агарова повърхност. Наличието на сапрофитни микроорганизми би могло да се докаже след притискане на листната повърхност към агарова повърхност и последващо инкубиране.

Методът на директното наблюдение и описание осигурява подробна информация за разположението на гъбите в природни условия. Това дава възможност почвените микроорганизми да се разделят на шест групи:

- едноклетъчни подвижни (някои бактерии, зооспори, подвижни протисти);
- едноклетъчни с ограничена подвижност или неподвижни (някои бактерии и всички дрождеви видове);
- ограничени колонии с малък мицел, разположени в съседство с частици или такива които ги колонизират (*Penicillium*, филаментозни представители на род *Streptomyces*);
- дифузен мицел, който не асоциира със субстрата (*Zygorhynchus*);
- мицеларни видове, плазмодии (фиг. 2.5а), пълзящи по повърхността на субстрата. (*Mухомycetes*).

### **2.3. Молекулярни методи**

#### **2.3.1. Флуоресцентни и ензимно – свързани имунни техники. (Имунофлуоресцентни методи)**

Имунофлуоресцентните методи се базират на специфичността, с която антителата продуцирани от животни се свързват към специфичен субстрат. В случаите, когато достъпен за наблюдение е само мицела и няма други морфологични характеристики за идентификация, е необходимо да бъдат използвани други методи. Антителата от изучавания гъбен вид се подготвят чрез стандартни имунологични методи, включващи използването на серуми от заек, предварително инжектиран с гъбен антиген. Антителата от заека се използват за детекция и идентификация на специфични гъбни видове, както и за количественото им определяне в проби, съдържащи видове, които не ни

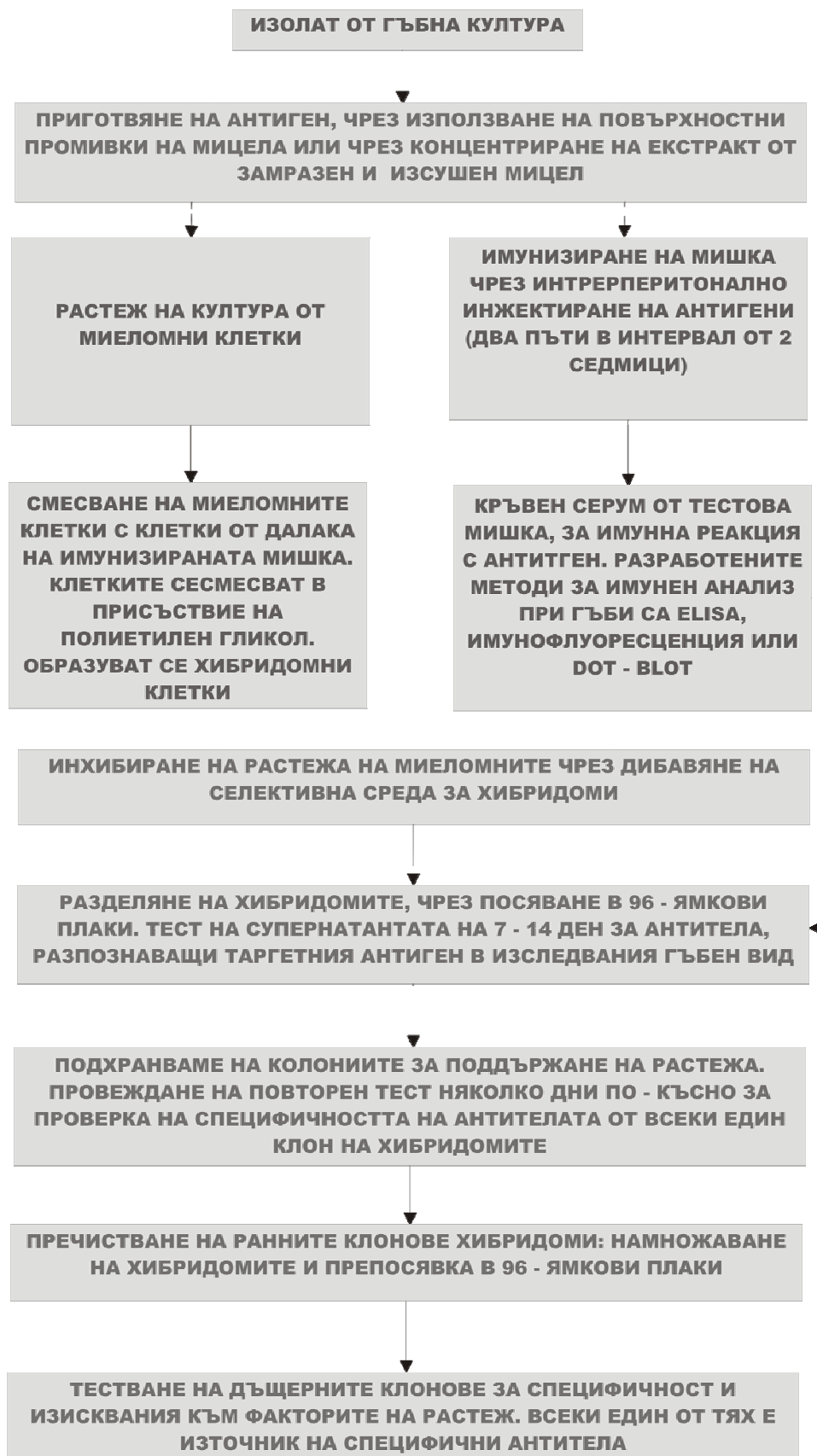
интересуват. Методиката за изготвяне на антицяло за детекция на целевия гъбен вид в смесена проба е представена на фигура 2. Към промитата проба, в която се търси определен вид, се добавят първични антитела, които се свързват за спорите или хифите на гъбата. Разтворимите гъбни антигени могат да бъдат детектирани чрез ензимно – свързан имуносорбентен метод, описан по – долу. При този метод първото (заешко), добавено и свързано към гъбната проба антицяло, се детектира чрез добавяне на второ антицяло, което разпознава първото, свързва се с него в конюгат и дава видима реакция. Използването на второ антицяло е подходящо за случаите, в които анти – заешкото антицяло е търговски продукт и образуването на конюгат между двете е сигурно. Това позволява добавянето на широк спектър от маркерни молекули към първичния антиген, тъй като вторичното антицяло може да се свърже към първичното на повече от едно място в рамките на една молекула. Маркерните молекули могат да бъдат оцветени с флуоресцин изотиоцианат или друг ензим, който може да предизвика оцветяване в резултат от стехеометрична реакция с цветния субстрат. Методът е известен като ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Добавянето на второто антицяло, дава възможност да се определи количеството на изследвания антиген в пробата, тъй като броят на антителата, които биха могли да се свържат към определен антиген, е известен. Най-често срещаната грешка при използване на имунологични методи е осъществяването на кръстосана реакция между антителата в антисерума с гъби, различни от тези, носещи антигенния източник. Това се получава, когато съществува голямо разнообразие от молекули, представени в гъбния материал използван за инжектиране на животното. Само част от тях са уникални за гъбните видове, така че някои от антигените представени в антигенните проби, са неспецифични. Използването на моноклонални антитела повишава процента на грешката.

При техники, използващи моноклонални антитела (Фиг.1), клетките продуциращи антитела в имунизираното животно (лимфоцити), се смесват с непрекъсната (безсмъртна) клетъчна линия, получена от туморни клетки. Единични клетки от получената клетъчна култура се

използват за получаване на стабилна линия, резултат от една единствена клетка, която да продуцира едно специфично антитяло.

### 2.3.2. ДНК техники

Прогресът на ДНК техниките и прилагането им в екологията на микроорганизмите е бърз. Подробности за тези техники, биха могли да се открият в много статии. Наличието на даден вид в проба, може да бъде установено и без изолирането му и наблюдаването му под микроскоп. Детекцията може да се осъществи чрез **ДНК-хибридизационна проба**, която се свързва към търсената ДНК последователност, характерна за изследвания вид. Съществуват ДНК-проби за икономически важни видове, които могат да бъдат използвани и за други видове. Дори при наличие само на няколко клетки от изследвания вид неговата детекция е възможна, чрез размножаване на негови ДНК копия чрез **полимеразна верижна реакция**. Използването на подходящи олигонуклеотидни праймери осигурява амплификацията само на търсената ДНК. Могат да бъдат приготвени ДНК сонди за разпознаването на ДНК от таксон извън вида. По този метод е било картирано разпределението на *Amarilla bulbosa* в Канадските гори.



**Фиг.2** Метод за получаване на моноклонални антители за гъбни антигени (F.M. Dewey)

ДНК техниките, също така могат да бъдат използвани и за получаване на информация за наличието и природата на непознати организми. При изучаване на бактерии от планктонни проби, ДНК на 16 S рибозомалните РНК гени (еквивалентна на 17S рРНК при гъби) е амплифицирана посредством полимеразна верижна реакция, чрез използване на подходящ праймер за еубактериални 16S рРНК гени. Клонирането и изучаването на 12 случайно подбрани 16S рРНК гени, доказва че нито един от тях няма идентична секвенция с рДНК от изолираната от планктонната проба бактерия. Новата рДНК секвенция, може да доведе до вписването на изучавания вид в някоя от познатите групи, или до формирането на клъстери, отдалечени от познатите форми. За сравнителен анализ е изолирана РНК от бактерии, населяващи повърхността на горещи извори. От 16S рРНК се синтезира съответната комплементарна ДНК чрез ензима **обратна транскриптаза**, като се използва олигонуклеотиден праймер, който се свързва към един универсален и силно консервативен регион от 16 S рРНК. Клонирани и изучени са 8 сДНК секвенции. Нито една от тях не е комплементарна на познатите последователности на 16S рРНК при бактерии, изолирани от горещи извори. Изследванията доказват тезата, че изолираните и наблюдавани чрез традиционни методи видове, може би са само една малка част от съществуващите в природните местообитания организми, и може би тези организми не са доминиращи в групата. След изучаване на генните секвенции при микроорганизми, изолирани от природни местообитания, ДНК пробите могат да бъдат използвани за определяне на разпределението на видовете със същата секвенция. Полимеразната верижна реакция може да бъде използвана за количествена оценка на полученото разнообразие. ДНК секвенциите могат да докажат наличие на видове, но не дават информация за това дали даденият вид е в активна или латентна форма. Разнообразието на рибозомите, отразява степента на растежа и оттук на метаболитната активност. Методите, които използват обратната транскриптаза за детекция на специфична РНК с по – голяма точност от РНК гени (рРНК), носят информация за активността им. Методите базирани на ДНК технологиите са



изключително ценни при изучаването гъбни видове, изолирани от природни местообитания.

### **3. Определяне на гъбна биомаса**

Биомасата на мицелните гъби трудно би могла да бъде директно определена. Това се дължи на неопределения им растеж и трудност при диференцирането на границите между отделните колонии. Вместо това, гъбният мицел би могъл да бъде определен. Единствено изключение са случаите, при които гъбите формират единствено едноклетъчни спори (например спорите във въздуха).

Методите за оценка на гъбната биомаса и мицела обикновено включват отчитане на количеството гъбен материал от проба с определен обем и маса. Ако изследваният материал е твърд субстрат, пробата първоначално се обработва, за да се избегнат отклонения в резултатите, дължащи се на хетерогенността на разпределение на мицела в него.

Един от начините за определянето е чрез директно наблюдение. Информация за честотата и разпределението на микроорганизмите, в това число и гъби, в почвата може да даде сканиращата електронна микроскопия. Методът е с преимущество пред индиректните методи, тъй като показва пространственото отношение между гъбите и субстрата. Преди да се пристъпи към установяване на биомасата им, пробите могат да бъдат предварително третирани, за да се освободят гъбите от субстрата. Освен това почвата може да се разтвори във вода и част от получената суспензия, внимателно да се разбърка в по-голям обем разтопен агар. Пробите се поставят в камери с хемоцитометрични стъкла, върху които се разлива агара. Така се получава тънък слой агар с известен обем, който може да бъде отлепен от хемоцитометъра, да се оцвети ако е необходимо и да се постави на предметно стъкло за наблюдение. Чрез светлинна микроскопия се отчита дължината на хифите, като се използва обектив с високо увеличение. За определяне жизнеността на хифите в наблюдаваната проба (например лист), се

използват багрила, които се визуализират чрез ензими или прекурсорни молекули. Флуоресцин диацетатът се продуцира от мицела на гъби, но флуоресцира само когато хифата е подложена на стрес. Синтезът на материал за клетъчна стена и метаболитната активност на клетките се доказват чрез автордиография. Прекурсорите на клетъчните стени, като например глюкоза, се маркират с добавен към пробата радиоизотоп – титан. Пробата се инкубира, за да се съкрати периода на растеж. Мицелът се фиксира на предметно стъкло, промива се и се покрива с фотографски филм. Хифите, които са изграждали клетъчна стена по време на инкубационния период съдържат радиоизотоп, който потъмнява фотографския филм при контакт с него

Гъбната биомаса може да се определи индиректно чрез методи, които използват съединения, характерни за гъбните клетки (хитин и ергостерол). Хитинът хидролизира до N – ацетилглюкозамин, който се определя колориметрично. Гъбите са единствените микроорганизми, които съдържат хитин в клетъчните си стени. Определянето на биомасата не може да стане само въз основа на количеството на хитина в клетъчната стена на гъбите, тъй като количеството му зависи от възрастта на индивида и вида. Липсата на хитин в клетъчната стена на оомицетите, както и наличието му при насекоми и кърлежи, може да доведе до грешки. Методите за определяне на хитин в гъбна биомаса се използват в случаите, когато възможностите за допускане на грешки са пренебрежимо малки, и в случаите, когато се определя растежа на гъби, съдържащи хитин, в тъканите на растенията.

Ергостерол е открит в базидиомицети, аскомицети и деутеромицети, но не и в растения. Наличието на ергостерол е индикатор при определяне на гъбен материал в растителни проби. Възможен източник на грешки е смесването на пробата с алги или протозои, които съдържат ергостерол. Методите, включващи определянето на ергостерол като мярка за биомаса са по-надеждни от тези включващи определяне на хитин. Това се дължи на факта, че ергостеролът се открива само в живи клетки като количеството му се определя чрез ултравиолетова спектрофотометрия на чисти екстракти.

Определянето на гъбна биомаса във въздух и вода е много по лесно. Съществуват различни филтри за спори, които определят броя на спорите за единица обем въздух преминал през филтъра. Уловените спори могат да бъдат пренесени на среда за изолация и идентификация. При течни проби, зооспорите могат да бъдат концентрирани чрез центрофугиране по плътностен градиент, подходящо за директно броене. Зооспори, намиращи се във вода, могат да бъдат стабилизирани на гел, върху който от всяка зооспора се развива колония. Така се получава информация за броя на колония-образуващите спори и хифни фрагменти.

#### **4. Определяне на гъбната активност**

Дотук описаните методи се използват за определяне на количеството гъбен материал в проба. Логичният въпрос е как тези методи се използват и по време на растежа и метаболитна активност на вида. Разработени са много техники за определяне на тоталната микробна метаболитна активност в проби, предимно с почвен произход. Отделянето на въглероден диоксид, поглъщането на кислород и разграждането на добавени субстрати, може да се използва за определяне на тоталната активност на всички представени в почвата хетеротрофни микроорганизми. Понякога е трудно да се разграничи активността на гъбите от тази на бактериите и протистите. За целта се използват техните филаментозни форми. Подходяща стерилна хранителна среда, разпределена в съд с малки отвори, се заравя в почвата. Гъбните хифи навлизат през отворите и за разлика от бактериалните колонии, могат да се развиват в съдържащите кислород празнини, като по този начин колонизират хранителната среда. Честотата, с която това се случва, дава индиректна информация за големината на растящия мицел. За съжаление, както всеки един метод, който включва растеж на хранителна среда, степента на селективност е критичен фактор. Наличието на определени проби и добавки, може да

стимулира растеж на външно латентни мицели, прорастване на спори и склероции.

## **5. Характеристики, използвани за класификация и идентификация на гъби.**

До днес са известни повече от 80 000 вида гъби, което поставя важни задачи пред учените, които се занимават с идентификацията и описанието на новите видове и групирането им в таксон. Някои от видовете и до сега са слабо изучени, като тяхната класификация е по-скоро традиционна, отколкото нумерична, като се основава на очевидни морфологични характеристики. Съществуват няколко групи гъби, които са проучени по-подробно, поради тяхното практическо значение. В класификацията на гъбите се използват не само морфологични, но и други характеристики, описани по-долу.

Правилната **идентификация** на гъбите има голямо практическо значение за растителната и животинската патология, биоуврежданията, биотехнологията и екологията. Много от методите използвани за класификация, също така могат да бъдат използвани и за идентификация. Точната идентификация и създаването на класификация имат голямо значение особено за разпознаване на патогенни видове и прилагане на мерки срещу тях. При повечето гъби, идентификацията се основава главно на тяхната морфология. Изключение правят дрождите, при които от съществено значение са биохимичните и физиологични характеристики. За гъбни видове с важно икономическо значение, е необходимо разработването на реагенти, които да взаимодействат с тях като по този начин е възможно тяхното разпознаване дори, когато няма наличие на чиста култура. За целта успешно се използват видово специфични и флуоресцентни антитела. Най-актуална е разработката на методи, които включват използване на проби, които взаимодействат с ДНК последователности, уникални за вида.

### **5.1. Морфология**

Плодните тела на много базидиомицети и някои аскомицети са големи и лесно различими с просто око. Следователно, морфологичните характеристики видими с невъоръжено око или с помощта на лупа са важни при класификацията на тези гъби. Повечето гъби обаче са с микроскопични размери, което изисква използването на светлинен микроскоп. Напоследък за идентификация се използва вида на споровете повърхности, което изисква използването на сканиращ електронен микроскоп за наблюдение. Морфологичните белези, наблюдавани под светлинен микроскоп, са в основата на класификацията на много гъби. Определящо таксономично значение при различни гъбни видове имат особеностите на половите им спори. При липса на такава обаче, се използват някои белези, свързани с образуването на безполови спори. При липса на всякаква спорулация, информацията за класифициране на вида е недостатъчна. В този случай се използват данни за склероциите при филаментозни гъби, както и за формата на клетката и пъпкуване при дрождите.

### **5.2. Хранене и физиология**

Сред гъбите, дрождите са организмите с голямо практическо значение, но с малко таксономично-значими морфологични характеристики, особено в случаите когато липсва полово размножаване. Повечето дрожди обаче се характеризират с бърз растеж, водещ до получаване на чиста култура, което улеснява използването на хранителни и физиологични характеристики при тяхната класификация. С голямо значение са наличието на ферментация, забавянето на растежа при аеробни условия, използването на азотен източник, и различни захари и гликозиди, както и чувствителността им към антигъбни съединения.

При останалите групи гъби използването на биохимични и физиологични критерии при класификацията им е силно ограничено. Изследването на тези признаци е свързано преди всичко с изучаване на

характеристиките на микроорганизмите в рамките на вида и възможностите им за практическо използване.

### **5.3. Химия на нискомолекулни съединения**

Гъбите продуцират голям брой различни вторични метаболити. Понякога за класификация и идентификация се използват някои химични съединения, продукт по-скоро на първичния метаболизъм, отколкото на вторичния, изпълняващи важна роля в метаболизма или структурата им. Така например, броят на изопреновите единици в състава на хиноновото ядро на коензим Q (CoQ), може да бъде различен, което променя структурата на CoQ. Подобни разлики се използват при класификацията на дрожди. При класификацията на гъби, се използват разлики в липидното съдържание. Пиролизата и спектроскопията са техники използвани при бактериалната таксономия, които успешно се прилагат и при някои групи гъби. Обект на пиролиза е клетъчната стена – тя се разрушава при висока температура и в отсъствие на кислород. Природата на получените нискомолекулно съединения, зависи от състава на клетъчната стена. Продуктите от пиролизата се пропускат през азотен поток на мас спектрометър, който определя молекулната им маса и съотношението на представените съединения. Получените данни се сравняват и класифицират по методи от нумеричната таксономия.

### **5.4. Антигенни свойства**

Много изучавани субстанции, когато бъдат инжектирани в гръбначно животно, например заек, индуцират образуването на **антитела**. **Антителата** са белтъци, които реагират специфично с различни съединения, и като резултат се формира неразтворим комплекс. Такива специфични съединения са **антигените**, с белтъчна или въглехидратна природа. Гъбите продуцират голямо количество белтъчни структури. След инжектиране на гъбен белтъчен екстракт в заек се индуцира продукцията на множество антитела, които са комплементарни на белтъка или други съединения с антигенна

активност. В кръвния серум на заек, се откриват антитела срещу инжектираните антигени. Серумът е известен като **антисерум**. Два гъбни щамове с високо сходство по между си биха могли да се различат само посредством антигените, които притежават. С намаляване на сходството разликите в антигените се увеличават.

Разработени са много методи за определяне на антигенно сходство, но най-ефективния между тях несъмнено е имуноелектрофорезата. Антигенната проба се нанася на единия край на агарозния гел, след което се извършва електрофореза, в следствие на която антигените се разделят, мигрирайки през гела с различна скорост. Антисерумът дифундира от стартовете в гела, като антителата взаимодействат специфично с антигените. На мястото на всяко взаимодействие се образува ивица от преципитирани белтъци. Антигенни проби от щамове с високо сходство по между си дават сходни профили на ивиците. При тези с по-слабо сходство, общите ивици са по-малко. Степента на сходство се определя чрез съставяне на дендрограми. Описаният метод може да бъде използван при някои родове гъби, чиито видове са трудно определяеми чрез традиционни методи.

### **5.5. Състав на клетъчната стена**

Клетъчната стена на гъбните клетки е комплексна структура, в чиито състав взимат участие различни по химичен състав съединения. Много групи гъби се определят въз основа на разликите в полизахаридния компонент. Стените на клетките на оомицетите например, съдържат целулоза. При по-голяма част от гъбите в състава на клетъчните стени влиза хитин, като количеството му е важна характеристика в гъбната таксономия. При хидролиза, клетъчните стени на дрождевите клетки отделят глюкоза и маноза, но отделните видове се разграничават помежду си според наличието или липсата на малки количества от други полизахариди – фруктоза, галактоза, рамноза и ксилоза. Тези характеристики също се използват за класификация.

### **5.6. Белтъчен състав**

При изучаването на природното разнообразие в рамките на даден вид все по-често се прилага и анализ на белтъчния състав на клетките. Профилите на ивиците, получени при подлагане на белтъчни екстракти или на отделни ензими на електрофореза, са много полезни при определяне на видовете и сходството в родовете. Въз основа на това се извършва клъстерен анализ и се съставя дендрограма.

### **5.7. Нуклеинови киселини**

Всеки един организъм, дори тези с проста морфология, притежава редица свойства, въз основа на които може да бъде класифициран – хранителни, физиологични и биохимични. Във всяка клетка, нуклеотидната последователност в нуклеиновите киселини дава ценна информация. Някои последователности са характерни за ниво щам, някои за ниво вид и дори за по-големи групи като род и клас. ДНК технологиите, които са от огромно значение при идентификацията, класификацията и филогенията при бактериите, все по-често се използват и при таксономичното определяне на гъби. Голям скок в тези техники е прилагането на полимеразната верижна реакция, която позволяват получаването на милиони копия от ДНК молекули. Това улеснява таксономията, например при наличие на екстракт от ДНК от една единствена спора от важен колекционен материал, но с влошено качество. Приложението на ДНК технологиите при таксономията на гъбите дава възможност за по-бърза класификация и идентификация отколкото чрез използваните класически методи.

#### ***5.7.1. Състав на ДНК базите***

Всички гъби притежават нуклеотидите гуанин (Г) и цитозин (Ц), характерни за ядрената ДНК. Разликата в моларното съдържание в проценти на Г+Ц двойката доказва наличието на видово несъответствие, независимо от откритите сходства. Разлика само от 2% в Г+Ц се използва в таксономията за отделянето на два щамове в различни родове.



### *5.7.2. Реасоциация и хибридизация на нуклеотидните бази*

Двойно верижната ДНК би могла да бъде разделена до единични вериги. Едноверижната ДНК от два представителя на един клон, реасоциират бързо и образуват дуплекс, като базите от едната верига са комплементарни на тези от другата верига. Единични вериги от различни щамове могат да се свържат в хибридни дуплекси, чиято подреденост зависи от това, колко сходна е последователността в базите им. Процентът на сходство между последователността на базите може да бъде изчислен.

В таксономията на дрождите се използва съотношението ДНК/ДНК хибридизация. Когато сходството е над 80 %, това е индикатор за наличие на представители от един и същи вид. Методът не е подходящ за установяване на по-далечно родство, тъй като по слабото сходство не е особено надеждно. Последователността на базите при рибозомалните РНК – (рРНК) и на определящите ги ДНК – (рДНК), се променя по-бързо в хода на еволюцията, отколкото последователностите на базите в ядрените ДНКи. Това е причината за наличието на висок процент на хибридизация между рибозомална РНК от един вид и ядрена ДНК (в това число и рибозомална ДНК) от друг вид, който е слабо сходен с първия. ДНК/рРНК хибридизацията се използва за приобщаване на вид към род или към по-висок таксон. Реасоциацията на нуклеиновите киселини също е основен метод в таксономията. Изолира се ДНК последователност от изследвания щам или вид. ДНК последователността се мултиплицира посредством клониране и се бележи с  $P^{32}$  или с друго химично съединение, което предпазва базите от колориметрична реакция. Единична верига от ДНК хибридизационната проба ще асоциира с ДНК от целевия организъм и хибридна ДНК може да бъде определена посредством авторадиография или колориметрично. По този начин може лесно да се открие наличие на патогенен щам, без да е задължително да се изолира чиста култура.

### 5.7.3. *Полиморфизъм в дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP)*

RFLP може да се използва за изготвяне на дендрограми, които доказват сходство вътре във вида. Сравняват се ядрени и митохондриални ДНК (мДНК) фрагменти, чието сравнение доказва разлики в близкородствени видове и щамове.

### 5.7.4. *РНК последователност*

Рибозомите притежават малки РНК (рРНК) молекули, които се разделят по седиментационния им коефициент (S) след центрофугиране. Митохондриалните рибозоми при бактериите съдържат 5S, 16S и 23S РНКи. РНКите представени в цитоплазмата на еукариотите са 5S, 5,8S, 18S и 28S, като при гъбите, са по малки, между 17S и 25S. Това създава известни затруднения, тъй като 17S РНК при гъбите е понякога се отнася като 18S, а понякога като 16S. Част от нуклеотидните последователности на рРНК молекули в цитоплазмата са слабо вариабилни при еукариотите. Други, показват висока степен на вариабилност при по-високо стоящите таксони – семейства и класове. РНК последователностите се транскрибират от рДНК. Тези последователности обаче, се елиминират преди РНК да се инкорпорира в рибозомите, като нетранскрибираните рДНК последователности стават силно вариабилни. Информацията, съсредоточена в рибозомалните РНК последователности, се използва при класификацията на гъбите. РНК може да се изолира директно от рибозоми, докато ДНК може да бъде амплифицирана чрез PCR. Известна е пълната нуклеотидна последователност на около 1800 17S РНК при някои гъби. Случайно избрани последователности от изследвани гъбни проби биха могли да бъдат определени чрез RFLP анализ. При някои гъбни видове са изучени и силно вариабилните ядрени рибозомални рДНК и митохондриални рибозомални – ДНКи. Данните от тези анализи се обработват посредством методи от нумеричната таксономия.

# ПРАКТИЧЕСКИ УКАЗАНИЯ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ГЪБИ

## *Приложение 1: Принципи и основни морфологични / физиологични характеристики*

### 1. Въведение

При идентифицирането на плесенни гъби се вземат под внимание голям брой критерии. Те включват морфология, културални характеристики, термотолерантност, резистентност към циклохексимид, диморфизъм, изисквания към хранителната среда, протеолитична активност и хидролизиране на урея. Съвременните класификационни схеми наблягат повече на онтогенезата на конидиите, отколкото на цвета, септирането на конидиите и растежа върху естествени субстрати. Счита се, че характеристиките, които се променят в зависимост от състава на хранителната среда и условията на култивиране или са субективни, напр. цвят, не са достатъчно надеждни като самостоятелни критерии в класификацията на плесенните гъби.

Болшинството филаментозни фунги, които се изолират в клинични лаборатории, спадат към клас *Hyphomycetes*, включващ всички филамозни, спорулиращи представители на *Fungi Imperfecti* освен видовете от *pusnidia*, *acervuli* и *sporodochia*.

Представителите на *Zygomycetes*, *Ascomycetes* и *Basidiomycetes* образуват характерни спори в резултат от процесите плазмोगамия, кариогамия и мейоза. Хетеротализмът, при който се изискват два мейтинг типа, е по-разпространен от хомотализма. Ето защо в клиничните лаборатории рядко се откриват зигоспори, аскоспори, т.к. обикновено се изолира само един мейтинг тип.

## 2. Основни характеристики

Характеристика	Описание
<b><u>ZYGOMYCETES</u></b>	
<b>Спорангий</b>	Типично за безполовото размножаване при зигомицетите е образуването на клетка с формата на торбичка, наречена спорангий. Целият обем на спорангия се разчленява на спори. Спорангий, в който спорангиоспорите са подредени в редичка, се нарича мероспорангий. Редуцираните спорангии, съдържащи само една или няколко спорангиоспори, се наричат спорангиоли.
<b>Колумела</b>	Колумелата е малка стерилна куполовидна област на върха на спорангиеносеца.
<b>Апофизи</b>	Апофизи се наричат удебеленията на спорангиеносеца в местата на сливане с колумелата.
<b>Коларет</b>	Като коларет (“якичка”) се означават фрагментите от стената на спорангия, които остават прикачени към мястото на свързване с колумелата и спорангиеносеца след разкъсването или разтварянето на спорангия.
<b>Столони</b>	Някои зигомицети образуват столони – вегетативни хифи, наподобяващи мустачета. Столоните и връзката им с произхода на спорангиеносеца и разположението на ризоидите са един от белезите, които се използват за разграничаване на няколко рода. Мястото, където столонът допира субстрата, се нарича възел, а дъгата, образувана се между два съседни възела – междувъзлие. Ако се образуват ризоиди, това обикновено става при възлите. В едни случаи спорангиеносците възникват при възлите, а в други – само от междувъзлията или от въздушните хифи.
<b>Големина на хифите</b>	Диаметърът на хифите е добър критерий за разграничаване на зигомицетите от други гъби. Типично за хифите на зигомицетите е слабо септиране, неравномерно разклоняване и променлив диаметър от 10-15 $\mu\text{m}$ .

<b>Култивиране</b>	При култивиране зигомицетите са жълто-кафяви до сивочерни на цвят и имат власат вид. Имат бърза скорост на растеж и изолати като <i>Rhizopus</i> и <i>Syncephalastrum</i> могат да изпълнят една епруветка само за няколко дни.
--------------------	---

<b>Характеристика</b>	<b>Описание</b>
<b><u>ASCOMYCETES</u></b>	
<b>Аскус</b>	Характерно за аскомицетите е образуването на клетки с формата на торбичка, наречени аскуси, които обикновено съдържат осем аскоспори. Аскусите могат да се образуват в специализирано плодно тяло, наречено аскокарп.
<b>Аскокарп</b>	Образуването на централната част на аскокарпа е много важен критерий за разграничаване на различните типове от тази структура. Съществуват няколко основни типа аскокарпи (наречани още аскоми)
<b>Аскоми:</b>	
<b>Гимнотеций</b>	Объл аскокарп с рехава мрежа от хифи, обвиващи безразборно разположени аскуси. Няма естествен отвор, нито остиола. В зависимост от вида може да има или да няма израстъци под формата на четинки, конидии и др. Този тип аскокарп е характерен за Gymnoascaceae.
<b>Клейстотеций</b>	Объл аскокарп без остиола. Аскокарпът има перидиум, състоящ се от добре организиран мембрано-подобен слой от клетки, които обвиват безразборно разположени аскуси.
<b>Перитеций</b>	Объл до колбовиден аскокарп. Обикновено с ясно видима остиола, от която излизат аскоспорите. Аскусите са разположени или в химениум, или в базална хрстовидна структура.
<b>Апотеций</b>	Открит дисковиден или чашковиден аскокарп с или без стълбче. Аскусите се развиват върху открития химениум. Появата на апотеции не е типична за клиничните лаборатории.
<b>Аскострома</b>	Аскокарп с кухина (локула), която се разтваря или се

	<p>образува чрез свиване в строма. Аскусите са формират в кухината впоследствие. Аскусите в аскостромата са двойно покрити. Появата на аскостроми не е типична за клиничните лаборатории. Когато присъстват, е възможно да бъдат сбъркани с перитеции.</p>
--	--

Характеристика	Описание
<b><u>BASIDIOMYCETES</u></b>	
<b>Дикариотност</b>	Уникално за базидиомициетите е, че вегетативните им клетки са двуядрени (n+n). Повечето базидиомицети поддържат дикариотното състояние с помощта на “кламп” (затягащи) връзки и специализирани септи, наречени долипорни септи, които понякога пречат на преминаването на ядра от една клетка в друга.
<b>“Кламп” връзки</b>	“Кламп” връзката е специализиран хифен мост, който позволява протичането на едновременна митоза на двете ядра, така че да се запази дикариотното състояние във всички клетки на хифата.
<b>Базидиоспори</b>	С разрастването на базидиума настъпва кариогамия, в резултат на което се получава ядрото на зиготата. Диплоидното ядро встъпва в мейоза, при което се образуват четири хаплоидни ядра. Обикновено на горната страна на базидиума се образуват четири стеригми. С разрастването на връхчетата им започва обособяването на базидиоспорите. По едно хаплоидно ядро мигрира до всяка развиваща се базидиоспора по съответната стеригма. Основата на спорите се запечатва и с узряването им там се събира капчица вода. Щом капчицата достигне определени размери, всяка базидиоспора се освобождава активно от стеригмата си. Освен някои отровни гъби, гъбите с медицинско значение рядко образуват базидии и базидиоспори в базидиокарпи.

<p><b>Патогенни базидиомицети</b></p>	<p>От практическа гледна точка, в клиничните лаборатории рядко се срещат фунги, за които може да се докаже, че са базидиомицетни, т.к. повечето изолати са хетероталични. Тези фунги могат да се разпознаят по наличието на “кламп” връзки, или, специално за р. <i>Rhizoctonia</i> и р. <i>Sclerotium</i> – по голямото количество склероции в културата.</p>
---------------------------------------	--

Характеристика	Описание
<b><u>MYCELIA STERILIA</u></b>	
<p><b>Стерилни изолати</b></p>	<p><i>Mycelia Sterilia</i> е формален разред, включващ филаментозни фунги, които остават “стерилни” въпреки опитите за индуциране на конидио- или спорообразуване. “Стерилните” изолати представляват видове фунги, които не образуват конидии, спори, пикнидии, аскокарпи или базидиокарпи, поради несъвместимост, липса на подходящи условия за култивиране и хранителни съставки, или и двете. В редки случаи тези фунги са опортюнистични патогени по човека. Ако има съмнения, че даден изолат причинява заболяване, от съществено значение е да се направи опит за индуциране на конидии, спори или плодни тела с цел да бъде идентифициран. Няма обаче универсална хранителна среда или набор от условия за култивиране, които биха могли да стимулират конидиогенеза или спорогенеза. Трябва да се изпитат различни хранителни среди и различни техники, за да се открие най-благоприятната комбинация от фактори. Т.к. болшинството представители на <i>Mycelia Sterilia</i> не представляват клиничен интерес, не е рационално от практическа гледна точка да се изразходват време и средства в опити за индуциране на спорулация. Изолатите по-скоро трябва да се изследват за резистентност към циклохексамид и за способност за растеж при 35-37°C.</p>

Характеристика	Описание
<b><u>FUNGI IMPERFECTI</u></b>	
<b>Телеоморфи/ анаморфи</b>	<p>При имперфектните гъби не се наблюдават “перфектните” стадии телеоморфите). В микологията има две различни системи за класификация: една за половите стадии или телеоморфите и втора за безполовите форми или анаморфите. Цялата гъба, включваща всичките анаморфи и телеоморфа, се означава като холоморф. Миколозите класифицират телеоморфите за отразяване на филогенията с цел да се определят родствените връзки между отделните групи. Анаморфите се класифицират в групи, които не разкриват и не предполагат филогенетично родство, наричани формални таксони, формални класове, формални разреди, формални семейства, формални родове и формални видове.</p> <p>Някои имперфектни гъби могат да образуват полови структури при подходящи условия. Когато съществува телеоморф, точното наименование се определя от половия стадий. Наименованието на плейоморфните гъби, които могат да имат множество различни анаморфи, се отдава на най-отличителния, характерния, често срещан и стабилен анаморф.</p>
<b>Плодни тела</b>	<p>Филаментозните представители на Fungi Imperfecti се различават по наличието или отсъствието на плодни тела. Към клас Coelomycetes спадат два разряда: Melanconiales, който образуват ацервули и Sphaeropsidales, които образуват пикнидии. Вторият клас е Hyphomycetes и към него спадат болшинството филаментозни фунги, които се изолират в клиничните лаборатории. За класификация на Hyphomycetes са разработени много схеми. Ключовете, основаващи се на онтогенезата на конидиите са с по-ниска степен на субективност от тези, налягащи на подредбата и цвета на конидиеносците и конидиите.</p>



### **3. Протоколи за идентификация**

<b>№</b>	<b>Процедура</b>
<b><u>ZYGOMYCETES</u></b>	
1	Изгответе свеж микроскопски препарат от зигомицетния изолат. Разгледайте под микроскоп на малко и голямо увеличение. Зигомицетите могат да се отличат по слабо септираните хифи с променлив диаметър (10-15µm).
2	Наблюдавайте петрито или епруветката под бинокулярна лупа. Ризоидите, столоните и възлите се анализират по-добре при по-малко увеличение..
3	Ако не сте успели да идентифицирате зигомицетния изолат, изгответе мини инкубационна камера. Внимателно разгледайте както покривното стъкло, така и предметното.
4	Ако при пресяване културата остава стерилна, заложете петри с гладен агар за индуциране на спорулация и за отхвърляне на вероятността изолатът да принадлежи към р. <i>Arophysomyces</i> и р. <i>Sacksenae</i> .
5	Ако имате предположение за <i>Rhizomcos</i> sp., трябва да проведете тест за термотолерантност.
6	Изолати от клинично значими случаи, които не съответстват на нито един от известните представители зигомицети, трябва да се изпратят в референтна лаборатория за идентификация или потвърждение чрез кръстосване или антигенни тестове.

<b>№</b>	<b>Процедура</b>
<b><u>ASCOMYCETES</u></b>	
1	Прегледайте колонията за образувания, видими с просто око, напр. аскокарпи. Аскокарпите са наблюдават добре под бинокулярна лупа.
2	При наличие на зрели аскокарпи използвайте

	бактериологична игла, за да отделите няколко аскокарпа в различни стадии на развитие. Поставете ги в лактофенол. Сложете покривно стъкло и наблюдавайте под светлинен или фазово-контрастен микроскоп..
3	Аскусите и аскоспорите се отделят от аскокарпа след леко потупване с молив по покривното стъкло. Акусите на голям брой родове са краткотрайни структури (размиват се при узряване). Затова морфологията на акусите при такива изолати трябва да се анализира върху млади, неузрели аскокарпи.

№	Процедура
<b><u>FUNGI IMPERFECTI – клас Hyphomycetes</u></b>	
1	Изгответе свеж микроскопски препарат от мицела върху капка лактофенол
2	Наблюдавайте под микроскоп
3	Отбележете видимите структури като конидии, конидиеносци, тяхната морфология, подредба и онтогенеза. Ако не сте успели да идентифицирате тези структури, изгответе мини инкубационна камера. Забранява се използването на такава техника при работа с предполагаеми представители на <i>Coccidiodes</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Paracoccidiodes</i> и <i>Xylohypha bantiana</i> .
4	Идентифицирате фунгите до родово ниво според критериите, използвани в това Приложение.
5	В повечето случаи изолатът ще се идентифицира от първичния инокулат върху петри. Ако не е настъпила спорулация, следвайте следния протокол:
5-1	При плесени от стерилни участъци или при морфология на колониите, наподобяваща диморф (колониите са се появили след 10 дена инкубация или са дрождеподобни, с ограничен растеж и/или бели и кожести), проведете тест

	за резистентност към циклохексамид, за потвърждаване на диморфизъм или ДНК проба за микроорганизма, който наподобява.
5-2	Пресейте върху петрита с картофено глюкозен агар (КГА) и култивирайте при 25-29°C. Повторно изгответе свеж микроскопски препарат или препарат върху лентичка тиксо според възникналата необходимост. В зависимост от морфологията на колониите и микроскопската морфология, проведете тест за термотолерантност и/или други тестове, които биха ускорили идентификацията.

## **4. Използвани техники при идентификацията на плесенни гъби**

### ***4.1. Характеристики на колониите***

<b>Характеристика</b>	<b>Описание</b>
<b>Получаване на култура</b>	За да изследвате характеристиките на колониите на филаментозни фунги, трябва да получите култура върху хранителната среда, върху която са били описани колониите. Такива среди са бирен агар, картофено глюкозен агар (КГА) или среда на Чапек-Докс (ЧД).
<b>Визуален преглед</b>	Визуалният преглед на колониите дава бърза и важна информация относно цвета, консистенцията, дифундиращи пигменти, ексудати, зони на растеж, въздушен и субстратен мицел, скорост на растеж, топография на колониите и различни структури, видими с просто око, напр. аскокарпи, пикнидии, склероции, спородохи и синемии.
<b>Микроскопиране</b>	Използването на бинокулярна лупа дава възможност да се направи връзка между макроскопските характеристики на колониите и микроскопските наблюдения.

#### 4.2. Потвърждаване на диморфизъм

Характеристика	Описание
<b>Диморфичен растеж и конверсия</b>	Диморфните фунги се характеризират с вегетативен растеж при 25°C като плесенните гъби и при 37°C (в тъкани или върху специални среди) като дрожди, сферули или нарастващи ендоспори. Такива представители са <i>Blastomyces dermatidis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Penicillium marneffeii</i> , и <i>Sporothrix schenckii</i> . За да се потвърди идентификацията на дадена плесенна гъба, за която се предполага, че може да принадлежи към диморфните фунги, плесенната ѝ фаза трябва да се конвертира в тъканна или да се детектира наличието на родово-видово специфични екзоантигени по метода на имунодифузията. Не е необходимо да се постигне тотална конверсия за доказване на диморфизма на даден изолат. Конвертирането на някои изолати може да е много трудоемко и да изисква многократно прекултивиране и специални хранителни среди.

№	Процедура
<b>Протокол за конверсия плесенна / дрождева форма</b>	
1	Темперирайте две епруветки с подходяща среда за конверсия на стайна температура, описана по-долу. Извършвайте всички последващи стъпки в стерилна атмосфера.
2	Използвайте бактериологична игла с дълга дръжка, за да прехвърлите малка част от изолата в две епруветки хранителна среда. Едната епруветка култивирайте на 37°C, а другата – на 25°C.
3	Всяка седмица преглеждайте епруветките за дрождеподобен растеж. Може да са необходими няколко седмици за настъпване на конверсия.

4	Изгответе свежи микроскопски препарати и прегледайте за присъствие на хифи и дрождеви клетки.
5	Положителен резултат: Плесенната гъба е конвертирала до типична дрождева морфология. Отрицателен резултат: Плесенната гъба не е конвертирала до дрождева фаза.
6	Качествена контрола: За проверка на използваната хранителната среда дадена известна култура се обработва паралелно на всяка конверсия.

Предполагам представител	Хранителни среди	Температура на култивиране
<i>Blastomyces dermatidis</i>	ВНІ с кръвен агар	35-37°C
<i>Histoplasma capsulatum</i>	ВНІ агар + глутамин или ВНІ с кръвен агар	35-37°C
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	ВНІ агар + 20% кръв	35-37°C
<i>Penicillium marneffeii</i>	ВНІ агар + 20% кръв	35-37°C
<i>Sporothrix shenckii</i>	ВНІ агар + 20% кръв	35-37°C, 5-10% CO <sub>2</sub>

#### 4.3. Потвърждаване на *Coccidioides immitis*

Ако за даден изолат се предполага, че е *C. immitis*, това трябва да бъде потвърдено чрез екзоантигенен тест. Вж. протокола за провеждане на екзоантигенен тест.

#### 4.4. Резистентност към циклохексимид

Характеристика	Описание
Резистентност към циклохексимид	Определянето на резистентността към циклохексимид (0,5 mg/ml) помага при скрининга на култури за <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Microsporium spp.</i> , <i>Paracoccidioides</i>

	<i>brasiliensis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> и <i>Trichophyton spp.</i> Всички тези представители се развиват в присъствие на циклохексимид при температура до 30°C, докато <i>Absidia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Scedosporium</i> и редица други фунги се инхибират от циклохексимид.
<b>Процедура</b>	С бактериологична игла вземете материал от междинната част (между центъра и периферията) на плесенната колония. Инокулирайте по едно петри с Mucosel и SAB. Култивирайте при 30°C в продължение на 7-10 дни.
<b>Резултат</b>	Резистентност – наличие на растеж върху хранителна среда с циклохексимид и SAB; Чувствителност – наличие на растеж върху SAB, липса на растеж върху хранителна среда с циклохексимид. При липса на растеж и върху SAB и върху среда с циклохексимид - повторете теста.
<b>Качествена контрола</b>	При всеки тест се прави паралелна обработка на чувствителен към циклохексимид представител с цел да се потвърди, че антибиотикът в средата, съдържаща циклохексимид, е активен.

#### 4.5. Активно освобождаване на конидии и спори

Характеристика	Описание
<b>Балистоспори</b>	Представители на родовете <i>Basidiobolus</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Sporobolomyces</i> и <i>Tilletiopsis</i> образуват балистоспори.
<b>Процедура</b>	Инокулирайте едно петри, съдържащо картофено глюкозен агар (КГА). Залепете това петри с лице към второ неинокулирано петри с КГА, така че повърхностите на двете хранителните среди да са обърнати една към друга. Култивирайте при 20-25°C в продължение на 2-3 дни, като поставите инокулираното петри отгоре. Ако се образуват балистоспори, върху неинокулираната повърхност ще се появи нов растеж под формата на огледален образ на първоначалната колония.

#### 4.6. *In vitro* тест с коса

Характеристика	Описание
<b>Дерматофити</b>	Голям брой дерматофити имат способността да проникват във вътрешността на косъма <i>in vitro</i> . Този тест е особено полезен за отдиференциране на атипични изолати <i>Trichophyton mentagrophytes</i> от <i>T. rubrum</i> .
<b>Процедура</b>	Поставете няколко стерилни косъма коса в стерилно стъклено петри. За предпочитане е да се използва руса детска коса. Прибавете 25 ml стерилна вода и 0,1 ml стерилизиран дрождев екстракт. Прехвърлете малко материал от гъбната колония върху космите коса. Култивирайте при 25°C и проверявайте ежеседмично в продължение на 4 седмици.е. Сложете няколко косъма коса в капка лактофенол върху предметно стъкло. Поставете покривно стъкло и наблюдавайте под микроскоп. Преди да се направи заключение за отрицателен резултат трябва да се прегледат няколко косъма.
<b>Резултати</b>	Положителен – наличие на перфорации (конични или клиновидни дупчици) в косъма; Отрицателен – липса на перфорации в косъма.
<b>Качествена контрола</b>	Паралелно се обработват известни изолати като контроли: Положителна – <i>T. Mentagrophytes</i> ; Отрицателна – <i>T. rubrum</i> .

#### 4.7. Хранителни тестове

Хранителните тестове могат да дадат изключително ценна информация за идентификацията на някои видове плесенни гъби, особено дерматофити. Основават се на тестиране на изолатите за изисквания към определени витамини.

Един примерен протокол за витаминни тестове включва следните процедури:

1. Подгответе инокулум като прекултивирате изолатите, подлежащи на изследване, в среда на Сабуро за 7-14 дена при 25°C.
2. С бактериологична игла прехвърлете върху средата за анализ малко материал от колонията, около 1 mm в диаметър. Старайте се да не прехвърлите и агар.
3. Култивирайте 7-14 дена при 25°C. При изследване на предполагаеми изолати *T. concentricum*, *T. schoenleinii* и *T. verrucosum* култивирайте 7-14 дена при 37°C
5. Отчетете тестовете и сравнете относителният размер на растежа във всяка отделна група тестове. Оскъден растеж се отбелязва с +, а максимален растеж – с 4+.

За провеждане на експеримента по отдиференциране на видовете *Trichophyton* се използват следните хранителни среди (търговски продукти на Difco, Детройт):

Наименование	Състав	
Казеинов агар	казеин, 10% киселинна хидролиза	25,0 ml
	глюкоза	40, 0 gm
	MgSO <sub>4</sub>	0,1 gm
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 gm
	агар	20,0 gm
	дестилирана H <sub>2</sub> O	до 1000ml
	pH 6,8	
Инозитол-казеин агар	2 ml сток разтвор инозитол в 100 ml стопен казеин агар. Крайна концентрация на инозитол 50 µg/ml.	
Тиамин-инозитол - казеин агар	2 ml от двата сток разтвора (тиамин и инозитол) в 100 ml стопен казеин агар.	
Тиамин-казеин агар	2 ml сток разтвор тиамин в 100 ml стопен казеин агар. Крайна концентрация на тиамин 0,2 µg/ml.	
Никотинова киселина - казеин агар	2 ml сток разтвор никотинова киселина в 100 ml стопен казеин агар.	



Амониев нитрат агар	Съставът е същият като този на казеиновия агар, но вместо казеин, 10% киселинна хидролиза, съдържа 1,5 gm NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .
Хистидин-амониев нитрат агар	2 ml сток разтвор хистидин в 100 ml стопен амониев нитрат агар.

Сток разтвори на витамини		
Тиамин	тиамин хидрохлорид	10,0 mg
	дестилирана H <sub>2</sub> O	1000 ml
Инозитол	инозитол	250,0 mg
	дестилирана H <sub>2</sub> O	1000 ml
Никотинова киселина	никотинова киселина	10,0 mg
	дестилирана H <sub>2</sub> O	1000 ml
Хистидин	l-хистидин	150,0 mg
	дестилирана H <sub>2</sub> O	1000 ml

Резултати*	
<i>T. verrucosum</i>	84% от изолатите изискват тиамин и инозитол, а 16% – само тиамин.
<i>T. concentricum</i>	50% от изолатите нямат изисквания за витамини; 50% се характеризират със засилен растеж в присъствие на тиамин.
<i>T. tonsurans</i>	Растежът е значително засилен в присъствие на тиамин.
<i>T. violaceum</i>	Растежът е значително засилен в присъствие на тиамин.
<i>T. equinum</i>	Растежът на 100% от изолатите изисква никотинова киселина.
<i>T. megninii</i>	Растежът изисква хистидин.

\* - Качествена контрола – Паралелно се обработват известни изолати *T. verrucosum* и *T. tonsurans*.

#### 4.8. Тест оризено зърно

Тестът стерилно оризено зърно дава полезна информация при отдиференциране на атипични изолати *Microsporium canis* от *M. audouinii*.

Характеристика	Описание
Протокол	Като използвате бактериологична игла с дълга дръжка, прехвърлете малко материал от изолата в колба, съдържаща стерилни зърна ориз. Култивирайте колбата при 30°C и отчитайте растежа в продължение на 8-10 дена.
Резултати	Положителен – Бърз растеж по зърната ориз, типично е образуването на множество конидии и на ярко жълт пигмент; <i>M. Canis</i> ; Отрицателен – Липса на растеж с или без кафяво обезцветяване на зърната ориз в мястото на инокулация; <i>M. audouinii</i> .
Качествена контрола	При всеки тест паралелно се обработват известни изолати <i>M. canis</i> и <i>M. audouinii</i>

#### 4.9. Лактофенолни препарати

Характеристика	Описание
<b><u>Свеж микроскопски препарат</u></b>	
Принцип	Свежият микроскопски препарат е най-разпространеният и бърз метод, използван за изготвяне на микроскопски препарат от фунги. При разчепкването на материала с бактериологична игла може конидиите или спорите да се откъснат от конидиообразуващите или спорообразуващите клетки. Ако даден изолат не може да бъде идентифициран със свеж микроскопски препарат, може да се наложи изготвяне на мини инкубационна камера
Протокол	Поставете капка лактофенол малко в страни от центъра на чисто предметно стъкло.

	<p>С бактериологична игла вземете малко материал от междинната част (между центъра и периферията) на плесенната колония и го поставете в капката лактофенол.</p> <p>С две бактериологични игли разчепкайте леко материала, така че да се разпредели на тънък пласт в лактофенола.</p> <p>Поставете едно покривно стъкло на периферията на капката лактофенол и бавно го спуснете върху покривното стъкло с някакъв остър предмет.</p> <p>Внимавайте да не се задържат въздушни мехурчета под покривното стъкло. Попийте излишния лактофенол от ръбчетата на покривното стъкло с хартиена салфетка.</p> <p>За да съхраните препарата, запечатайте ръбчетата на покривното стъкло с лак за нокти</p>
<b><u>Лактофенолен препарат върху лентичка тиксо</u></b>	
<b>Принцип</b>	<p>Изготвянето на препарат върху лентичка тиксо е лесен и бърз метод, използван при идентификацията на филаментозни фунги, тъй като повечето структури могат да се наблюдават интактни благодарение на лепкавата страна на тиксото. Както и при свежия лактофенолен препарат, материалът се потапя в разтвора, за да може безопасно да се борави с него извън стерилния бокс. Недостатъци на метода: тиксото постепенно се разтваря, което прави метода непригоден за трайни препарати; методът е приложим само за плесенни гъби, култивирани върху петрита.</p>
<b>Протокол</b>	<p>Отрежете лентичка прозрачно тиксо (3М 600, кат. № 07457-В), като придържате краищата между палеца и показалеца с лепкавата страна навън.</p> <p>Приближете пръстите си един към друг, така че лентичката тиксо да застане във формата на примка. Отворете петрито с другата ръка и притиснете тиксото към повърхността на колонията.</p> <p>Сложете капка лактофенол върху едно надписано</p>

	<p>предметно стъкло.</p> <p>Притиснете тиксото към капката лактофенол.</p> <p>Загладете лентичката тиксо върху предметното стъкло.</p> <p>Сложете още една капка лактофенол върху тиксото.</p> <p>Поставете голямо покривно стъкло (20x40 mm).</p> <p>Наблюдавайте под микроскоп.</p>
--	---

#### 4.10. Термотолерантност

Характеристика	Описание
<b>Принцип</b>	Термотолерантността е показател, който успешно може да използва като помощен критерии при идентификацията на няколко плесенни гъби с медицинско значение. На таблицата, по-долу са представени данни за термотолерантността на някои фунги с медицинско значение
<b>Протокол</b>	<p>Вземете малко материал от междинната част (между центъра и периферията) на плесенната колония.</p> <p>Инокулирайте две петрита. Препоръчват се среди като картофено глюкозен агар, царевичен агар или среда на Сабуро. Петритата, които се инкубират при висока температура, трябва да се запечатат с лента, пропускаща въздух, за забавяне на дехидратацията на средата.</p> <p>Култивирайте едното петри при 30°C, а другото – при висока температура.</p> <p>Периодично проверявайте растежа на културите.</p>
<b>Резултати</b>	<p>Положителен – растеж при 30°C и при високата температура; Отрицателен – растеж при 30°C, но не и при високата температура;</p> <p>При липса на растеж при 30°C – повторете теста.</p>
<b>Качествена контрола</b>	Този тест има присъща за себе си контрола. Термостатите трябва да бъдат внимателно нагласени на правилната температура преди започване на теста.

Представител	Горна температурна граница, °C
<u><i>Aspergillus fumigatus</i></u>	48-50
<u><i>C. carrionii</i></u>	35-36
<u><i>Fonsecaea pedrosoi</i></u>	38
<u><i>Phizomucor pusillus</i></u>	45-55
<u><i>Trichophyton mentagrophytes</i></u>	37
<u><i>Wangiella dermatitidis</i></u>	40
<u><i>Xylohypha bantiana</i></u>	42-43

#### 4.11. Хидролиза на урея

Характеристика	Описание
<b>Принцип</b>	Хидролизата на урея обикновено се използва за отдиференциране на <i>Trichophyton mentagrophytes</i> от <i>T. rubrum</i> . Тестът хидролиза на урея не е дефинитивен, но предоставя допълнителна информация, която може да помогне при идентифицирането на атипични изолати <i>Trichophyton mentagrophytes</i> и <i>T. rubrum</i> . Обикновено <i>T. mentagrophytes</i> дава положителна реакция след 7-8 дена, <i>T. rubrum</i> – отрицателна. Понякога обаче се срещат и уреазо-положителни изолати <i>T. rubrum</i> . От критично значение е да се работи с чиста култура и да няма бактериално замърсяване.
<b>Протокол</b>	С бактериологична игла вземете материал от междинната част (между центъра и периферията) на плесенната колония. Инокулирайте епруветка с Кристенсен урея агар. Култивирайте инокулирания кос агар 8 дни при 25-30°C, както и една неинокулирана епруветка.
<b>Резултати</b>	Положителен – промяна на цвета до розово-червено; Отрицателен – жълто, без промяна в цвета. Неинокулираната контрола трябва да даде отрицателен резултат.

<p><b>Качествена контрола</b></p>	<p>При всеки тест се обработват аналогично известни изолати като положителна и отрицателна контрола. Освен това паралелно се инкубира една неинокулирана епруветка като индикатор, че не настъпва промяна в рН на индикаторната система с фенол рот под въздействие на атмосферните газове.</p> <p>Положителна – <i>T. Mentagrophytes</i>; Отрицателна – <i>T. Rubrum</i>;</p>
-----------------------------------	--

#### 4.12. Екзоантигенен тест

Характеристика	Описание
<p><b>Принцип</b></p>	<p>Екзоантигенният тест е специфичен имунофузионен (ИД) тест, разработен за получаване на бърза информация за имуноидентифициране на неизвестни изолати. Методът се основава на реакция на концентрирани разтворими антигени на даден изолат спрямо дублирани контролни реагенти за всички системни фунги. Тестът използва шест дневна или по-стара култура от неизвестния организъм на кос агар, която се подлага на екстракция в мертиолатен разтвор за една нощ, след което се концентрира 25-50х. Концентратът се накапва в две от периферните кладенчета на хексагонална ИД матрица, а концентрат от една от основните гъби (контролен антиген) се пипетира в горната и долната част на ИД матрицата. Неизвестните и контролните проби реагират с антисерум срещу даден контролен антиген. Тестът се отчита след 24 ч., като появата на линия(и) на идентичност с положителната контрола е индикация за положителен резултат</p>
<p><b>Предимства</b></p>	<p>Методът има предимства в няколко аспекта. Може да се получи окончателна идентификация до 24 ч. след поява на характерна морфология върху косия агар (т.е. 6-10 дена), което спестява допълнителните две до шест</p>

	<p>седмици изчакване, необходими за конверсия до тъканна фаза. Могат да бъдат получени екстракти от представители на <i>Mycelia Sterilia</i>, т.е. организми, които не образуват различни кондии и да бъдат определени флогенетичните им връзки с основните гъби. Това е от особена важност, т.к. понякога първичните изолати <i>Histoplasma</i>, <i>Blastomyces</i> и <i>Coccidioides</i> нямат характерната микроскопска морфология. Освен всичко това, тестът може да бъде провеждан във всяка лаборатория, разполагаща със стерилен бокс и необходимите контролни реактиви, с което се избягва чакането на краен потвърдителен резултат от референтна лаборатория.</p>
<b>Протокол</b>	<p><u>Приготвяне на ИД агар (1% фенолизиран агар, рН 6,3-6,4)</u></p> <p>Налейте 50,0 ml дестилирана вода в една 125-милилитрова ерленмайерова колба с тапа.</p> <p>Добавете в колбата 0,9 gm натриев хлорид и 0,4 gm натриев цитрат. Двете соли трябва да се разтворят напълно.</p> <p>Прибавете 0,25 ml течен фенол (90% w/w) и 7,5 gm глицин. Разбъркайте интензивно.</p> <p>Добавете 1,0 gm пречистен агар (Difco) и долейте до 100 ml с дестилирана вода.</p> <p>Автоклавирайте 10 мин. При 120°C. (Преди автоклавиране тапата на колбата трябва да се разхлаби).</p> <p>Крайното рН на агара трябва да е 6,3-6,4. Ако се налага, коригирайте го.</p>
<b>Изготвяне на плаки за имунодифузия</b>	<p>За приготвяне на микро ИД плаката се отпипетират 6,5 ml стопен глицин-фенол агар (60-65°C) в пластмасово петри с размери 100x15 mm. Това е базалният слой.</p> <p>Базалният слой се оставя да изстине за поне 30 мин.</p> <p>Върху едната страна на втвърдения базален слой се отпипетират 3,5 ml горещ глицин-фенол агар. В горещия</p>

	<p>агар веднага се потапя една микроимунодифузионна матрица (17-7 кладенчета) и се притиска надолу, така че да не се образуват въздушни мехурчета. С това прикрепя матрицата се прикрепя към базалния слой.</p> <p>Преди да може да се използва плаката се оставя да престои поне 30 мин.</p> <p>След застиване на агара, излишният агар се остъргва от матрицата с едномилметрова шпатула. Почистването на излишния агар от кладенчетата се улеснява, ако плаките се оставят за още 5-10 мин. в хладилник.</p>
<b>Екстракция на екзоантигени</b>	<p>Добре развита култура с поне 15x30 mm растеж на полегат агар на Сабуро (в епруветка 20x150 mm, съдържаща 10 ml агар) се покрива с 8-10 ml 1:5000 воден разтвор Тимерозал. За целта се използва пипета Пастъор. За да протече екстракция, разтворът се оставя да престои поне 24 ч. на стайна температура.</p> <p>След това 5 ml от всеки клетъчен екстракт се прехвърлят с пипета Пастъор в концентратор Amicon Minicon macrosolute B-15. Една капка от оставащия екстракт се на капва върху произволна хранителна среда като тест за стерилност.</p> <p>От убитите култури се изготвя свеж препарат.</p> <p>Екстрактите от култури, образуващи артроконидии и за които се предполага, че са <i>C. immitis</i>, се концентрират 25x.</p> <p>Екстрактите от култури, образуващи туберкулирани макроконидии и за които се предполага, че са <i>H. capsulatum</i>, както и тези с крушовидни микроконидии, характерни за плесенната фаза на <i>Blastomyces dermatitidis</i>, се концентрират 50x.</p> <p>Културите без характерни конидии се тестват за антигени спрямо трите патогена.</p>



<p><b>Провеждане на теста</b></p>	<p>В централното кладенче на матрицата се накарпа контролен антисерум. Преди да се премине към следващата стъпка, серумът трябва да се остави за 1 ч. на стайна температура, за да дифундира.</p> <p>Контролните антигени се накарпат в горните и долните кладенчета, а неизвестните супернатантни антигени – в по две странични кладенчета от същата страна. Екстрактите от една и съща култура трябва да се накарпат от една и съща страна на контролния антиген, т.к. ако съдържат някой силен антиген, могат да дадат толкова интензивна реакция, че да се получи фалшив слабо положителен резултат за даден отрицателен екстракт в съседно кладенче.</p> <p>Заредените ИД плаки се инкубират 24 ч. при стайна температура във влажна атмосфера.</p> <p>След изтичане на тези 24 ч. ИД матриците внимателно се отстраняват. Повърхността на агара се промива и покрива с дестилирана вода, след което плаките се отчитат. Ако реакциите не се виждат ясно, излишният агар може да се промие от повърхността на плаката, след което плаката да се покрие отново с дестилирана вода и да се отчете наново.</p>
<p><b>Интерпретация</b></p>	<p>Даден изолат се идентифицира като <i>Histoplasma capsulatum</i>, когато концентрираният му екстракт съдържа антигени идентични (линии на идентичност) с Н или Н и М преципитиногените; като <i>Blastomyces dermatitidis</i>, когато се появяват линии на идентичност между контролните реагенти за <i>Blastomyces</i> и неизвестните. Даден изолат се идентифицира като <i>C. immitis</i>, когато концентратът му дава линии на идентичност с положителните реагенти към тубуларния преципитиноген (ТР), термолабилния преципитиноген (НЛ), или термолабилния F преципитиноген (CF).</p>

#### 4.13. Мини инкубационна камера

Характеристика	Описание
<b>Принцип</b>	Акуратната идентификация на филаментозните плесенни гъби се основава на микроскопско наблюдение на спорулиращите части на колонията. Свежите микроскопски препарати са полезни в много отношения, но имат два основни недостатъка: 1) ако е поставен прекалено много материал, ако не е добре разчепкан или ако е взет от неспорулираща област, откриването на спорулиращи структури може да се затрудни. 2) Често спорите и конидиите могат да се разрушат при изготвянето на препарата. Мини-инкубационната камера предлага оптимални условия за спорулация. Тя дава възможност да се наблюдават различни стадии от развитието на колонията и по-голям шанс за запазване на естественото разположение на спорите и конидиите върху спорулиращите структури.
<b>Материал и проверка на качеството</b>	За изготвянето се използват живи култури. Наличието на растеж е доказателство за това, че мини-инкубационната камера е била заложена правилно
<b>Протокол</b>	Пригответе стерилни петрита за мини-инкубационната камера както следва: покрийте дъното на едно стъклено петри със същия диаметър филтърна хартия; поставете една V-образна огъната стъклена тръбичка върху филтърната хартия и покрийте с чисто предметно стъкло. Сложете върху филтърната хартия едно покривно стъкло 22x22 mm (или 24x40 mm за бързо растящи фунги); затворете капачето на петрито и автоклавирайте 25 мин. при 121°C; може няколко петрита за микроскопски култури да се стерилизират предварително, след което да се съхраняват в метален контейнер. Препоръчително е да се използват стъклени петрита, защото запазват влагата по-

	<p>добре и в тях има повече място за „маневриране”.</p> <p>Изберете среда, която индуцира спорулация при изследвания представител. Препоръчват се Pablum Cereal агар и картофено глюкозен агар, защото стимулират спорулацията при <i>Hyphomycetes</i>. Pablum Cereal агар има мека консистенция, която благоприятства доброто прилепване към стъклените повърхности. При леко притискане агареното блокче се сплесква леко и въздушните мехурчета излизат навън. Средите с по-твърда консистенция, като картофения декстрозен агар, трябва да се нарязват на тънки гладки блокчета. Прекомерният натиск върху агареното блокче може да го напука, при което ще се получи фрагментиран препарат.</p> <p>Разлейте агара на тънък слой в стерилно пластмасово петри и изрежете блокче агар с размери 2 mm<sup>2</sup> и дебелина около 1 mm. Поставете агареното блокче върху предметното стъкло.</p> <p>През цялото време работете стерилно. С твърдо йозе вземете малко материал от спорулиращата част на колонията и инокулирайте блокчето на 2-3 места. С пинсета сложете отгоре покривното стъкло и притиснете внимателно.</p> <p>Овлажнете филтърната хартия с 1-2 ml стерилна дестилирана вода, затворете петрито, култивирайте и редовно следете за настъпване на спорулация, като наблюдавате препарата под бинокуляр или под микроскоп. При нужда добавяйте още вода за поддържане на влагата на препарата. Контактът между стъклото и агара и влажната атмосфера стимулират растежа на хифите по стъклото. Не бива да се прекалява с добавянето на вода, защото по капачето на петрито може да се образува конденз и да се стече върху препарата. Наблюдавайте мицела, когато започне да спорулира, но преди да е изцяло</p>
--	---

	<p>обрасъл покривното стъкло (обикновено между 7-21 дена). Могат да се изготвят и трайни микроскопски препарати, но за целта се използва специална среда, напр. глицериново желе или поливинилов алкохол. Препаратите, изготвени с тези среди, трябва да се подгреят малко върху топъл котлон, за да се залепи покривното стъкло, да излязат въздушните мехурчета и средата да се разстели по краищата на препарата. Полу-трайни микроскопски култури могат да се изготвят и с лакто-фуксин, като покривното стъкло се залепя с лак за нокти. Не трябва да има никакви въздушни мехурчета.</p> <p>Преди да се наблюдават под микроскоп системните патогени трябва да бъдат убивани с формалдехид. <b>Да не се прави без предварителното съгласие на ръководителя или консултанта.</b></p> <p>За да наблюдавате покривното стъкло, трябва внимателно да го отлепите с пинсета от агареното блокче. Омокрете областта на растеж, подсушете и поставете върху капка среда на чисто предметно стъкло, така че хифите да са от долната страна. С покривното стъкло трябва да се борави внимателно, за да не се разкъса препаратът.</p> <p>За да наблюдавате предметното стъкло, трябва да го придържате с пинсета докато с йозето махнете блокчето агар. Намокрете областта на растеж и подсушете. Почистете обратната страна и долната и горната част на предметното стъкло с кърпичка, потопена в дезинфектант, като внимавате да не повредите областта на растеж. Капнете в центъра малко среда и поставете покривно стъкло.</p> <p>Надпишете препаратите с водонеразтворим маркер. Посочете идентификационното име или номер и всички необходими детайли, като например използваната среда, възрастта и това, че е мини култивационна камера.</p>
--	--

Приложение 1:  
Принципи и основни морфологични / физиологични характеристики

<b>Резултати</b>	Ще може да се наблюдава спорулацията на микроорганизмите, като типовете конидиогенеза ще се виждат ясно и ще могат да се изучават.
------------------	--

## **Приложение 2:** **Електрофоретичен анализ на белтъци**

### **1. Въведение**

Изолатите на различни гъби се характеризират с различна относителна електрофоретична подвижност на клетъчните си белтъци. Миграцията на белтъците, в условия на електрофореза, при прилагането на електричен заряд, се определя от тяхната аминокиселинна последователност, която от своя страна се определя от алелната последователност на съответните им локуси в структурните гени. Различната електрофоретична подвижност ги определя като различни алозими (електроморфи) на един и същ белтък.

Първоначалните изследвания през 1968 година върху белтъчния полиморфизъм при бактериите не били много показателни и нямали особено таксономично значение. По-късно обаче, с развитието на техниката, било възможно охарактеризирането на голям брой белтъци (ензими) при множество различни щамове, което дало възможност за прегрупирането им в различни таксони.

При еукариотите, мултилокусните белтъчни електрофоретични изследвания първоначално са били използвани в популационната генетика на *Drosophilla* spp., но напоследък все по-широко се прилагат и при изучаването на почти всички групи.

Анализът на генетичната структура на естествените популации изисква ефективен метод за определяне на множество различни хромозомни локуси. Въпреки че е възможно установяването на ДНК секвенциите (чрез директен или рестрекционен анализ), при наличие на голям брой проби от различни изолати, за охарактеризиране на мултилокусните генотипове се предпочита използването на белтъчните електрофорези. Предимството на този тип анализи е че разликите в електрофоретичната подвижност могат да бъдат директно свързани с алелни вариации на специфичен ген, кодиращ определен ензим.

## **2. Протокол**

### ***2.1. Получаванена безклетъчен екстракт***

Един от методите за получаване безклетъчен екстракт от гъби е чрез механично стриване на събраната биомаса от изолата. Към 1-3 гр. свежа биомаса се прибавят кварцов пясък и 0,05М калиево-фосфатен буфер (рН 7,8) в отношение 1:3:1. Стриването се извършва в лабораторно хаванче на лед, осемкратно по 10 мин. и заливане с течен азот. Полученият екстракт се центрофугира за 10 мин. при 4500 об./мин. и температура 4°C. След отделянето на утайката, съдържаща кварцовия пясък, клетъчни органели и неразрушени хифи, супернатантата отново се центрофугира за 20 мин. при 12000 об./мин. и температура 4°C. Така полученият безклетъчен екстракт се съхранява при температура -18°C.

### ***2.2. Определяне на белтък***

За използването на белтъчните електрофоретични методи при охарактеризирането на различни гъбни изолати е необходимо да се знае какво е количеството на белтъците в безклетъчния екстракт. Един от начините за определяне на белтъчна концентрация е чрез определяне на образуваната комплексна сол между медта и ароматните аминокиселини – тирозин и триптофан, който комплекс дава синьо оцветяване при взаимодействие с реактива на Фолин. На този принцип е основан и широкоизползвания метод на Lowry.

#### **Реактиви:**

- реактив "А" - 2 % разтвор на  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0.1 N NaOH
- реактив "Б" - 1 % разтвор на  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- реактив "В" - 2 % разтвор на калиево - натриев тартарат
- реактив на Фолин: разрежда се с дестилирана вода, непосредствено преди работа в отношение 1:1

Приготвяне на реакцианна смес: Реактив “С” се приготвя непосредствено преди работа като се смесват 100 мл. реактив “А”, 1 мл реактив “Б” и 1 мл реактив “В”

Ход на определяне: В епруветки се отпипетират 0.2 мл безклетъчен екстракт, подходящо разреден и към него се прибавят 1 мл. реактив “С”. Епруветките се инкубират 10 мин на стайна температура, след което се добавят 0.1 мл. реактив на Фолин. Пробите престояват 30 мин на стайна температура до образуването на синьо оцветяване, след което се измерват на спектрофотометър при дължина на вълната 750 нм, червен филтър в 0.5 см<sup>3</sup> кювети, срещу контрола дестилирана вода, обработена паралелно. Резултатите се отчитат по стандартна крива, получена с говежди серумен албумин (Pentex).

### **2.3. Провеждане на електрофореза в денатуриращи условия**

2.3.1. *Приготвяне на плаки за 10% SDS (натриев додецил сулфат) полиакриламидна гел електрофореза (PAGE).*  
Използва се метода на Laemmli (1970).

Състав на гела: виж Таблица 1.

Таблица 1.

Реактив	Сток разтвор	Количество (мл)	
		Разделящ гел	Концентриращ гел
Акриламид-бисакриламид (AA – БАА)	30% AA + 0,8% БАА	3,33	0,67
Буфер за разд. гел	1,5M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5	-
Буфер за конц. гел	0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1,25
SDS	10% SDS	0,1	0,05



H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	4,0	3,0
Амониев персулфат (АП)	10% АП	0,05	0,025
ТЕМЕД	ТЕМЕД	0,005	0,005

**ВНИМАНИЕ! Акриламидът и ТЕМЕД са токсични за човешкия организъм! При работа да не се инхалират и да не се работи с незащитени с ръкавици ръце!**

Използва се система за вертикална акрилаамидна електрофореза. След полимеризирането на концентриращият и разделящият гел, те могат да се съхраняват до 24 часа в 4 пъти разреден с вода буфер (1,5M Tris/HCl, pH 8,8) при температура 4°C.

Обработка на пробите:

Преди нанасянето на пробите от безклетъчния екстракт, те трябва да бъдат така обработени, че съдържащите се в тях белтъци да денатурират. За целта към тях се прибавя буфер в отношение 5:1. Буферът за обработка на пробите е със следния състав:

- 0,35M Tris/HCl, pH 6,8
- 10% SDS
- 30% глицерол
- 10% 2-меркаптоетанол
- 0,02 мг/мл бром фенол блу

Буферът съдържа маркерно багрило (бром фенол блу), което служи за по-лесно нанасяне и проследяване на фронта на пробите.

Получената смес от безклетъчния екстракт и буфер се вари на кипяща водна баня за 90 сек. След охлаждане в лед пробите се нанасят в стартовете на акрилаамидния гел за провеждане на електрофореза или се съхраняват при -18°C.

### 2.3.2. Провеждане на електрофореза

#### Нанасяне на пробите:

На стартовете се нанасят проби с белтъчно съдържание 10-100 мкг/мл и обем 1-30 мкл. Като стандарт се използват пречистени маркерни белтъци с известна молекулна маса.

#### Режим на електрофорезата:

Електрофорезата протича при следните параметри: 600V, 10W и 20mA на плака (поддържа се константно през целия процес) и стайна температура. Продължителността ѝ е до достигане на фронта на нанесените проби, съдържащи маркерно багрило до долния край на плаката. За осъществяване на електрофорезата се използва буфер със следния състав:

0,025M Tris/HCl

0,192M глицин

0,1% SDS

pH не се коригира, но трябва да е по-високо от 8,3.

#### Оцветяване на белтъците:

След приключване на електрофорезата гелът се поставя за 24 часа в оцветяващ разтвор съдържащ:

0,025% кумаси блу R250

40% метанол

7% оцетна киселина

#### Обезцветяване на гела:

Обезцветяването се извършва чрез многократно промиване на гела с воден разтвор със състав:

40% метанол

7% оцетна киселина.

Така оцветените гелове представляват тъмносини ивици на светлосин фон, като ивиците отговарят на съответните денатурирани и разделени по молекулно тегло белтъци.

#### **2.4. Провеждане на електрофореза на нативни белтъци (ензими)**

##### **2.4.1. Приготвяне на плаки за нативна PAGE**

Нативната PAGE се извършва по метода на Davis (1964).

Състав на гела: виж Таблица 2

Таблица 2

Реактив	Сток разтвор	Количество (мл)	
		Разделящ гел	Концентриращ гел
Акриламид-бисакриламид (AA – БАА)	30% AA + 0,8% БАА	3,33	0,67
Буфер за разд. гел	1,5M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5	-
Буфер за конц. гел	0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1,25
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	4,0	3,05
Амониев персулфат (АП)	10% АП	0,05	0,025
ТЕМЕД	ТЕМЕД	0,005	0,005

**ВНИМАНИЕ! Акриламидът и ТЕМЕД са токсични за човешкия организъм! При работа да не се инхалират и да не се работи с незащитени с ръкавици ръце!**

#### Обработка на пробите:

Към пробите от безклетъчния екстракт на гъбния изолат се прибавя буфер за обработка на пробите в отношение 5:1. Буферът за обработка на пробите е със следния състав:

0,35M Tris/HCl, pH 6,8

30% глицерол

0,02 мг/мл бром фенол блу

Така оцветените проби се нанасят в стартовете на акриламидния гел за провеждане на електрофореза или се съхраняват при -18°C.

#### *2.4.2. Провеждане на електрофореза*

##### Нанасяне на пробите:

На стартовете се нанасят проби с белтъчно съдържание 80-120 мкг/мл и обем 1-30 мкл. Като стандарт се използват пречистени маркерни белтъци (ензими).

##### Режим на електрофорезата:

Електрофорезата протича при следните параметри: 600V, 10W и 20mA на плака (поддържа се константно през целия процес) и непрекъснато охлаждане. Продължителността ѝ е до достигане на фронта на нанесените проби, съдържащи маркерно багрило до долния край на плаката. За осъществяване на електрофорезата се използва буфер със следния състав:

0,025M Tris/HCl

0,192M глицин

pH не се коригира, но трябва да е по-високо от 8,3.

##### Оцветяване на белтъци (ензими):

Оцветяването на различните ензими се провежда по метода на Selande и кол. (1986). Те описват процедура за оцветяването на 40 различни ключови за въглеродния и азотния метаболизъм ензими, отнасящи се към различни класове – оксидоредуктази, трансферази,

хидролази, лиази и изомеразы. Всички определяни от тях ензими могат да бъдат групирани в следните групи:

Таблица 3.

Наименование на ензима	Абривиатура	ЕС номер
<b>Оксидоредуктази</b>		
Алкохол дехидрогеназа	ADH	1.1.1.1
Манитол 1-фосфат дехидрогеназа	M1P	1.1.1.17
3-хидроксибутират дехидрогеназа	HBD	1.1.1.30
Малат дехидрогеназа	MDH	1.1.1.37
Малик ензим	ME	1.1.1.40
Изоцитрат дехидрогеназа	IDH	1.1.1.42
6-фосфоглюконат дехидрогеназа	6PG	1.1.1.44
Глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа	G6P	1.1.1.49
Глицералдеhid-фосфат дехидрогеназа (NAD <sup>a</sup> )	GP1	1.2.1.12
Глицералдеhid-фосфат дехидрогеназа (NADP <sup>b</sup> )	GP2	1.2.1.13
L-лактат дехидрогеназа	LDH	1.1.1.27
Треонин дехидрогеназа	THD	1.1.1.x <sup>c</sup>
Ксантин дехидрогеназа	XDH	1.2.3.2.
Аланин дехидрогеназа	ALD	1.4.1.1
Глутамат дехидрогеназа (NAD)	GD1	1.4.1.2
Глутамат дехидрогеназа (NADP)	GD2	1.4.1.4
Левцин дехидрогеназа	LED	1.4.3.2
Аспартат дехидрогеназа	ASD	1.4.3.x
Лизин дехидрогеназа	LYD	1.4.3.x
Неопределена дехидрогеназа	UDH	1.x.x.x
Каталаза	CAT	1.11.1.6
Индофенол оксидаза (супероксид дисмутаза)	IPO	1.15.1.1
<b>Трансферази</b>		
Глюкозилтрансфераза	GTF	2.4.1.11
Нуклеозид фосфорилаза	NSP	2.4.2.1

Глутамат-оксалацетат трансминаза	GOT	2.6.1.1
Глутамат-пируват трансминаза	GPT	2.6.1.2
Хексокиназа	HEX	2.7.1.1
Аденилат киназа	ADK	2.7.4.3
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1
<b>Хидролази</b>		
Естераза	EST	3.1.1.1
Алкална фосфатаза	ALP	3.1.3.1
Кисела фосфатаза	ACP	3.1.3.2
$\beta$ -галактозидаза	BGA	3.2.1.23
Левцин аминопептидаза	LAP	3.4.1.1.
Пептидаза	PEP	3.4.x.x
<b>Лиази</b>		
Алдолаза	ALD	4.1.2.13
Фумараза	FUM	4.2.1.2
Аконитаза	ACO	4.2.1.3
<b>Изомеразии</b>		
Манозо фосфат изомераза	MPI	5.3.1.8
Фосфоглюкозо изомераза	PGI	5.3.1.9

а – NAD – никотинамид динуклеотид

в – NADP – никотинамид динуклеотид фосфат

с – х – неопределена в “Ензимна номенклатура”

След изтичането на електрофорезата гелът се поставя в специфичен за търсения ензим разтвор. Съставът на разтворите за всеки от 40те ензима е представен в Таблица 4.

След поставянето на гела в специфичния разтвор за оцветяване на конкретния ензим, е необходимо най-малко 60 минутно инкубиране на потопения гел при температура 37°C. През това време протича ензимна реакция между субстрата и ензима, в резултат на което се получава видимо оцветяване под формата на ивица.

### *2.4.3. Изчисляване на относителна електрофоретична подвижност*

Относителната електрофоретична подвижност ( $R_m$ ) се изчислява като се измери с линия разстоянието между старта и края на фронта (маркерното багрило) – SF (мм) и разстоянието между старта и ивицата на съответния ензим SS (мм). Тогава  $R_m = SS/SF$

### *2.4.4. Изчисляване на степента на сходство (S, %) между два щама*

Степента на сходство S, между щамовете се изчислява като се преброят всички ензимни линии представени и при двата сравнявани щама и се отнесат към броя на всички ензимни линии. Или  $S, \% = \frac{\text{сбора от общите линии}}{\text{сбора от всички линии}} \times 100$ .

Таблица 4.А. Оцветяващи разтвори за оксидоредуктази

Ензим	Субстрат и участващ ензим	Буфери (мл)		Сол	Коензим
		0,2М Tris/HCl (pH 8,0)	Натриево- фосфатен (pH 7,0) <sup>В</sup>		
ADH <sup>а</sup>	Етанол 3 мл	50	-	-	NAD
M1P <sup>а</sup>	Манитол 1-фосфат – 5 мг	50	-	-	NAD
HBD <sup>а</sup>	DL-β-хидроксibuтират – 100 мг	50	-	0,1М MgCl –2 мл, NaCl – 200 мг	NAD
MDH <sup>а</sup>	2,0М малат – 6 мл	40	-	-	NAD
ME <sup>а</sup>	2,0М малат – 6 мл	40	-	0,1М MgCl –2 мл	NADP
IDH <sup>а</sup>	1,0М изоцитрат – 2 мл	50	-	0,1М MgCl –2 мл	NADP
6PG <sup>а</sup>	6-фосфоглюконат – 10 мг	20	-	0,1М MgCl –10 мл	NADP
G6P <sup>а</sup>	Глюкозо 6-фосфат- 100 мг	50	-	0,1М MgCl –1 мл	NADP
GP1 <sup>а</sup>	Фруктозо 1,6-дифосфат – 100 мг, Алдолаза – 10Е	40	-	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O - 50 мг	NAD
GP2 <sup>а</sup>	Фруктозо 1,6-дифосфат – 100 мг, Алдолаза – 10Е	40	-	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O - 50 мг	NADP
LDH <sup>а</sup>	DL – литиев лактат – 330 мг, Фруктозо 1,6-дифосфат – 10 мг	0,1М Глицил-глицин (pH 7,5) - 50			NAD
THD <sup>а</sup>	L – треонин – 50 мг	-	50	-	NAD
XDH <sup>а</sup>	Хипоксантин – 100 мг	50	-	-	NAD



Приложение 2:  
Електрофоретичен анализ на белтъци

ALD <sup>a</sup>	DL – аланин – 50 мг	-	50	-	NAD
GD1 <sup>a</sup>	L – глутамат – 200 мг	50	-	-	NAD
GD2 <sup>a</sup>	L – глутамат – 200 мг	50	-	-	NADP
LED <sup>a</sup>	L – левцин – 50 мг	-	50	-	NAD
ASD <sup>a</sup>	L – аспартат – 50 мг	-	50	-	NAD
LYD <sup>a</sup>	L- - лизин – 50 мг	-	50	-	NAD
IPO	Оцветяване: чрез осветяване	40	-	0,1M MgCl –2 мл	NAD
CAT	Оцветяване: 1. Инкубирайте гела за 15 мин. в 50 мл. разтвор със състав: 1,5 мл 50% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 750 мг. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 2. Промийте с вода 3. Потопете гела в 1,5% разтвор на KJ.				

<sup>a</sup> – за оцветяване на дехидрогенази, разтворете субстрата в буфера, прибавете 1,0 мл 1,25% разтвор на диметилтиазол тетразолиев (МТТ) и 0,5 мл от 1% разтвор на феназин метасулфат (PMS) и 2,0 мл 1% разтвор на NAD или 1,0 мл 1% разтвор на NADP.

<sup>b</sup> – натриево-фосфатен буфер (рН 7,0) – смесете равни части от 2,76% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O и 5,36% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, разрежете буфера с вода в отношение 1:25.

Таблица 4.Б. Оцветяващи разтвори за трансферази

Ензим	Субстрат, участващ ензим и коензим	Буфер и сол	Багрило и катализатор
GTF	Захароза – 5 гр.	0,1М $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 100 мл., натриев азид – 12 мг.	-
NSP	Инозин – 20 мг, Ксантин оксидаза – 2Е	Натриево-фосфатен (pH 7,0) <sup>В</sup> – 25 мл.	MTT – 1,0 мл. PMS – 0,5 мл.
GOT	L – аспартат – 50 мг., Пиридоксал 5-фосфат – 1 мг., $\alpha$ -Кетоглутарат – 100 мг.	0,2М Tris/HCl (pH 8,0) – 50 мл.	Fast Blue BB salt – 100 мг.
GPT	L – аланин – 50 мг., Глутамат дехидрогеназа – 40 мг., $\alpha$ -Кетоглутарат – 100 мг., NAD – 2 мг., NADP – 1 мг.	0,2М Tris/HCl (pH 8,0) – 50 мл.	MTT – 1,0 мл. PMS – 0,5 мл.
HEX	D – глюкоза – 200 мг., ATP – 50 мг., NADP – 10 мг., Глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа – 10Е	0,1М Глицил-глицин (pH 7,5) – 50, 0,1М MgCl – 1 мл.,	MTT – 1,0 мл. PMS – 0,5 мл.
ADK	Глюкоза – 100 мг., ADP – 25 мг., Хексокиназа – 1 мг., Глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа – 15Е, NADP – 1 мг.	0,2М Tris/HCl (pH 8,0) – 25 мл., 0,1М MgCl – 1 мл.	MTT – 0,6 мл. PMS – 0,6 мл.
PGM	Глюкозо 1-фосфат - 5 мг., Глюкозо 1,6-дифосфат – 5 мг., Глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа – 50Е, NADP – 0,5 мг.	0,2М Tris/HCl (pH 8,0) – 5 мл., 0,1М MgCl – 5 мл., вода - 25 мл.	MTT – 1,0 мл. PMS – 0,5 мл.

Таблица 4.В. Оцветяващи разтвори за хидролази

Ензим	Субстрат и участващ ензим	Буфер и сол	Багрило
EST	$\alpha$ -/ $\beta$ -Нафтил ацетат или $\alpha$ -/ $\beta$ -Нафтил пропионат (1%разтвор в ацетон) – 1,5 мл.	Натриево-фосфатен (pH 7,0) – 40 мл.	Fast Blue RR salt – 25 мг.
ALP	$\beta$ -Нафтил фосфат – 50 мг., поливинилпиролон – 100 мг.	0,05M Tris/HCl (pH 8,5) – 50 мл., NaCl – 1 гр., 0,1M MgCl <sub>2</sub> – 2 мл., 0,25M MnCl <sub>2</sub> – 2 мл.	Fast Blue BB salt – 50 мг.
ACP	$\alpha$ -Нафтил фосфат – 50 мг., $\beta$ -Нафтил фосфат – 50 мг.	0,05M натриево-ацетатен (pH 5,0) – 50 мл.	Black K salt – 20 мг.
BGA	6-Бромо-2-нафтил- $\beta$ -D-галактопиранозид (разтворен в 5 мл. метанол) – 10 мг.	Фосфат-цитратен (pH 5,0) <sup>C</sup> – 8,5 мл., вода – 30 мл.	Тетразолиев о-дианизидин – 30 мг.
LAP	L – левцин- $\beta$ -нафтиламид хидрохлорид – 30 мг.	0,1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 5,5) - 50 мл., 0,1M MgCl <sub>2</sub> – 1 мл.	Black K salt – 30 мг.
PEP	Пептид – 20 мг., Пероксидаза – 10 мг., Змийска отрова – 10 мг.	0,2M Tris/HCl (pH 8,0) – 50 мл., 0,25M MnCl <sub>2</sub> – 0,5 мл.	о-Дианизидин дихидрохлорид – 10 мг.

<sup>C</sup> – фосфат-цитратен буфер (pH 8,5) – смесете 10,2 мл. от 1,0M фосфорна киселина, 10,2мл. от 2,0M NaOH и 1,03 гр. Цитрат в 76,9 мл. вода.

Таблица 4.Г. Оцветяващи разтвори за лиази

Ензим	Субстрат и участващ ензим	Буфер и сол	Багрило
ALD	Фруктозо 1,6-дифосфат – 100 мг., Глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа – 50Е, Триозофосфат изомераза – 100Е, NAD – 20 мг.	0,1М Трис-ацетатен (pH 7,5) <sup>А</sup> – 50 мл., Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O – 100 мг.	PMS – 0,5 мл. MTT – 1,0 мл.
FUM	Фумарат – 50 мг., Малат дехидрогеназа – 50Е, NAD – 20 мг.	0,2М Tris/HCl (pH 8,0) – 50 мл.	PMS – 0,5 мл. MTT – 1,0 мл.
ACO	cis-Аконитат – 20 мг., Исоцитрат дехидрогеназа – 5Е, NADP – 10 мг.	0,2М Tris/HCl (pH 8,0) – 15 мл., 0,1М MgCl <sub>2</sub> – 10 мл.	PMS – 0,5 мл. MTT – 1,0 мл.

<sup>А</sup> – Трис-ацетатен буфер (pH 7,5) – разтворете 12,11 гр. Трис в 1 л. вода, корегирайте pH до 7,5 с оцетна киселина и прибавете 19,63 гр. калиев ацетат, 333 мг. кобалтов хлорид и 35,2 мг. L-цистеин хидрохлорид.

Таблица 4.Д. Оцветяващи разтвори за изомеразы

Ензим	Субстрат и участващ ензим	Буфер и сол	Багрило
МРІ	Манозо 6-фосфат – 10 мг., Глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа – 10Е, Фосфоглюкозо изомераза – 50Е, NAD – 20 мг., NADP – 10 мг.	0,2M Tris/HCl (pH 8,0) – 25 мл., 0,1M MgCl <sub>2</sub> – 1,0 мл.	PMS – 0,5 мл. MTT – 1,0 мл.
РGI	Фруктозо 6-фосфат – 10 мг., Глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа – 3Е, NADP – 6 мг.	0,2M Tris/HCl (pH 8,0) – 25 мл., 0,1M MgCl <sub>2</sub> – 0,3 мл.	PMS – 0,5 мл. MTT – 1,0 мл.

## **Приложение 3:** **Хранителни среди и реактиви за** **идентификация на плесенни гъби**

### **1. Среди за спорулация и/или за субкултивиране на плесенни гъби**

<b><u>Инфузионен Агар Мозък-Сърце</u></b>	
Състав	Бакто Инфузионен Агар Мозък-Сърце (Difco): 52 g Дестилирана вода: 1000 ml
Приготвяне	Сипете агара във вода. Разбъркайте. Нагрейте до завиряне за пълно разтваряне на средата. Разлейте в чисти епруветки 25x150 mm с тапи. Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо. Затегнете тапите и надпишете епруветките.
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	3 месеца.
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: Добър растеж на <i>Cryptococcus neoformans</i> . Тази хранителна среда се предлага и като готов търговски продукт и в този случай не подлежи на проверка на качеството от страна на потребителя (NCCLS).

<b><u>Среда за дрождева фаза на Histoplasma</u></b>	
Състав	<p>Бакто Инфузионен Агар Мозък-Сърце (Difco)      5,2 g</p> <p>Глутамин (0,2 М) сток разтвор, замразен      1,0 ml</p> <p>Овча кръв      5,0 ml</p> <p>Дестилирана вода      0,0 ml</p>
Приготвяне	<p><u>Твърда хранителна среда</u></p> <p>Сипете ВНІ агар във вода. Разбъркайте.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>В охладената среда прибавете 1,0 ml стерилен сток разтвор на глутамин и 5,0 ml стерилна овча кръв.</p> <p>Разбъркайте.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 7 ml в стерилни 16x125 mm епруветки с тапи.</p> <p>Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо.</p> <p>Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p> <p><u>Сток разтвор на глутамин 0,2 М</u></p> <p>Разтворете 0,292 g глутамин в 10 ml дестилирана вода.</p> <p>Стерилизирайте през филтър.</p> <p>Разделете на аликвоти от 1,0 ml в епруветки, годни за съхранение във фризер.</p> <p>Затегнете тапите, надпишете епруветките с датата на приготвяне.</p> <p>Съхранение при -70°C.</p>
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	3 месеца.
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>Функционалност: Конверсия на <i>Histoplasma</i> от плесенна фаза в дрождева фаза.</p>

<b><u>Агар на Кели</u></b>															
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">Глюкоза</td> <td style="text-align: right;">10 g</td> </tr> <tr> <td>Бактопептон (Difco)</td> <td style="text-align: right;">10 g</td> </tr> <tr> <td>Натриев хлорид</td> <td style="text-align: right;">5 g</td> </tr> <tr> <td>Говежди екстракт</td> <td style="text-align: right;">3 g</td> </tr> <tr> <td>Дефибринирана овча кръв</td> <td style="text-align: right;">5 g</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td style="text-align: right;">15 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">995 ml</td> </tr> </table>	Глюкоза	10 g	Бактопептон (Difco)	10 g	Натриев хлорид	5 g	Говежди екстракт	3 g	Дефибринирана овча кръв	5 g	Агар	15 g	Дестилирана вода	995 ml
Глюкоза	10 g														
Бактопептон (Difco)	10 g														
Натриев хлорид	5 g														
Говежди екстракт	3 g														
Дефибринирана овча кръв	5 g														
Агар	15 g														
Дестилирана вода	995 ml														
Приготвяне	<p>Разбъркайте глюкозата, пептона, натриевия хлорид, говеждия екстракт, овчата кръв и агара в 995 ml дестилирана вода.</p> <p>Нагрейте до завиряне за пълно разтваряне.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 10 ml в епруветки 16x25 mm с тапи.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 10 мин. при 15 psi.</p> <p>Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо.</p> <p>Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p>														
Съхранение	В хладилник при 4°C.														
Трайност	3 месеца.														
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>Функционалност: Конверсия на <i>Blastomyces</i> от плесенна фаза в дрождева фаза.</p>														

<b><u>Малцов Екстракт агар</u></b>							
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">Малцов екстракт</td> <td style="text-align: right;">20 g</td> </tr> <tr> <td>Пептон</td> <td style="text-align: right;">1 g</td> </tr> <tr> <td>Глюкоза</td> <td style="text-align: right;">20 g</td> </tr> </table>	Малцов екстракт	20 g	Пептон	1 g	Глюкоза	20 g
Малцов екстракт	20 g						
Пептон	1 g						
Глюкоза	20 g						



Приложение 3:  
Хранителни среди и реактиви за идентификация на плесенни гъби

	Агар	20 g
	Дестилирана вода	1000 ml
Приготвяне	<p>Разбъркайте всички съставки в дестилирана вода.</p> <p>Нагрейте до завиране за пълно разтваряне.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Разлейте аликвоти от по 15 ml в стерилни петрита 15x100 mm.</p> <p>Надпишете петритата и ги опаковайте за намаляване на риска от контаминация и дехидратация.</p>	
Съхранение	В хладилник при 4°C.	
Трайност	6 седмици.	
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>Функционалност: Добър растеж на <i>Candida albicans</i>.</p>	

<b><u>Mycosel™</u></b>		
Състав	Mycosel™ агар (BBL)	36,6 g
	Дестилирана вода	1000 ml
Приготвяне	<p>Сипете агара във вода. Разбъркайте.</p> <p>Нагрейте до завиране за пълно разтваряне на средата.</p> <p>Коригирайте до pH 6,5±0,2.</p> <p>Разлейте аликвоти от по 20 ml в чисти епруветки 25x150 mm с тапи.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо.</p> <p>Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p>	
Съхранение	В хладилник при 4°C.	
Трайност	3 месеца.	
Контрол на	Стерилност	

качеството:	<p>Функционалност: Слаб или никакъв растеж на <i>Staphylococcus aureus</i>; Слаб или никакъв растеж на <i>Aspergillus flavus</i>; Добър растеж на <i>Trichophyton mentagorphytes</i>.</p> <p>Когато тази хранителна среда се ползва като готов продукт, не подлежи на проверка на качеството от страна на потребителя (NCCLS).</p>
-------------	--

<b><u>Овесен агар</u></b>													
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%;">MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</td> <td style="text-align: right;">1 g</td> </tr> <tr> <td>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></td> <td style="text-align: right;">1.5 g</td> </tr> <tr> <td>NaNO<sub>3</sub></td> <td style="text-align: right;">1 g</td> </tr> <tr> <td>Овесено брашно</td> <td style="text-align: right;">10 g</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td style="text-align: right;">18 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> </table>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g	NaNO <sub>3</sub>	1 g	Овесено брашно	10 g	Агар	18 g	Дестилирана вода	1000 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g												
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g												
NaNO <sub>3</sub>	1 g												
Овесено брашно	10 g												
Агар	18 g												
Дестилирана вода	1000 ml												
Приготвяне	<p>Смесете съставките.</p> <p>Коригирайте до рН 5,6 с NaOH.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 20 мин. при 121°C.</p>												
Съхранение	В хладилник при 4°C.												
Трайност	3 месеца.												
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>Функционалност: Образуване на аскоспори при кръстосване на дерматофитни тест щамове.</p>												

<b><u>Картофено глюкозен агар (КГА)</u></b>									
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%;">картофи</td> <td style="text-align: right;">100 g</td> </tr> <tr> <td>глюкоза</td> <td style="text-align: right;">5 g</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td style="text-align: right;">7,5 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">500 ml</td> </tr> </table>	картофи	100 g	глюкоза	5 g	Агар	7,5 g	Дестилирана вода	500 ml
картофи	100 g								
глюкоза	5 g								
Агар	7,5 g								
Дестилирана вода	500 ml								

Приготвяне	<p>Обелете и нарежете на кубчета 100 g картофи и ги сложете в 500 ml дестилирана вода.</p> <p>Автоклавирайте 10 мин. при 15 psi за попарване на картофите.</p> <p>Филтрувайте запарката през марля.</p> <p>Прибавете 7,5 g агар.</p> <p>Нагрейте до завиране за разтваряне на агара.</p> <p>Добавете 5 g глюкоза.</p> <p>Ако е необходимо, доведете обема до 500 ml с дестилирана вода.</p> <p>За епруветки: Разделете на аликвоти от по 5 ml в епруветки 16x125 mm с тапи. Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо. Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p> <p>За петрита: Стерилизирайте 15 мин. при 15 psi. Разлейте на аликвоти от по 18 ml в стерилни петрита 15x100 mm. Надпишете петритата. Опаковайте за намаляване на риска от контаминация и дехидратация.</p>
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	Петрита: 6 седмици в торбички. Епруветки: 3 месеца.
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: Добър растеж на <i>Candida albicans</i> .

<b><u>Картофено захарозен агар</u></b>		
Състав	картофи	100 g
	захароза	10 g
	Агар	10 g
	Дестилирана вода	500 ml

Приготвяне	<p>Обелете и нарежете на кубчета 100 g картофи и ги сложете в 500 ml дестилирана вода.</p> <p>Автоклавирайте 10 мин. при 15 psi за попарване на картофите.</p> <p>Филтрувайте запарката през марля.</p> <p>Ако е необходимо, доведете обема до 500 ml с дестилирана вода.</p> <p>Добавете агара и нагрейте до завиряне, за да се разтвори.</p> <p>Добавете захарозата.</p> <p>За епруветки: Разделете на аликвоти от по 5 ml в епруветки 16x125 mm с тапи. Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо. Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p> <p>За петрита: Стерилизирайте 15 мин. при 15 psi. Разлейте на аликвоти от по 18 ml в стерилни петрита 15x100 mm. Надпишете петритата и ги опаковайте в торбички за съхранение.</p>
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	Петрита: 6 седмици в торбички. Епруветки: 3 месеца.
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: Добър растеж на <i>Candida albicans</i> .

<b><u>Оризиви зърна</u></b>					
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">необогатени зърна бял ориз</td> <td style="text-align: right;">8 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">25 ml</td> </tr> </table>	необогатени зърна бял ориз	8 g	Дестилирана вода	25 ml
необогатени зърна бял ориз	8 g				
Дестилирана вода	25 ml				
Приготвяне	Сложете 8 g ориз и 25 ml дестилирана вода в 125-милилитрова колба с тапа.				

	Стерилизирайте в автоклав за 10 мин. при 15 psi.
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	1 седмица
Контрол на качеството:	Стерилност: Не е необходима проверка преди употреба Функционалност: Добър растеж на <i>Micosporum canis</i> ; Липса на растеж на <i>Micosporum audounii</i>

<b><u>Среда на Сабуро (модификация на Емънс)</u></b>					
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">Декстозен агар на Сабуро</td> <td style="width: 40%; text-align: right;">20 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> </table>	Декстозен агар на Сабуро	20 g	Дестилирана вода	1000 ml
Декстозен агар на Сабуро	20 g				
Дестилирана вода	1000 ml				
Приготвяне	<p>Сложете агара във водата.</p> <p>Нагрейте до завиране за разтваряне на агара.</p> <p>Коригирайте до рН 5,6.</p> <p><b><u>Епруветки и петрита:</u></b></p> <p style="padding-left: 40px;"><b><u>За епруветки:</u></b> Разделете на аликвоти от по 15 ml в чисти 25x150 mm епруветки с тапи. Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо. Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p> <p style="padding-left: 40px;"><b><u>За петрита:</u></b> Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Разлейте на аликвоти от по 20 ml в стерилни петрита 15x100 mm. Надпишете петритата и ги за намаляване на риска от контаминация и дехидратация.</p>				
Съхранение	В хладилник при 4°C.				
Трайност	3 месеца				
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: Добър растеж на <i>Candida albicans</i> . Тази хранителна среда се предлага и като готов търговски				

	продукт и в този случай не подлежи на проверка на качеството от страна на потребителя (NCCLS).
--	--

<b><u>Среда на Сабуро плюс хлорамфеникол</u></b>							
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">Декстрозен агар на Сабуро</td> <td style="width: 40%; text-align: right;">50 g</td> </tr> <tr> <td>Хлорамфеникол (ч.з.а. на прах)</td> <td style="text-align: right;">0,05 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> </table>	Декстрозен агар на Сабуро	50 g	Хлорамфеникол (ч.з.а. на прах)	0,05 g	Дестилирана вода	1000 ml
Декстрозен агар на Сабуро	50 g						
Хлорамфеникол (ч.з.а. на прах)	0,05 g						
Дестилирана вода	1000 ml						
Приготвяне	<p>Разтворете 0,05 g хлорамфеникол в 10 ml 95% етанол. Сложете агара във водата. Нагрейте до завиране за разтваряне на агара. Добавете хлорамфеникола. Стерилизирайте в автоклав за 10 мин. при 15 psi. Разлейте на аликвоти от по 20 ml в стерилни петрита 15x100 mm.</p>						
Съхранение	В хладилник при 4°C.						
Трайност	3 месеца						
Контрол на качеството:	<p>Стерилност Функционалност: Слаб или никакъв растеж на <i>Staphylococcus aureus</i>; Добър растеж на <i>Candida albicans</i>.</p>						

<b><u>Декстрозен бульон на Сабуро</u></b>							
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">Неопептон</td> <td style="width: 40%; text-align: right;">10 g</td> </tr> <tr> <td>Глюкоза</td> <td style="text-align: right;">20 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> </table>	Неопептон	10 g	Глюкоза	20 g	Дестилирана вода	1000 ml
Неопептон	10 g						
Глюкоза	20 g						
Дестилирана вода	1000 ml						
Приготвяне	<p>Сложете неопептона и глюкозата във водата. Разбъркайте. Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 16x125 mm с тапи. Стерилизирайте в автоклав за 10 мин. при 15 psi.</p>						

Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	3 месеца
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: Добър растеж на <i>Cryptococcus neoformans</i> .

<b><u>V-8 соков агар – за стимулиране на спорулацията, индикиране на оцветени фунги, дрожди и някои аскомицети</u></b>									
Състав	<table> <tr> <td>V-8 сок</td> <td>100 ml</td> </tr> <tr> <td>CaCO<sub>3</sub></td> <td>2,5 g</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td>18 g</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td>880 ml</td> </tr> </table>	V-8 сок	100 ml	CaCO <sub>3</sub>	2,5 g	Агар	18 g	Дестилирана вода	880 ml
V-8 сок	100 ml								
CaCO <sub>3</sub>	2,5 g								
Агар	18 g								
Дестилирана вода	880 ml								
Приготвяне	<p>Сложете агара в една колба с 800 ml вода.</p> <p>Нагрейте до завиряне за пълно разтваряне на агара.</p> <p>Добавете V-8 сок, CaCO<sub>3</sub> и 80 ml вода в отделна колба.</p> <p>Коригирайте рН на дрождево-соковия разтвор до рН 6,8.</p> <p>Подгрейте за 10 мин. на гореща пара.</p> <p>Ако е необходимо, отново коригирайте рН до 6,8.</p> <p>Смесете двата разтвора.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 7 ml в епруветки 16x125 mm с тапи.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Поставете епруветките на наклонени стойки, за да може агарът да застине косо.</p> <p>Затегнете тапите и надпишете епруветките.</p>								
Съхранение	В хладилник при 4°C.								
Трайност	3 месеца								
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: Обилно образуване на аскоспори от <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .								

<b><u>Дрождев екстракт-фосфат агар</u></b>	
Състав	<p>Разтвор А: Дрождев екстракт 1,0 gm Агар 15,0 gm Дестилирана вода 1 литър</p> <p>Разтвор В: Натриев водороден фосфат, безводен 4,0 gm Калиев дихидроген фосфат 6,0 gm Дестилирана вода 10,0 ml</p> <p>Разтвор С: Амониен хидроксид, концентриран 1,0 ml</p>
Приготвяне*	<p>Разтвор А: Смесете съставките. Нагрейте разтвора до завирание.</p> <p>Разтвор В: Смесете съставките. Коригирайте рН до 6,0 с 1 N HCl или 1 N NaOH.</p> <p>Към разтвор А добавете 2,0 ml от разтвор В. Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Разлейте в петрита (35 ml на петри).</p>
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	14 дни
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>рН 6,0.</p> <p>Функционалност: <i>Blastomyces dermatitidis</i>; добър растеж на 25°C</p>

\* - Около 0,1-0,5 ml от предварително концентрираната проба се инокулира в средата. Една капка (0,05 ml) разтвор С се накапва върху средата, настрана от седимента. Амониеният хидроксид ще дифундира в целия обем. В средата не може да се включва циклохексимид, защото се инактивира от амониения хидроксид. Могат да се добавят антибактериални средства като хлорамфеникол.



<b><u>Дрождев екстракт-малцов екстракт (YM) агар</u></b>													
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">Дрождев екстракт</td> <td style="text-align: right;">3,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Малцов екстракт</td> <td style="text-align: right;">3,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Пептон</td> <td style="text-align: right;">5,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Глюкоза</td> <td style="text-align: right;">10,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td style="text-align: right;">15,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">1 литър</td> </tr> </table>	Дрождев екстракт	3,0 gm	Малцов екстракт	3,0 gm	Пептон	5,0 gm	Глюкоза	10,0 gm	Агар	15,0 gm	Дестилирана вода	1 литър
Дрождев екстракт	3,0 gm												
Малцов екстракт	3,0 gm												
Пептон	5,0 gm												
Глюкоза	10,0 gm												
Агар	15,0 gm												
Дестилирана вода	1 литър												
Приготвяне*	<p>Смесете съставките.</p> <p>Нагрейте до завиране.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 16x125 mm.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Оставете агара да застине косо.</p>												
Съхранение	В хладилник при 4°C.												
Трайност	30 дена в епруветки. 14 дена в петрита.												
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>pH 6,0.</p> <p>Функционалност: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; добър растеж на 25°C</p>												

\* - pH може да се коригира до 3,7 с разредена солна киселина. Подкислен YM агар или бульон може да се използва за почистване на дрождеви култури при бактериална контаминация.

<b><u>Гладен агар, 2%</u></b>					
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">Агар</td> <td style="text-align: right;">20,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">1 литър</td> </tr> </table>	Агар	20,0 gm	Дестилирана вода	1 литър
Агар	20,0 gm				
Дестилирана вода	1 литър				
Приготвяне*	Смесете съставките.				

	<p>Нагрейте до завиране.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 15,0 ml в епруветки 16x125 mm.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p>
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	30 дена в епруветки. 14 дена в петрита.
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>pH 6,0.</p> <p>Функционалност: не е необходимо да се прави проверка преди употреба.</p>

\* - Гладният агар се стопява и разлива в стерилни петрита преди употреба.

<b><u>Овесен агар за Gymnoascaceae</u></b>		
Състав	<p>Доматено пюре (на Hunt) 10,0 gm</p> <p>Овесена каша (за бебета) 10,0 gm</p> <p>Магнезиев сулфат 1,0 gm</p> <p>Калиев фосфа 1,0 gm</p> <p>Натриев нитрат 1,0 gm</p> <p>Агар 15,0 gm</p> <p>Дестилирана вода 1 литър</p>	
Приготвяне	<p>Смесете съставките.</p> <p>Нагрейте до завиране.</p> <p>Охладете, коригирайте pH до 5,6 с натриева основа.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 20 мин. при 15 psi.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 20,0 ml в стерилни петрита.</p> <p>Оставете да застине.</p>	
Съхранение	В хладилник при 4°C.	
Трайност	14 дни.	

Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>pH 5,6.</p> <p>Функционалност: не е необходимо да се прави проверка преди употреба.</p> <p>Отлична среда за стимулиране на образуването на гимнотеции от представители на Gymnoascaceae.</p> <p>Обикновено се използва за родовете <i>Arthroderma</i> и <i>Nannizzia</i>.</p>
------------------------	--

<b><u>Малцов екстракт агар за <i>Aspergillus</i></u></b>											
Състав	<table> <tr> <td>Малцов екстракт</td> <td>20,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Пептон (Difco)</td> <td>1,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Глюкоза</td> <td>20,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td>20,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td>1 литър</td> </tr> </table>	Малцов екстракт	20,0 gm	Пептон (Difco)	1,0 gm	Глюкоза	20,0 gm	Агар	20,0 gm	Дестилирана вода	1 литър
Малцов екстракт	20,0 gm										
Пептон (Difco)	1,0 gm										
Глюкоза	20,0 gm										
Агар	20,0 gm										
Дестилирана вода	1 литър										
Приготвяне*	<p>Смесете съставките.</p> <p>Нагрейте до завирание.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 16x125 mm.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Оставете агара да застине косо.</p> <p>За петрита автоклавирайте средата в колба.</p> <p>Стерилно разлейте аликвоти от по 25,0 ml в стерилни петрита.</p> <p>Оставете средата да застине.</p>										
Съхранение	В хладилник при 4°C.										
Трайност	<p>30 дена в епруветки.</p> <p>14 дена в петрита.</p>										
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>pH 5,6.</p>										

	Функционалност: <i>Aspergillus flavus</i> ; Бърз растеж, жълтеникаво-зелени колонии на 25°C
--	---

<b><u>Малцов екстракт (МЕ) агар</u></b>							
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">Малцов екстракт</td> <td style="text-align: right;">20,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td style="text-align: right;">12,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Дестилирана вода</td> <td style="text-align: right;">400 ml</td> </tr> </table>	Малцов екстракт	20,0 gm	Агар	12,0 gm	Дестилирана вода	400 ml
Малцов екстракт	20,0 gm						
Агар	12,0 gm						
Дестилирана вода	400 ml						
Приготвяне*	<p>Смесете агара и дестилираната вода.</p> <p>Нагрейте до завиране.</p> <p>Охладете, добавете малцовия екстракт и разбъркайте.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 7,5 ml в епруветки 16x125 mm.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Оставете агара да застине косо.</p>						
Съхранение	В хладилник при 4°C.						
Трайност	30 дена в епруветки. 14 дена в петрита.						
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>pH 5,6.</p> <p>Функционалност: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; Добър растеж на 25°C</p>						

\* - pH може да се коригира до 3,7 със солна киселина, ако средата ще се използва за почистване на дрождеви култури от бактериална контаминация.

<b><u>Запарка от сено с агар</u></b>							
Състав	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">Гниецо сено</td> <td style="text-align: right;">50,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Калиев хидроген фосфат</td> <td style="text-align: right;">2,0 gm</td> </tr> <tr> <td>Агар</td> <td style="text-align: right;">15,0 gm</td> </tr> </table>	Гниецо сено	50,0 gm	Калиев хидроген фосфат	2,0 gm	Агар	15,0 gm
Гниецо сено	50,0 gm						
Калиев хидроген фосфат	2,0 gm						
Агар	15,0 gm						

	Чешмяна вода	1 литър
Приготвяне*	<p>Смесете сеното и чешмяната вода.</p> <p>Автоклавирайте 30 мин. при 15 psi.</p> <p>Филтрувайте през марля.</p> <p>Добавете останалите съставки към запарката от сеното.</p> <p>Охладете и доведете до около pH 6,2.</p> <p>Нагрейте до завиране.</p> <p>Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 25x125 mm.</p> <p>Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi.</p> <p>Оставете агара да застине косо.</p>	
Съхранение	В хладилник при 4°C.	
Трайност	<p>30 дена в епруветки.</p> <p>14 дена в петрита.</p>	
Контрол на качеството:	<p>Стерилност</p> <p>pH 6,2.</p> <p>Функционалност: не е необходимо да се прави проверка преди употреба.</p> <p>Тази среда често се използва за стимулиране на образуването на конидии или спори.</p>	

<b><u>Среда на Чапек-Докс за <i>Aspergillus</i></u></b>		
Състав	Натриев нитрат	3,0 gm
	Калиев водороден фосфат	1,0 gm
	Магнезиев сулфат	0,5 gm
	Калиев хлорид	0,5 gm
	Железен сулфат	0,01 gm
	Глюкоза	30,0 gm
	Агар	15,0 gm
	Дестилирана вода	1 литър

Приготвяне	Смесете съставките. Нагрейте до завирание. Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 16x125 mm. Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Оставете агара да застине косо. За петрита автоклавирайте средата в колба. Стерилно разлейте аликвоти от по 25,0 ml в стерилни петрита. Оставете средата да застине.
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	30 дена в епруветки. 14 дена в петрита.
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: <i>Aspergillus flavus</i> ; Добър растеж, плоски колонии, първоначално жълти, преминаващи към зелено при 25°C

<u>Среда на Чапек-Докс</u>		
Състав	Магнезиев сулфат	0,5 gm
	Калиев хлорид	0,5 gm
	Калиев водороден фосфат	1,0 gm
	Железен сулфат	0,01 gm
	Натриев нитрат	3,0 gm
	Захароза	30,0 gm
	Агар	15,0 gm
	Дестилирана вода	1 литър
Приготвяне	Смесете съставките. Нагрейте до завирание. Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 16x125mm.	

Приложение 3:  
Хранителни среди и реактиви за идентификация на плесенни гъби

	Стерилизирайте в автоклав за 15 мин. при 15 psi. Оставете агара да застине косо.
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	30 дена в епруветки. 14 дена в петрита.
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: <i>Aspergillus flavus</i> ; Добър растеж, жълто-зелени колонии при 25°C

<b><u>Житен агар за образуване на аскокарпи при <i>Gymnoascaceae</i></u></b>	
Състав	Предварително сварено смесено жито 10,0 gm Калиев хидроген фосфат 1,5 gm Магнезиев сулфат 1,0 gm Агар 18,0 gm Дестилирана вода 1 литър
Приготвяне	Смесете съставките. Нагрейте до завиране. Охладете и доведете до pH 5,6. Автоклавирайте 30 мин. при 15 psi. Разделете на аликвоти от по 15,0 ml в стерилни петрита. Оставете средата да застине
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	14 дни в петрита.
Контрол на качеството:	Стерилност pH около 5,6. Функционалност: не е необходимо да се прави проверка преди употреба.

<b><u>Житен агар за Hyphomycetes</u></b>	
Състав	Предварително сварено смесено жито 100,0 gm Агар 15,0 gm Дестилирана вода 1 литър
Приготвяне*	Смесете съставките. Нагрейте до завиране. Разделете на аликвоти от по 7,0 ml в епруветки 16x125 mm. Стерилизирайте в автоклав за 10 мин. при 10 psi. Оставете агара да застине косо
Съхранение	В хладилник при 4°C.
Трайност	30 дни в епруветки.
Контрол на качеството:	Стерилност Функционалност: <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ; Добро образуване на конидии при 25°C

\* - В средата може да се добави хлорамфеникол (50,0 gm/литър), ако има проблем с бактериална контаминация.

## **2. Използвани реагенти в идентификацията на плесенни гъби**

<b><u>Хексахлороциклохексан (против червясване)</u></b>	
Състав	Хексахлороциклохексан 0,01 gm Хранителна среда 1 литър
Приготвяне	Прибавете 0,01 gm хексахлороциклохексан към 1 литър произволна микологична среда преди автоклавиране. Пригответе средата както обикновено.



### **3. Среди за микроскопско наблюдение**

<b><u>Лактофенол и Лактофенол Метиленово синьо</u></b>		
Състав	Лактофенол фенол (концентриран) 20,0 ml	
	млечна киселина 20,0 ml	
	глицерол 40,0 ml	
	дестилирана вода 20,0 ml	
	<b><u>Лактофенол Метиленово синьо</u></b>	
	фенол (концентриран) 20,0 ml	
	млечна киселина 20,0 ml	
	глицерол 40,0 ml	
	метиленово синьо 0,05 gm	
	дестилирана вода 20,0 ml	
Приготвяне	Смесете фенола, млечната киселина, глицерола и водата в 250-милилитрова бутилка с тапа. За Лактофенол Метиленово синьо разтворете 0,05 gm метиленово синьо в 20 ml вода. След това прибавете фенола, млечната киселина и глицерола. Съхранява се в 250-милилитрова бутилка с тапа.	

<b><u>Овлажняващ агент за прилагане с лакто-фуксин или PVA</u></b>	
Състав	95% етанол 50 ml
	ацетон 25 ml
	85% млечна киселина 25 ml
Приготвяне	Накапете една капка омокрящ агент върху йозето с материала за микроскопско наблюдение. Подсушете с докосване върху чиста филтърна хартия. Наблюдавайте в глицериново желе или лактофуксин.

Приложение	Гъбните хифи са хидрофобни и не пропускат вода. Омокрящият агент позволява на багрилото да проникне в хифите и елиминира въздушните мехурчета.
------------	---

<b><u>Глицериново желе</u></b>									
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">глицерин</td> <td style="text-align: right;">7 g</td> </tr> <tr> <td>желатин</td> <td style="text-align: right;">1 g</td> </tr> <tr> <td>вода</td> <td style="text-align: right;">6 ml</td> </tr> <tr> <td>фенол</td> <td style="text-align: right;">1,4 g</td> </tr> </table>	глицерин	7 g	желатин	1 g	вода	6 ml	фенол	1,4 g
глицерин	7 g								
желатин	1 g								
вода	6 ml								
фенол	1,4 g								
Приготвяне	<p>Разтворете желатина в дестилираната вода, като подгрявате внимателно при не много висока температура в продължение на 2 или повече часа. Добавете глицерин и фенол на кристали. Подгрейте за около 15 мин., за да се разтвори фенолът, след което филтрувайте през марля. Прелейте в широкогърлен пластмасов буркан и съхранявайте в хладилник.</p> <p>За ежедневна работа прехвърлете известно количество в шишенце от боросиликатно стъкло. Разтопете на сгорещен котлон, включен на слабо. Със стъклена пръчица нанесете капка среда за микроскопско наблюдение.</p> <p>Полученият продукт застива при охлаждане и се разваля при многократно разтопяване.</p>								
Проверка на качеството	Изхвърлете, ако средата се обезцвети или престане да желира.								
Приложение:	Среда за трайни микроскопски препарати.								

<b><u>Лакто-фуксин</u></b>					
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">кисел фуксин</td> <td style="text-align: right;">0,1 g</td> </tr> <tr> <td>85% млечна киселина</td> <td style="text-align: right;">100 ml</td> </tr> </table>	кисел фуксин	0,1 g	85% млечна киселина	100 ml
кисел фуксин	0,1 g				
85% млечна киселина	100 ml				

Приложение:	<p>Препаратите с лакто-фуксин приличат на изготвените с лактофенол метиленово синьо, но са по-добри, защото клетъчните стени се открояват по-ясно поради по-силно различаващия се рефракционен индекс от този на клетъчните стени на хиалините гъби. Освен това процедурата за оцветяване е по-бърза.</p>
-------------	---

<b><u>Поливинилов алкохол (PVA)</u></b>									
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">Поливинилов алкохол (Sigma Chemicals)</td> <td style="text-align: right;">1,66 g</td> </tr> <tr> <td>Млечна киселина</td> <td style="text-align: right;">10,0 ml</td> </tr> <tr> <td>Глицерин</td> <td style="text-align: right;">1,0 ml</td> </tr> <tr> <td>Вода</td> <td style="text-align: right;">10,0 ml</td> </tr> </table>	Поливинилов алкохол (Sigma Chemicals)	1,66 g	Млечна киселина	10,0 ml	Глицерин	1,0 ml	Вода	10,0 ml
Поливинилов алкохол (Sigma Chemicals)	1,66 g								
Млечна киселина	10,0 ml								
Глицерин	1,0 ml								
Вода	10,0 ml								
Приготвяне	<p>Към водата добавете PVA на кристали. След разтваряне добавете млечната киселина, като разбърквайте енергично. Добавете глицерина. Филтрувайте при необходимост. Оставете за 24 часа да "узрее".</p>								
Проверка на качеството	Изхвърлете ако средата не се втвърдява								
Приложение	<p>Като безцветна среда за трайни микроскопски препарати, която не се обезцветява под действие на слънчевата светлина. Преди микроскопско наблюдение с имерсия трябва да се втвърди за 10 мин. при 40°C и 3-5 дена на стайна температура или 36 часа при 40°C за окончателно втвърдяване.</p>								

<b><u>Овляжняващ агент за прилагане с глицериново желе</u></b>							
Състав	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">95% етанол</td> <td style="text-align: right;">50 ml</td> </tr> <tr> <td>ацетон</td> <td style="text-align: right;">25 ml</td> </tr> <tr> <td>глицерол</td> <td style="text-align: right;">25 ml</td> </tr> </table>	95% етанол	50 ml	ацетон	25 ml	глицерол	25 ml
95% етанол	50 ml						
ацетон	25 ml						
глицерол	25 ml						

## Литература

1. Evans E.G.V., Richardson M.D., Medical Mycology: a practical approach. Oxford University press, Oxford, England, 1989
2. Rippon J.W. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3<sup>rd</sup> edition, W.B. Saunders, Philadelphia, 1988
3. Carlile M. J., Watkinson S. C., The Fungi, Academic press, London, 1994.
4. Esser K., Lemke P. A., The Mycota I and II, Springer-Verlag, Berlin, 1995.
5. Gow N.A. R., Gaad G. M., The growing fungus, Chapman & Hall, London, 1995.
6. Atkins, S. D., and I. A. M. Clark. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini-review. J. Appl. Genet. **45**, 3-15.
7. <http://www.doctorfungus.org/>
8. <http://www.Wrongdiagnosis.com/>