

CHROMagar Candida, новая дифференциальная изолирующая среда для идентификации клинически значимых видов Candida

Frank C. Odds, Ria Bernaertis

Отдел Бактериологии и Микологии, Исследовательский Фонд Janssen, В-2340 Beerse, Бельгия

Получено: 7 февраля 1994/возвращено для внесения изменений – 31 марта 1994/Принято 21 апреля 1994

CHROMagar Candida – новая дифференциальная среда, которая позволяет изолировать и идентифицировать ряд клинически значимых видов дрожжевых грибов. Мы оценили возможности использования питательной среды на примере 726 изолятов дрожжевых грибов, в том числе 82 изолята были напрямую выделены на среду из клинического материала. После 2 дней инкубации при температуре 37°C, на средах, содержащих 285 изолятов *C.albicans* отмечался рост хорошо заметных колоний зеленого цвета; 441 изолят – представители 21 различных видов дрожжевых грибов – роста не дал. 54 изолята *C.tropicalis* дали рост четких сине-зеленых колоний с темным венчиком коричнево-пурпурного цвета на прилежащем к колониям участкам агара. Изоляты *C.krusei* (n = 43) также образовывали характерные обширные шершавые колонии с бледно-розовой серединой и белым ободком; аналогичные колонии изредка образовывались изолятами *C.norvegensis*. Представители вида *Trichosporon* (n = 34) образовывали мелкие бледные колонии, которые при продолжении инкубации увеличивались и грубели. Большинство прочих 310 дрожжевых грибов образовывали колонии, цвет которых варьировался от белого до пурпурного, с коричневым оттенком. Единственное исключение – грибы видов *Geotrichium* и *Pichia*; некоторые из них образовывали синие и серые колонии; в двух случаях зарегистрирована пигментация агара и образование темного венчика. Чувствительность и специфичность новой среды при идентификации *C.albicans*, *C.krusei* и *C.tropicalis* превышали 99%. Проведен слепой тест на опознание, в котором приняли участие 4 сотрудника и проанализировано 57 изолятов дрожжевых грибов – представителей 9 клинически значимых видов. Тест подтвердил, что инкубация на среде *CHROMagar Candida* в течение 48 часов обеспечивает рост характерных колоний, на основании которого возможна точная идентификация *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei* и *Trichosporon spp.* Роста 9 бактериальных изолятов на среде *CHROMagar Candida* не отмечалось в течение 72 часов. Рост бактерий (*Escherichia coli*) отмечался всего у 4 соскобов из 104 вагинальных, 100 оральных и 99 аноректальных образцов. На новой среде поддерживался рост 19 из 23 дерматофитов и 41 из 43 прочих плесневых грибов, то есть широкого спектра грибковых патогенов и контаминантов. В параллельных культурах, состоявших из 348 клинических образцов, на агаре Сабуро и на среде *CHROMagar Candida* поддерживался рост 78 штаммов, указанных выше. Среда *CHROMagar Candida* можно рекомендовать в качестве полезной изолирующей среды для идентификации дрожжевых грибов, которые чаще всего выделяются из клинических материалов, а также для укоренной дифференциации смешанных грибковых культур.

Чаще всего для изоляции *Candida* и прочих дрожжевых грибов, выделенных из клинических образцов, используется глюкозный агар Сабуро (7) – это среда общего назначения, на которой растут практически все патогенные грибки. Агар Сабуро не относится к дифференциальным средам; колонии различных грибов, проросших на нем, трудно дифференцировать. Опытным специалистам удается опознать смеси из различных грибов, проросшие на одной среде, тем не менее, в состав агара Сабуро не входят индикаторные вещества, таким образом, гарантировать точную идентификацию смешанных грибковых культур невозможно. Из клинических материалов чаще всего выделяется *Candida albicans*. В большинстве лабораторий при идентификации дрожжевых грибов используются быстрые тесты, например – выявление трубок роста, характерных для *Candida albicans*. Для точной идентификации необходимо проведение углубленного тестирования. Ранее, по причине значительной распространенности дрожжевых грибов, было разработано как минимум 3 изолирующих среды для дифференциации *C.albicans* на основании цвета колоний. Тем не менее, эти среды, редко используются в рутинной лабораторной практике, а то и вообще не используются.

Среда Nickerson (4, 5) аналогична агару BiGGY, который доступен в продаже. В основе дифференциации колоний лежит восстановление солей висмута, в результате чего образуются более темные и светлые колонии (3, 6). Pagano et al (9) использовал трифенилтетразол-хлорид в качестве индикатора на агаре Сабуро; на этой среде *C.albicans* образовывали бледные колонии, а колонии всех прочих дрожжевых грибов были окрашены в различные оттенки розового цвета. Эта среда успешно используется для выявления смешанных культур в клинических изолятах (12). Costa и de Lourdes Blanco (2) разработали фосфо-молибденовый агар – колонии *C.albicans* на нем окрашиваются в зеленый цвет, а колонии прочих дрожжевых грибов – в синий. Эффективность среды подтверждена результатами как минимум одного исследования (1).

Несмотря на то, что эффективность указанных сред была подтверждена в рамках ряда независимых исследований, их не удалось внедрить в рутинную лабораторную практику. Среда Pagano-Levin и фосфо-молибденовый агар в настоящее время сняты с продаж. Кроме того, при использовании среды Pagano-Levin для дифференциации часто отмечаются ложноположительные и ложноотрицательные результаты (11). При использовании сред на основе висмута не удастся точно отличать различные виды дрожжевых грибов друг от друга, а также от бактерий, поскольку в данном случае большинство микроорганизмов образует коричневые либо черные колонии (10). Таким образом, вопрос создания изолирующей среды для использования в рутинной практике, с помощью которой можно ускорить процесс дифференциации *C.albicans* от прочих дрожжевых грибов остается актуальным. В рамках настоящего исследования оценивались особенности нового коммерческого продукта, среды *CHROMagar Candida*, которую можно использовать для изоляции и идентификации *C.albicans*, *C.krusei*, и *C.tropicalis*, а также для дифференциации этих видов от прочих дрожжевых грибов, на основании четкого контрастирования колоний, обусловленного реакциями между видоспецифичными энзимами и хромогенным субстратом. Использование данной среды в значительной мере ускоряет процесс выявления образцов содержащих смешанные культуры дрожжевых грибов.

Материалы и методы

CHROMagar Candida, патентованный продукт, был предоставлен Компанией *CHROMagar*, Париж, Франция. Состав среды (на литр): пептон (10 г), глюкоза (20 г), агар (15 г), хлорамфеникол (0.5 г), хромогенная смесь (2 г). Продукт поставляется в виде белого порошка в пакетах для приготовления сред объемом 1000 мл. Приготовление сред осуществлялось в соответствии с инструкцией производителя. Порошок разводили в кипяченой воде, постоянно

помешивая, вплоть до полного растворения. Стерилизации среды в автоклаве не требовалось. После остывания среда распределялась по чашкам Петри.

Скрининг на выявление способности к росту и особенностей окрашивания колоний на среде CHROMagar Candida проведен на материале 726 изолятов, представлявших 22 вида дрожжевых грибов (в число изолятов входило 5 образцов, идентифицированных как *Geotrichum* sp. – для данной таксономической единицы характерен ряд свойств дрожжевых грибов; тем не менее, часто указывается, что этот вид принадлежит к плесневым грибкам). Из 726 изолятов, 233 культивированы из свежих клинических образцов за 3 месяца до начала исследования. В том числе, 78 изолятов выделены из клинических образцов на среде CHROMagar Candida. Прочие образцы дрожжевых грибов получены из банка Исследовательского Фонда Jannsen. Дрожжевые грибки выращивались и подвергались суб-культивированию на глюкозном агаре Сабуро (Oxoid, Basingstoke, Великобритания). Идентификация изолятов основывалась на определении морфологических признаков при культивировании на рисово-сливочном агаре, с использованием техники инокуляции Dalmau; также определялась способность изолятов к образованию трубок роста в сыворотке. Для изолятов, не образующих хламидоспор и/или трубок роста, учитывались параметры ассимиляции, для оценки которых использовалась идентификационная панель дрожжевых грибов API ID32C. Для изолятов, идентифицированных как *Geotrichum* sp. И *Trichosporon* sp. принадлежность на видовом уровне не оценивалась.

В рамках проведения тестов на среде CHROMagar Candida дрожжевые грибки пересевались на агар пипеткой, в виде капель суспензии (10 μ л), с содержанием клеток 4×10^7 /мл (8); или же пересев осуществлялся нанесением мазков с использованием одиночных колоний либо клинических образцов (колонии, выросшие из мазков и капель суспензии не отличались по цвету и форме). В рамках предварительного исследования 197 культур инкубировались на среде CHROMagar Candida при температуре 37°C; оценка проводилась спустя 1, 2 и 3 дня после посева. Степень роста оценивалась по категориям «отсутствие роста», «слабый рост» (маленькие колонии, с признаками частичного роста), «положительный рост» (нормальные колонии, характерные для дрожжевых грибов); при оценке цвета колоний использовались пантоны для определения цветовой формулы. Учитывалось наличие окрашенного венчика на агаре вокруг колонии; кроме того, приводилось описание фактуры колоний. Эксперимент проводился дважды, с использованием различных партий среды. Остатки изолятов проращивались на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при температуре 37°C, учитывались цвет колоний и наличие колоний необычной формы.

Для оценки селективности среды использовалась панель из 9 бактерий и 66 плесневых грибов; инкубация проводилась при температуре 30 и 37°C – в зависимости от вида микроорганизмов. В панель плесневых грибов входило 18 видов дерматофитов (22 изолята), *Aspergillus* spp. (3 изолята), *Mucorales* (6 изолятов), грибки *dermatiaceus* (5 изолятов), а также ряд оппортунистических и контаминантных микроорганизмов, в частности - *Acremonium*, *Chaetornium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Hendersonula*, *Madurella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pseudallescheria*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Sporothrix*, *Trichoderma*, *Ustilago*, и *Verticillium*.

Для оценки эффективности CHROMagar Candida в качестве изолирующей среды для дрожжевых грибов, использовано 348 клинических образцов, полученных от 115 пациентов (в основном – в виде вагинальных, оральных и аноректальных мазков; также использовано 8 образцов ногтей и 1 соскоб кожи); проведен параллельный посев на среды CHROMagar Candida и глюкозный

агар Сабуро с хлорамфениколом (50 мг/литр) и гентамицином (20 мг/литр).

Оценка возможностей идентификации колоний, проросших на среде CHROMagar Candida: использовалась панель из 57 изолятов дрожжевых грибов (*C. albicans* (22 изолятов), *C. (Torulopsis) glabrata* (5 изолятов), *C. guilliermondii* (3 изолята), *C. kefir* (3 изолята), *C. krusei* (5 изолятов), *C. lusitanae* (3 изолята), *C. parapsilosis* (6 изолятов), *C. tropicalis* (5 изолятов), и *Trichosporon* sp. (5 изолятов)). Изоляты кодировались в произвольном порядке и пересеивались на новую среду; оценка проводилась после 24–48 часов инкубации четырьмя специалистами, которые не участвовали в прочих этапах исследования. Они по отдельности излагали свои соображения относительно идентификации образцов, на основании сравнения проросших штаммов с референтными образцами, пророщенными на среде CHROMagar Candida.

Для подтверждения того, что проращивание на среде CHROMagar Candida не оказывает негативного воздействия на дрожжевые грибки, все 726 образцов, задействованных в рамках основного эксперимента, а также 30 дополнительных клонов, выращенных на среде CHROMagar Candida, культивировались на глюкозном агаре Сабуро и инкубировались при 37°C для подтверждения их жизнеспособности.

Внешний вид колоний, проросших на среде CHROMagar Candida, оценивался по параметрам чувствительности (количество истинно положительных результатов/количество истинно положительных результатов + количество ложноотрицательных результатов) и специфичности (количество истинно отрицательных результатов/(количество истинно отрицательных результатов + количество ложно положительных результатов)) – таким образом, определялась полезность данной среды при ее использовании в условиях клинической лаборатории.

Результаты

Внешний вид колоний, проросших на среде CHROMagar Candida.

Все протестированные изоляты дрожжевых грибов сохраняли способность к росту на среде CHROMagar Candida. После 24 часов инкубации при 37°C отмечался выраженный рост большинства грибов, с образованием колоний диаметром 1–5 мм. После 24 часов инкубации рост и окрашивание колоний были недостаточны для точной оценки, которая проводилась спустя 48 часов инкубации, в соответствии с инструкциями производителя. К этому сроку 3 из 24 изолятов *Cryptococcus neoformans* и 2 из 5 изолятов *Geotrichum* spp. образовали точечные колонии – в данном случае оценка производилась после дополнительных 24 часов инкубации.

Отмечалось разнообразное окрашивание колоний – ряд окрасок был определенно видо-специфичным (Таблица 1). В целом, колонии приобретали интенсивное окрашивание после 72 часов инкубации (данные не указаны), однако, за исключением нескольких изолятов, упомянутых выше, четкое и опознаваемое окрашивание колоний отмечалось уже после 48 часов инкубации. Края окрашенных колоний были бледнее их центральной части. Таким образом, при описании цвета колоний имеется в виду преобладающая окраска центра колонии. После 48 часов инкубации при 37°C практически все изоляты дрожжевых грибов окрашивались в гамму цветов от белого, сероватого и коричневатого-розового до серого и коричневатого-пурпурного (Таблица 1, Рисунки 1А и В). Тем не менее, некоторые виды давали рост колоний с другой, четко отличимой окраской.

При проращивании на среде CHROMagar Candida все 285 изолятов *C. albicans* образовали колонии желто-зеленого либо сине-зеленого цвета (Рисунок 1С). Зеленый оттенок колоний – характерная черта

Таблица 1

Рост и цвет колоний 726 изолятов дрожжевых грибов при инкубации на среде CHROMagar Candida в течение 2 дней при температуре 37 С

Вид	Общее количество изолятов	К-во изолятов возрастом менее 3 месяцев	Цвет колоний	Референтный номер цвета ^A
<i>Candida albicans</i>	285	117	Зеленый	3258/338
<i>Candida famata</i>	15	12	Белый, бледно-розовый, розовый	435/436
<i>Candida (Torulopsis) glabrata</i>	84	44	Белый, розовый, пурпурный	5135/5155
<i>Candida guilliermondii</i>	13	2	Бледно-розовый, пурпурный	435/436
<i>Candida humicola</i>	3	0	Бледно-серый, розовый	3/435
<i>Candida inconspicua</i>	3	0	Белый, розовый	435
<i>Candida kefyr</i>	15	0	Розовый, пурпурный	435/257
<i>Candida krusei</i>	43	27	Бледно-розовый, пурпурный (шершавая поверхность, широкие белые края)	435/5025
<i>Candida lambica</i>	5	0	Розовый	5135
<i>Candida lusitanae</i>	21	4	Розовый, серо-пурпурный	5135/5155
<i>Candida norvegensis</i>	5	0	Белый, бледно-розовый (слегка шероховатая поверхность, широкие бледные края)	435
<i>Candida parapsilosis</i>	74	2	Белый, бледно-розовый	435
<i>Candida pelliculosa</i>	7	0	Розовый, бледно-пурпурный	434
<i>Candida tropicalis</i>	54	6	От темно-синего до сине-серого, темный венчик на агаре	548/549
<i>Candida utilis</i>	2	0	Розовый, пурпурный	434/5155
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0	Розовый, пурпурный	434
<i>Cryptococcus neoformans</i>	23	1	Серый, бледно-розовый	2/434
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	2	0	Розовый	434
<i>Geotrichum spp.</i>	5	1	Белесый либо розовый (в 2 случаях – позеленение агара), либо пурпурный, ворсинки	5405
<i>Pichia spp.</i>	10	1	Значительная вариабельность – розовый, серо-пурпурный, с зелеными краями, у 2 штаммов – темный венчик на агаре	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22	6	Бело-пурпурный	435/5155
<i>Trichosporon spp.</i>	34	10	Вариабельность – маленькие бледные колонии, грязно-розовый, грязно серо-зеленый (потемнение и шероховатость колоний при длительной инкубации)	5165/5635-5645

A – в качестве референтных показателей использовалась пантонная шкала. Описание «бледно розовый - пурпурный» соответствует грязно-коричневатому оттенку колоний с узким бледным краем (Рисунок 1).

данных микроорганизмов; среди прочих видов только колонии изолятов *Geotrichium* имели подобный оттенок. Тем не менее, сами по себе эти колонии окрашивались в розовый цвет, кроме того, их диаметр был значительно меньше, чем у колоний *S.albicans*, а зеленый оттенок возникал при окрашивании агара под поверхностью колоний (Рисунок 1D). Подобные особенности нехарактерны для *S.albicans* – в данном случае в зеленый цвет окрашивались сами колонии. На основании сказанного, чувствительность и специфичность при идентификации *S.albicans* по зеленому цвету колоний составляет 100%.

Изоляты *S.tropicalis* (n = 54): после 48 часов инкубации у всех колоний центральная часть окрашивалась в четкий темно-синий цвет, вокруг колоний в агаре образовывался темно-коричневый либо пурпурный венчик (Рисунок 1E). Аналогичное окрашивание колоний было характерно для многих видов микроорганизмов, однако образование темного венчика в агаре присутствовало только при росте изолятов *S.tropicalis*, а также 2 из 12 изолятов идентифицированных как *Pichia* sp. Чувствительность и специфичность идентификации *S.tropicalis* по темно-синему цвету колоний с коричнево-пурпурным венчиком в агаре составляла >99%.

Колонии *Trichosporon* sp.: после 48 часов инкубации отмечалось четкое, но разнообразное окрашивание. Изоляты образовывали мелкие бледные колонии, цвет которых варьировался от грязно-розового до грязно серо-зеленого (Рисунок 1 F). После 72 часов инкубации колонии темнели и приобретали характерный шершавый вид. После 48 часов инкубации на среде CHROMagar Candida изоляты, идентифицированные как *Pichia* sp. (на основании особенностей ассимиляции API ID32D) также образовывали атипичные и вариабельные колонии (образования аскоспор не зарегистрировано, таким образом, истинность идентификации сомнительна). 2 изолята *Pichia* sp. практически не отличались от колоний *S.tropicalis*. В одном случае образовывались колонии с темно-пурпурной центральной частью и зеленым ободком. Прочие 8 изолятов окрашивались не так ярко – их цвет варьировался от коричнево-розового до серовато-пурпурного, без образования венчика в агаре.

Все 43 изолята *S.krusei* образовывали бледные, плоские колонии с сосочковидными отростками и широкими белыми краями (Рисунок 1G). После 48 часов инкубации на среде CHROMagar Candida колонии *S.krusei* заметно отличались от колоний прочих дрожжевых грибов – те были гладкими, коричнево-розовыми либо коричнево-пурпурными. Характерные для *S.krusei* особенности отмечались только при росте 5 изолятов *S.norvegensis* (Рисунок 1 H). Специфичность и чувствительность оценки *S.krusei* по бледно-розовому цвету колоний с шершавой поверхностью составляли >99% и 100%, соответственно.

При смешивании различных видов грибов в одной суспензии с последующим посевом на среду CHROMagar Candida, различные колонии легко распознавались по цвету и форме (Рисунок 2).

Жизнеспособность дрожжевых грибов при проращивании на среде CHROMagar Candida

Все 726 изолятов дрожжевых грибов, а также 30 дополнительных клонов дрожжевых грибов суб-культивировались на агаре Сабуро после 48 либо 72 часов инкубации на среде CHROMagar Candida. Для всех изолятов был характерен хороший рост, что свидетельствует о том, что проращивание в присутствии хромофора на среде CHROMagar Candida не влияло на жизнеспособность микроорганизмов.

Идентификация видов дрожжевых грибов с участием четырех специалистов – односторонний слепой эксперимент.

В рамках одностороннего слепого эксперимента 57 изолятов (представители 9 различных видов) дрожжевых грибов кодировались для идентификации, которая проводилась четырьмя независимыми специалистами. Им предлагалось идентифицировать изоляты по внешнему виду колоний, и указать свои соображения с указанием ссылок на референтные образцы каждого вида. Все 4 специалиста точно опознали все 22 изолята *S.albicans* после 24 и 48 часов инкубации. Для идентификации прочих микроорганизмов по внешнему виду колоний потребовалось 48 часов инкубации на изучаемой среде. После 48-часовой инкубации специалистам удалось правильно идентифицировать все изоляты *S.tropicalis*, *S.krusei*, *Trichosporon* spp. Исследователям не удалось идентифицировать прочие виды микроорганизмов, ни после 24, ни после 48 часов инкубации, тем не менее, они не приняли ни один из них за *S.albicans*, *S.tropicalis*, *S.krusei*, *Trichosporon* spp. Таким образом, среда CHROMagar Candida может использоваться для дифференциации *S.albicans*, *S.tropicalis*, *S.krusei*, *Trichosporon* spp от прочих видов дрожжевых грибов.

Селективность среды CHROMagar Candida в отношении дрожжевых и плесневых грибов

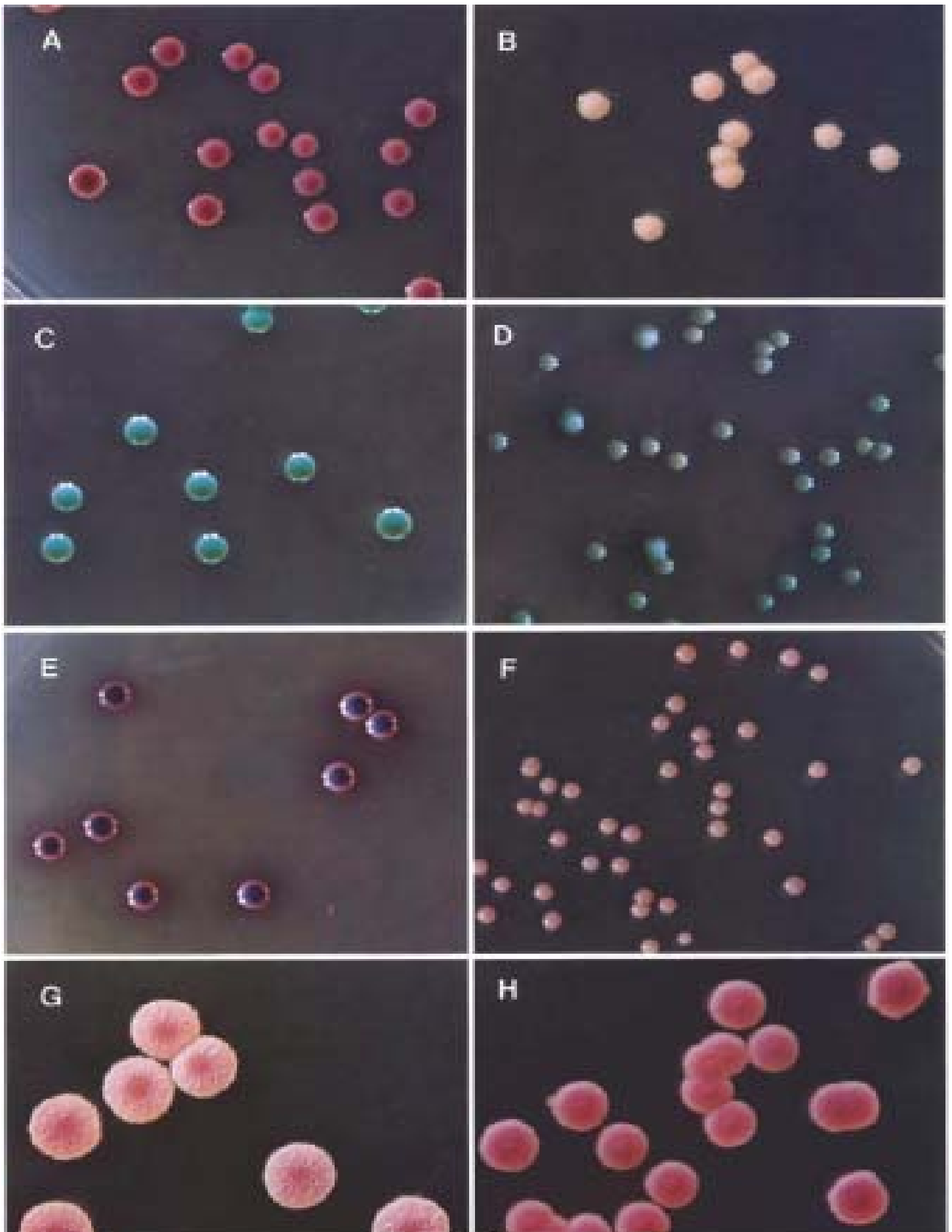
Для определения селективности CHROMagar Candida в качестве изолирующей среды для использования в рутинной микологической практике, использовалась панель изолятов – представителей различных видов бактерий плесневых грибов. Ни один из видов бактерий, а именно - *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecialis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, и *Streptomyces albidus* – не рос на среде CHROMagar Candida после 72 часов инкубации при 37°C. При посеве 116 вагинальных мазков, 113 – оральных и 110 аноректальных рост отмечался только у 4 аноректальных мазков. Во всех 4 случаях идентифицированы *E.coli*, окраска колоний – от розового до пурпурного; форма и размер колоний были типичны для бактерий и значительно отличались от дрожжевых грибов.

При посеве 66 изолятов плесневых грибов на среде CHROMagar Candida у большинства из них рост сохранялся. Исключение – ряд дерматофитов; 4 из 23 изолятов не прорастали после 3 недель инкубации при температуре 25°C; кроме того, изоляты *Ventricillium* sp. и *Phoma* sp. роста не отмечалось после 2 недель инкубации. Прочие 60 изолятов образовывали колонии обычного цвета и внешнего вида, за исключением *Scopulariopsis brevicaulis* – в данном случае после 48 часов инкубации образовывались колонии плесневых грибов сине-зеленого цвета. Тем не менее, в данном случае на обратной стороне колонии не отмечалось характерных признаков – в центре, в точке посева колония окрашивалась в черный цвет, а участок сине-зеленого цвета чаще всего не достигал границ колонии.

Зависимость окрашивания колоний от использованной партии среды CHROMagar Candida

Определение цвета колоний проводилось дважды, с использованием панели из 197 изолятов, которые высевались на среду CHROMagar Candida из двух различных партий. Отмечались минимальные отличия по окрашиванию колоний – при использовании одной партии коричнево-розовый либо коричнево-пурпурный цвет большинства колоний дрожжевых грибов был несколько темнее, чем при использовании другой партии. Характерные особенности колоний *S.albicans*, *S.krusei*, *S.tropicalis* при использовании обеих партий сред были идентичны.

Рисунок 1



A – темно-розовые колонии (побледнение по краям) – *C. glabrata*, культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. **B** – бледные колонии *S. parapsilosis* культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. **C** – Зеленые колонии (побледнение по краям) *C. albicans*, культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. **D** – Колонии изолята *Geotrichum* sp. - культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C; в отличие от *C. albicans*, данный изолят образует небольшие, бледные колонии с шершавой поверхностью, а также зеленый венчик на агаре. **E** – Колонии *C. tropicalis* - культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. Исключительно у этих 2 видов отмечалось

образование пурпурного венчика на агаре вокруг темных сине-серых колоний (бледные края с оттенком розового). **F** – Колонии *Trichosporon* sp. - культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. Изолят образовывал мелкие колонии грязно-розового цвета; прочие изоляты образовывали мелкие колонии серо-зеленого оттенка. **G** – Колонии *C. krusei* - культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. Изоляты образовывали крупные шероховатые колонии с широкими бледными краями. **H** – Колонии *C. norvegensis* - культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37°C. Лишь 1 из 21 протестированного вида грибов образовывал колонии, похожие на колонии *C. krusei* на данной среде. Увеличение × 2.

Использование CHROMagar Candida в качестве изолирующей среды для дрожжевых грибов

Состав среды CHROMagar Candida предполагает первичную изоляцию дрожжевых грибов. Особенности среды изучались при культивировании 339 оральных, вагинальных и аноректальных мазков, кроме того, использовано 9 образцов ногтей и кожи. Посев осуществлялся на среде CHROMagar Candida и агаре Сабуро с хлорамфениколом и гентамицином. 78 образцов дали рост культур на обеих средах. Случаев, когда рост определенной колонии отмечался на среде CHROMagar Candida и не отмечался на агаре, и наоборот, не зарегистрировано. Большинство выделенных дрожжевых грибов относились к виду *C. albicans* и легко опознавались по зеленому цвету колоний на среде CHROMagar Candida. Как указано выше, отмечался рост *E. coli* при посеве 4 аноректальных мазков. Таким образом, в рамках настоящего исследования, среда CHROMagar Candida была более селективной для изоляции дрожжевых грибов, чем агар S Сабуро. При посеве 2 оральных мазков отмечался рост смешанной культуры дрожжевых грибов – это было сразу заметно по различному окрашиванию

колоний на среде CHROMagar Candida. В одном случае в состав смешанной культуры входили *C. albicans* + *C. glabrata*, в другом – *C. albicans* + *C. famata*. 8 образцов ногтей и 1 образец кожи: в 1 случае выделена культура *C. albicans*, в 3 случаях – *C. famata*, в 3 случаях – *Trichosporon* sp., в 1 случае – *Trichosporon* sp. + *C. famata*, еще в одном – *Geotrichium* sp. + *C. famata*. Во всех смешанных изолятах различные виды микроорганизмов были легко отличимы по цвету колоний.

В свежем клиническом материале распространенность смешанных изолятов была невелика. По контрасту, в ходе исследования была получена партия из 74 образцов, обозначенных как чистые изоляты дрожжевых грибов (партия не относилась к клиническим материалам) полученная у ВИЧ-положительных пациентов. При посеве этих образцов на среду CHROMagar Candida в 14 выявлен рост колоний различного цвета (в 3 случаях отличия были значительно выражены) – при дальнейшем анализе выяснилось, что все образцы представлены различными видами *Candida*. Неизвестно, отражает ли смешанная флора настоящее состояние клинического материала, или же смешение произошло в результате перекрестного загрязнения после изоляции – тем не менее, в результате культивирования на среде CHROMagar Candida эти образцы были безошибочно идентифицированы как смешанные культуры.



Рисунок 2. Колонии, образованные смесью 4 видов *Candida* - культивирование на среде CHROMagar Candida в течение 48 часов при 37 °C. Все 4 вида отличаются по особенностям колоний: 2 розовых колонии *C. glabrata*, 2 сине-пурпурных колонии *C. tropicalis* (характерные венчики на агаре не очень заметны при использованном для фотографирования освещении), 4 зеленых колонии *C. albicans*, 2 больших, бледно-розовых шершавых колонии *C. krusei*. Увеличение × 5.5.

Обсуждение

Для использования в рутинной практике изоляции и дифференциации дрожжевых грибов, индикаторная среда должна соответствовать ряду параметров. Она должна поддерживать рост дрожжевых грибов, но не бактерий. Если на среде сохраняется рост не только дрожжей, но и других грибов, не следует считать это безоговорочным недостатком – во многих случаях невозможно прогнозировать, какие именно грибки представлены в образце – дрожжевые либо плесневые. Пригодность среды для дифференциации определяется возможностями к точному определению различных видов дрожжевых грибов, которые чаще всего встречаются в клинических образцах. Использование среды должно облегчать процесс распознавания смешанных культур, а воздействие индикаторных веществ на грибки не должно влиять на их жизнеспособность при дальнейшем культивировании. Среда CHROMagar Candida соответствует всем перечисленным требованиям.

Естественно, при наличии цветовой слепоты различить особенности колоний различных видов дрожжевых грибов, выращенных на среде CHROMagar Candida довольно сложно. Особенности использования среды специалистами с различными формами цветовой слепоты не изучались. Тем не менее, в лабораторной практике лицам с цветовой слепотой редко поручают проводить идентификацию микроорганизмов, поскольку в данном случае при проведении большинства тестов требуется различать и дифференцировать цвета.

На новой среде сохраняется рост большинства плесневых и дрожжевых грибов, выделенных из клинических образцов (исключения касаются, в основном, дерматофитов), и в значительной степени замедляется рост большинства бактерий, даже тех, что в больших количествах присутствуют в аноректальных мазках. Экспозиция среды не влияет на жизнеспособность грибов. Среда обеспечивает значительную степень отличий между наиболее распространенными видами дрожжевых грибов. Цветовые отличия колоний *C. albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis* и прочих видов были значительно более выражены, чем при использовании старых дифференциальных сред для дрожжевых грибов. Четкий и уникальный зеленый цвет, характерный для изолятов *C. albicans* позволяет идентификацию данного вида грибов без проведения тестов на образование трубок роста и дополнительных лабораторных анализов. Абсолютная специфичность зеленой окраски колоний *C. albicans* зарегистрирована при анализе 285 изолятов в рамках настоящего исследования. Ни один из 21 прочих видов дрожжевых грибов, которые использовались в настоящем исследовании, не образовывал колоний, которые можно было бы принять за колонии *C. albicans* – с учетом собственно цвета колоний и зеленого окрашивания агара, характерного для 2 изолятов *Geotrichium*. Этой особенности достаточно для того, чтобы рассматривать использование данной среды в рутинной практике изоляции дрожжевых грибов – поскольку при выявлении *C. albicans* в идентификации прочих изолятов дрожжевых грибов уже нет необходимости.

Более того, данная среда позволяет дифференциацию *C. krusei* и *C. tropicalis* от прочих микроорганизмов. Цвет колоний *C. tropicalis* после инкубации в течение 48 часов не был уникален – его серо-голубой оттенок был почти идентичен цвету колоний 2 изолятов *Pichia* spp. Крупные, шершавые колонии с белыми краями, образованные 43 изолятами *C. krusei*, также образовывались при культивировании *C. norvegensis*. *C. norvegensis* редко обнаруживается в клинических образцах, тем не менее, тот факт, что колонии образованные *C. krusei* нельзя считать уникальными, подчеркивает зависимость аутентичной идентификации от полноценного морфологического и физиологического тестирования.

При анализе грибковых культур внешний вид колоний, полученных при культивировании на изолирующей среде нельзя считать заменой результатам полноценного идентификационного тестирования. Среда CHROMagar Candida не предлагается использовать в качестве заменителя полноценного протокола идентификации. Единственным исключением считаются случаи, когда из клинического образца выделяются гладкие колонии зеленого цвета, характерные для *C. albicans*. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что в подобном случае для идентификации дополнительных тестов не требуется – в том числе и теста на образование трубок роста. Ценность данной среды еще и в том, что она упрощает процесс распознавания смешанных культур при посеве на одну среду, а в некоторых случаях позволяет дальнейшую идентификацию отдельных видов дрожжевых грибов. По данным одностороннего слепого теста с участием специалистов, не включенных в проведение прочих мероприятий исследования, среду CHROMagar Candida можно успешно использовать для дифференциации изолятов *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. Trichosporon*.

В отношении способности к изоляции дрожжевых грибов из клинических изолятов с подавлением роста бактерий эффективность среды CHROMagar Candida сопоставима с параметрами агара Сабуро. Очевидны преимущества изученной среды по параметру определения смешанных культур дрожжевых грибов (хотя при прямом посеве клинического материала на среду CHROMagar Candida было выявлено 2 случая смешанных грибковых инфекций). Мы работали с несколькими случаями, когда культуры, изначально маркированные как чистые, при культивировании на среде CHROMagar Candida дали рост смешанных грибковых культур *Candida*.

Среда CHROMagar Candida может быть с успехом использована в микологической практике. Она может использоваться в качестве изолирующей и дифференциальной среды при работе с клиническими образцами, которые могут содержать дрожжевые грибки. Кроме того, она может использоваться в качестве дополнительной дифференциальной среды при идентификации дрожжевых грибов, выделенных на других средах.

Благодарности

Благодарим за техническую помощь Peter De Backker, Marc Van der Flaes, Luc Van Nuffel; благодарим за фотографирование Hans Henderickx и Lambert Leijssen.