



# Сохранение жизнеспособности патогенных грибов в транспортной системе Copan ESwab: оценка эффективности применения системы в соответствии с методами, изложенными в стандарте M40-A2 Института клинических и лабораторных стандартов, с минимальными модификациями

Bharat Gandhi,<sup>a, d</sup> Richard Summerbell,<sup>b, c</sup> Tony Mazzulli<sup>a, d</sup>

<sup>a</sup>Отделение микробиологии, Больница Маунт Синай и университетская система здравоохранения, Торонто, Онтарио, Канада

<sup>b</sup>Компания «Sporometrics», Торонто, Онтарио, Канада

<sup>c</sup>Школа общественного здравоохранения Dalla Lana, Университет Торонто, Торонто, Онтарио, Канада

<sup>d</sup>Отделение лабораторной медицины и патофизиологии, Университет Торонто, Торонто, Онтарио, Канада

**РЕЗЮМЕ** Оценивали жизнеспособность патогенных грибов в транспортной системе Copan ESwab. Тесты на жизнеспособность проводили в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) «Метод посева тампоном» (документ M40-A2) при комнатной температуре и температуре хранения в холодильнике. Разработана система стандартизации гомогенных суспензий конидий разного размера и спорангиоспор гифомицетов. В общей сложности 19 клинических и эталонных штаммов были доведены до стандарта мутности 0,5 по Макфарланду с помощью обычного фотометра. Оптическую плотность суспензий измеряли на спектрофотометре. Для всей исследуемой панели образцов количество колоний было равно или превышало количество колоний в момент времени ноль. Результаты продемонстрировали, что система Copan ESwab эффективно поддерживает жизнеспособность оппортунистических грибов не менее 48 ч.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** CLSI M40-A2, система Copan ESwab, патогенные грибы, фотометрическая коррективировка концентрации инокулята

Стандарт M40-A2 Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) описывает методы оценки способности транспортных систем поддерживать жизнеспособность патогенных микроорганизмов до 48 ч в процессе транспортировки при комнатной температуре (КТ) (20–25°C) и при температуре хранения в холодильнике (ХТ) (2–8°C) (1). Как правило, стандартная панель бактериальных штаммов, выбранных для валидации транспортных сред, представляет собой разнородную группу микроорганизмов, вызывающих бактериальное заражение. Однако эта панель не включает грибы.

Официальные данные по жизнеспособности гифомицетов при транспортировке с помощью систем, использующих тампоны, отсутствуют. Однако в 2010 г. на 110-й конференции Американского общества микробиологии в стендовом докладе были представлены предварительные данные (2). Исследование, опубликованное в 2010 г., проводилось лишь при комнатной температуре.

В этом исследовании 100 мкл стандартизованного инокулята наносили прямо на каждый флок-тампон, после чего рассеивали аликвоты по 10 мкл на чашки со средой для контрольного подсчета колоний. В отличие от рекомендаций Snyder et al. (1), которые также оценивали набор для транспортировки Copan ESwab, CLSI рекомендует, чтобы для адсорбции материала на флок-тампон со дна лунки микропланшета со 100 мкл инокулята отводилось определенное время. Рекомендуется выдерживать тампоны при комнатной температуре и при температуре холодильника. Настоящее исследование было спланировано с учетом рекомендаций CLSI так, чтобы дать возможность произвести стандартную оценку транспортной системы Copan ESwab (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, CA) в отношении описанных ниже патогенных грибов. Вследствие трудоемкости, большого количества необходимых ресурсов и ограничений, связанных с местом в термостатах, исследования такого типа проводят редко.

(Результаты данной работы были частично представлены на 117-й конференции Американского общества микробиологии, Новый Орлеан, Луизиана, 3–6 июня 2017 г.).

Получено 15 сентября 2017 г. Возвращено для переработки 26 октября 2017 г. Принято 14 ноября 2017 г.

Принятая рукопись опубликована онлайн 22 ноября 2017 г.

**Для цитирования** Gandhi B, Summerbell R, Mazzulli T. 2018. Оценка эффективности транспортной системы Copan ESwab в отношении сохранения жизнеспособности патогенных грибов посредством методов, описанных в стандарте M40-A2 Института клинических и лабораторных стандартов, с модификациями J Clin Microbiol 56:e01481-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01481-17>.

**Редактор** David W. Warnock

**Авторское право** © 2018 Gandhi et al. Эта статья открытого доступа, распространяемая в соответствии с условиями [лицензии Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) с указанием авторства.

Корреспонденцию направлять Bharat Gandhi, [bharatgandhi@gmail.com](mailto:bharatgandhi@gmail.com).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовлена панель для тестирования, включавшая часто выделяемые в клинической лаборатории и клинически значимые условно-патогенные микроорганизмы. Оценку жизнеспособности проводили, используя методы, изложенные в документе CLSI M40-A2, с минимальными модификациями, необходимыми ввиду физических свойств фунгального инокулята. Наиболее важные касались методов получения однородных суспензий гидрофобных грибов, таких как *Aspergillus* spp. (3); кроме того, был решен вопрос точного подсчета быстро растущих колоний. Методы стандартизации суспензий были модифицированы и валидированы, чтобы обеспечить достоверную оценку результатов. В частности, была разработана быстрая и практичная процедура стандартизации плотности клеточной суспензии фотометрическим способом. Данное исследование — первое, в котором используются такие методы.

**Исследуемые изоляты.** Была сформирована диагностическая панель из дрожжей и гифомицетов, включая эталонные штаммы для контроля качества, клинические изоляты, выделенные из транспортных систем с тампонами, и возбудители поверхностных микозов, выделенные в стандартных крупных лабораториях клинической микробиологии. Данная коллекция, включающая 19 исследуемых изолятов, состояла из 5 эталонных штаммов дрожжей (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida guilliermondii* ATCC 6260, *Candida glabrata* ATCC 66032 и *Cryptococcus neoformans* ATCC 66031), 3 эталонных дерматофитов (*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton tonsurans* ATCC 28942 и *Trichophyton rubrum* ATCC 28188), 5 условно-патогенных гиалиновых плесневых грибов (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Lecytophthora* sp., *Fusarium solani* и *Trichosporon* sp.), 3 грибов-зигомицетов (*Lichtheimia corymbifera*, *Mucor circinelloides* и *Rhizopus microsporus*) и 3 феоидных грибов (*Curvularia clavata*, *Phialophora americana* и *Alternaria alternata*). Идентификация условно-патогенных плесневых грибов на уровне вида была подтверждена независимой справочной лабораторией.

**Подготовка инокулята.** Штаммы, которые до этого хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  в криоконсерванте, перед проведением тестирования дважды пересеивали, сначала на агар Сабуро с декстрозой (Biomedica Unlimited Ltd.), чтобы убедиться в жизнеспособности и чистоте, а затем вторично на картофельный агар с глюкозой (Biomedica Unlimited Ltd.) для улучшения споруляции. Все чашки инкубировали в аэробных условиях при  $30^{\circ}\text{C}$  до достижения сплошного роста, при этом время инкубации колебалось приблизительно от 2 до 14 дней. Для приготовления инокулята использовали 5,0 мл (0,85%) стерильного физиологического раствора (Oxoid Inc.), содержащего 1 каплю Твин 20 (Biomedica Unlimited Ltd.), в соответствии с документом CLSI M38-A2 (3), выставляя на спектрофотометре 0 (обнуление) (WP-100DPlus, Walter Products Inc.). Добавление поверхностно-активного вещества Твин 20 для получения однородной суспензии бактерий не требуется (1), но его используют для приготовления однородных суспензий гидрофобных грибов (3). Этот модифицированный стерильный разбавитель на основе физиологического раствора наливали на поверхность чашки со зрелой культурой. Зрелая культура получается в том случае, когда точечная инокуляция в центре чашки дает только одну колонию, растущую к краям чашки. Примерно через 3 дня становятся видны невооруженным глазом окрашенные пылеобразные конидии, и тогда культура гриба считается достаточной зрелой, чтобы на ней можно было проводить лабораторные исследования. Первоначально организмы идентифицировали на уровне рода посредством переноса на клейкую ленту и репрезирования иглой. Первоначальная оценка этих методов подтвердила их надежность и воспроизводимость, но в дальнейшем проведение этих тестов не было сочтено необходимым. Пропагулы собирали, осторожно проведя тампоном по поверхности чашки. Грубую суспензию пипеткой переносили обратно в исходную пустую пробирку, перемешивали на вортексе и давали осесть в течение 30 мин. Верхнюю часть суспензии отделяли стерильной пипеткой от более тяжелого осадка, представляющего собой гифы. Эту надосадочную взвесь затем вручную доводили до стандарта мутности 0,5 по Макфарланду, используя карту Уикерхема, чтобы получить примерно от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл (4). Окончательное доведение до нужной мутности (0,5 по Макфарланду) проводили на фотометре DensiChek Plus (между 0,45 и 0,55). Соответствующие значения поглощения и процента пропускания получали, используя круглые стеклянные пробирки с физиологическим раствором, поскольку они имели завинчивающиеся крышки, предотвращающие разбрызгивание аэрозолей, и подходили к спектрофотометру. В соответствии с указаниями производителя близко к верху пробирки наносили линию, так что значения поглощения / пропускания можно было определять в той же точке, что и обнуление, проведенное при 530 нм на спектрофотометре. Значения записывали для сравнения с опубликованными значениями (4).

**Метод посева тампоном согласно стандарту M40-A2 CLSI.** Готовили инокуляты для модифицированного метода посева тампоном. Для каждой подготовленной пробирки с инокулятом, мутность которой была доведена до стандарта 0,5 по Макфарланду (от примерно  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл), готовили три 10-кратных разведения с концентрациями  $10^5$ ,  $10^4$  и  $10^3$  КОЕ/мл. Используя дозатор для многократного дозирования компании «Эппендорф», аликвоты разведений объемом 100 мкл вносили в лунки круглодонного 96-луночного микропланшета для титрования в трех повторностях для каждой суспензии и каждого

разведения. Тампон погружали в суспензию в лунке, давали впитаться в течение 10 с и переносили в устройство для транспортировки ESwab, содержащее 1 мл жидкой транспортной среды Эймса. Один набор тампонов с инокулятом держали при комнатной температуре (20–25°C), а второй в холодильнике (2–8°C). Через 0, 24 и 48 ч тампоны удаляли. Сначала три тампона тестировали в нулевой временной точке для каждого организма и каждого разведения, удаляя выбранные тампоны из устройства для транспортировки примерно через 5–15 мин. Устройства для транспортировки ESwab, включая тампон, встряхивали на вортексе, чтобы удалить из тампона остаток жидкости, и тампон выбрасывали. Устройства еще раз встряхивали на вортексе в течение 5 с. Для концентрации  $10^5$  КОЕ/мл, чтобы свести к минимуму потенциальный сплошной рост быстро расширяющихся колоний грибов, на чашки высевали только 50 мкл (вместо 100 мкл) разведения; при высеве аликвоты переносили пипеткой на три чашки для каждого двойного набора проверяемых тампонов и равномерно распределяли по поверхности с помощью стерильной петли на 10 мкл.

Полученное число колоний для каждого набора из трех чашек умножали на 2, чтобы получить эквивалентное инокулятам по 100 мкл число колоний. Для инокулятов с концентрацией  $10^4$  КОЕ/мл на две чашки для каждого набора наносили по 100 мкл и равномерно распределяли; после этого подсчитывали общее число колоний. Для инокулятов с концентрацией  $10^3$  КОЕ/мл 100 мкл высевали на одну чашку; поскольку проводилось тестирование двух параллельных инокулятов, этот тест фактически проводили в двух повторностях. После этого чашки заклеивали парафильмом, инкубировали при 30°C в аэробных условиях и ежедневно наблюдали за ростом культуры до тех пор, пока на всей чашке не образовывались отчетливые колонии. После появления роста колонии подсчитывали вручную, отмечая черным маркером на обратной стороне чашки и используя механический счетчик. После появления роста колонии грибов можно подсчитать точно так же, как и бактериальные колонии.

**ТАБЛИЦА 1** Количество колоний патогенных грибов, выросших через 24 и 48 ч

Организм	Количество колоний при концентрации <sup>a</sup> :														
	10 <sup>5</sup> КОЕ/мл при (ч):					10 <sup>4</sup> КОЕ/мл при (ч):					10 <sup>3</sup> КОЕ/мл при (ч):				
	0		24		48	0		24		48	0		24		48
	КТ	4°C	КТ	4°C	КТ	КТ	4°C	КТ	4°C	КТ	КТ	4°C	КТ	4°C	КТ
<b>Дрожжи</b>															
<i>Candida albicans</i>	723	842	822	>500	>500	171	133	283	152	>500	23	20	31	17	>500
<i>Candida krusei</i>	>500	>500	>500	>500	>500	297	208	>500	265	>500	34	34	295	22	>500
<i>Candida guilliermondii</i>	>500	>500	>500	>500	>500	456	387	>500	307	>500	98	67	294	75	>500
<i>Candida glabrata</i>	>500	>500	>500	466	>500	320	152	314	236	>500	38	25	79	31	321
<i>Cryptococcus neoformans</i>	>500	>500	>500	450	>500	207	241	309	306	>500	33	44	72	37	315
<b>Дерматофиты</b>															
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	332	375	378	405	401	61	28	26	20	33	8	7	6	9	11
<i>Trichophyton tonsurans</i>	441	>500	>500	399	375	39	37	32	41	34	4	3	4	2	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	>500	355	333	346	431	229	43	35	20	49	14	8	5	4	19
<b>Гиалиновые плесневые грибы/сапробы</b>															
<i>Aspergillus niger</i>	388	>500	>500	>500	>500	80	81	112	92	80	13	11	12	13	12
<i>Lecytophthora</i> sp.	400	>500	>500	360	480	100	100	46	62	81	8	9	5	10	9
<i>Fusarium solani</i>	>500	>500	>500	>500	>500	269	260	249	269	274	32	25	34	29	32
<i>Trichosporon</i> sp.	134	232	100	138	143	31	27	28	31	33	11	5	4	5	6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>500	>500	>500	>500	>500	260	197	239	264	213	15	13	19	14	13
<b>Зигомицеты</b>															
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	62	61	78	63	75	12	7	7	12	7	1	2	1	1	0
<i>Mucor circinelloides</i>	112	120	100	46	41	14	25	15	20	6	3	2	3	3	0
<i>Rhizopus microsporus</i>	160	НП	НП	НП	НП	25	НП	НП	36	НП	2	3	2	2	2
<b>Феоидные плесневые грибы</b>															
<i>Curvularia clavata</i>	74	67	80	81	45	18	14	15	13	10	2	1	2	1	1
<i>Phialophora americana</i>	>500	>500	450	470	321	106	98	77	102	54	16	14	6	7	6
<i>Alternaria alternata</i>	>500	>500	>500	>500	>500	230	305	300	187	199	16	24	28	25	18

<sup>a</sup>Среднее из трех повторностей в КОЕ/100 мкл. НП — не может быть подсчитано; КТ — комнатная температура (температура окружающей среды); 4°C — температура в холодильнике.

Зигомицеты, однако, растут быстро и дают сплошной рост уже через 2 дня. Кроме того, они не дают потемнения в месте начала роста колонии на обратной стороне чашки. В силу этого различить отдельные колонии, а значит, и сосчитать их сложно. Значения КОЕ были усреднены и внесены в таблицу. Те же шаги были предприняты в отношении контролей роста (посев рабочего инокулята на чашки).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изоляты тестировали один раз, с использованием одной серии ESwab. Даже при самом высоком разведении было возможно получить через 24 ч и через 48 ч число колоний, сходное с числом в момент времени 0 ч (таблица 1). Все изоляты, давшие в момент времени 0 ч  $\geq 5$  КОЕ для данного разведения инокулята, давали  $\geq 5$  КОЕ также через 24 ч и 48 ч при комнатной температуре и в холодильнике. Большинство исследованных изолятов давали от 30 до 300 КОЕ при разведениях  $10^4$ . Как подробно описано выше, этот подсчет упрощали для более быстрорастущих грибов, используя несколько чашек и уменьшая объем инокулята. Два из трех зигомицетов, т. е. *Mucor circinelloides* и *Lichtheimia corymbifera*, и один феоидный гриб, т. е. *Curvularia clavata*, дали подлежащее подсчету числу колоний только в разведениях  $10^5$ ; это виды с обширными колониями. Рост колоний *Rhizopus microsporus* не поддавался подсчету даже в этих условиях, однако гриб оставался весьма жизнеспособным. Все 19 организмов, которые высевали из исходных суспензий с мутностью, доведенной до 0,5 единиц по Макфарланду, давали значения пропускания приблизительно 71–80% при измерении на спектрофотометре с использованием в виде разбавителя физиологического раствора с Твин 20, что близко к показателям, которые приводятся в литературе (приблизительно 68–82%) (4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как правило, системы со средами для транспортировки используют для получения первичных образцов из уха, горла, влагалища, уретры, полового члена и ран, а не из образцов, предположительно колонизированных дерматофитами (напр., кожа, ногти и волосы). Однако в транспортных системах с тампонами часто пересылают образцы с кожи головы для исследования с калия гидроксидом (КОН) и посева. Сравнению этого метода с традиционным методом транспортировки соскобов кожи в черной бумаге, дающим сравнимые результаты, посвящены многочисленные исследования.

С научной точки зрения важно было проверить выживаемость широкого спектра патогенных грибов при таком способе транспортировки. Грибы представляют собой эукариотические организмы, в большинстве своем со сравнительно крупными и прочными клетками, если сравнивать их с бактериальными клетками. Тем не менее, нельзя считать само собой разумеющимся, что при транспортировке от пациента в лабораторию при использовании стандартных методов взятия образцов эти организмы сохраняют жизнеспособность. Кроме того, неизвестно, не является ли их сравнительно крупный размер или их физические свойства, такие как гидрофобная наружная поверхность или слизистое покрытие, препятствием для отделения от тампонов. В настоящем исследовании изучали потенциально важные с клинической точки зрения грибы с широким диапазоном физических свойств (гидрофобные и гидрофильные клеточные стенки, одноклеточные и многоклеточные пропагулы, гладкая или покрытая шипами оболочка), с разным цветом клеток (прозрачные, темные), скоростью роста и формой колоний (дискретные колонии, диффузный рост). Методы стандартизации инокулятов и подсчета колоний были модифицированы так, чтобы учесть эти различия. Еще важнее то, что эти модификации были нацелены на получение эквивалента бактериальному стандарту CLSI для клинически значимых грибов. Согласно критериям, изложенным в недавно пересмотренном втором издании стандарта CLSI M40-A2 для метода посева тампоном, для соответствия критерию жизнеспособности любой образец, хранившийся при 4°C и КТ, должен давать  $\geq 5$  КОЕ после периода хранения определенной продолжительности. Судя по полученным результатам, система для транспортировки Copan ESwab позволяет сохранять и восстанавливать рост самых разных грибов после хранения в течение 48 ч при 4°C и КТ. Однако исследование имело одно ограничение, а именно, оно проводилось не на реальных клинических образцах, которые могли содержать патогенные дрожжи или гифомицеты. Поэтому клинический образец может содержать иное количество микроорганизмов. Количество колоний через 24 ч и через 48 ч могло быть разным в зависимости от содержания микроорганизмов в образце. Это поддерживает стандарт CLSI (документ M40-A2) для валидации с использованием модифицированной процедуры. Рекомендуемые CLSI спектрофотометрические методы стандартизации суспензий конидий и спорангиоспор трудно использовать при работе с грибами, поскольку различия в цвете и размерах спор приводят к тому, что разные грибы при одном и том же количестве КОЕ дают различные показатели оптической плотности (4). Процессы стандартизации, учитывающие вид организма, обычно не применяются в микробиологических лабораториях, и персонал лаборатории с ними незнаком. В нескольких исследованиях сравнивали широко применяемые методы, напр., подсчет клеток на гемоцитометре — эта процедура предписывается стандартом EUCAST E.DEF9.1 (5–7), но лишь в единичных исследованиях изучали фотометры как альтернативу измерениям с использованием гемоцитометров и спектрофотометров (7, 8).

В нашем исследовании стандартизацию удалось оптимизировать с помощью простого фотометра DensiCheck Plus, который использовали для корректировки концентрации инокулятов; это оказалось очень хорошей альтернативой более дорогим и более сложным в обращении спектрофотометрам. Возможно, этим вопросам придется посвятить дальнейшие исследования; однако мы уверены, что система ESwab подходит для поддержания жизнеспособности грибов и их транспортировки в соответствии со стандартом CLSI для клинически значимых грибов.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Данное исследование проведено при финансовой поддержке компании «Copan Diagnostics Inc.», Муриета, Калифорния, США.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Quality control of microbiological transport systems; approved standard—2nd ed. CLSI document M40-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. Snyder JW, Munier GK, Schiavi CM, Johnson CL. 2010. Evaluation of the Copan liquid Amies elution swab (ESwab) for maintaining the viability of selected fungi and *Mycobacterium* spp., abstr F-2141. Abstr 110th Gen Meet Am Soc Microbiol.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—2nd ed. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol 29:393–394.
5. Aberkane M, Cuenca-Estrella A, Petrikou E, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Eurofung Network. 2002. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. J Antimicrob Chemother 50:719–722. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf187>.

6. Caligiore-Gei PF, Valdez JG. 2015. Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology. *Rev Argent Microbiol* 47:152–154. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>.
7. Petrikkou E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. 2001. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 39:1345–1347. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1345-1347.2001>.
8. Araujo R, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. 2004. A fast practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J Med Microbiol* 53:783–786. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05425-0>.