

評估 CMP™ 嗜氧檢體輸送管對臨床細菌之保存效果

邱彥昕¹ 謝賢修¹ 羅晟展¹ 黃玉君¹

楊士杰¹ 何耿德¹ 蔡岳廷^{1,2}

台美檢驗科技有限公司¹；國立台灣大學生命科學院生化科技學系²

摘要

根據 CLSI 之微生物運輸系統規範 M40-A (2003 年) 評估啟新生物科技有限公司生產之 CMP™ 嗜氧檢體輸送管的菌種保存效能。選用挑別菌 *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 43069) 與 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) 進行測試，將約 10⁶ CFU 之菌量接種於檢體輸送棒插入管中之培養基後，分別保存於室溫及 4°C 環境，模擬檢體運送環境過程。*N. gonorrhoeae* 於保存 0、8 及 24 小時後以生理食鹽水回收存活菌體，而 *S. pyogenes* 則於保存 0、8、24 及 48 小時後以生理食鹽水回收，取回收菌液進行十倍序列稀釋，並塗盤培養於 35°C，5% CO₂ 培養箱 24~48 小時後，計數生長之菌落數量，然後將回收菌量與 0 小時之菌量做比較。依據 CLSI 之標準：在 4°C 環境之下，菌量對數下降值 (Log reduction) 不可大於 3，且上升值不可大於 1；若在室溫環境之下，則菌量對數下降值不可大於 3。本試驗結果顯示，CMP™ 嗜氧檢體輸送管在 48 小時之內無論是室溫或者 4°C 環境下皆能夠有效保存 *S. pyogenes*，符合 CLSI M40-A 規範之要求。至於 *N. gonorrhoeae* 保存於室溫環境下 24 小時之內，均能夠符合規範之要求；而保存於 4°C 環境下，則可在 8 小時內符合要求。本試驗結果將可提供臨床微生物實驗室相關部門在選用檢體輸送管時之參考依據。

關鍵字：輸送培養基、檢體輸送管、淋病奈瑟氏菌、化膿性鏈球菌

前言

臨床細菌檢查主要是以顯微鏡觀察檢體中之細菌形態及分離培養，檢出後再加以鑑定，並透過藥敏試驗測試細菌對各種微生物劑之藥敏型式，以協助醫師診療^[1]，因此臨床採集之檢體，在運輸途中是否能受到妥善的保存，對於確保臨床檢體的送驗品質以及維持後續檢驗的正確性十分重要，其將直接影響醫師對病患之診斷與治療。除了正確的採檢方法外，檢體輸送管基質之設計配方、保存能力與保存條件也是相當重要的環節^[2-4]。檢體輸送管主要目的為維持檢體採樣棒上之菌量總數以及不同菌種間之相對比例^[5,6]，美國臨床與實驗室標準機構 (Clinical and

Laboratory Standard Institute, CLSI) 文件 CLSI M40-A^[7] 對輸送管在不同輸送時間的菌量數目維持能力有明確的規範。在規範中對 *Streptococcus pyogenes* 的測試，其保存時間須達到 48 小時，而對 *Neisseria gonorrhoeae*，其室溫保存時間須達到 24 小時方能符合規範要求。為評估由啟新生物科技有限公司生產之 CMP™ 嗜氧檢體輸送管的菌種保存效能，本研究根據 CLSI M40-A 規範之要求進行檢體輸送管保存菌種效能的驗證。

材料及方法

材料

採檢棒樣品：以 CMP™ 嗜氧檢體輸送管 (圖 1；啟新生物科技有限公司，台灣) 為

測試材料，共三批號（Lot no. 201. 913 及 926）。

測試菌株：*S. pyogenes* (ATCC 19615) 及 *N. gonorrhoeae* (ATCC 43069)。

培養基及稀釋液：接種的培養基採 blood agar plate (BAP, TSA II with 5% sheep blood)、chocolate agar 及 GermBank 菌種保存管，而稀釋液則使用 0.85% 無菌生理食鹽水，上述均購自啟新生物科技有限公司。

試驗菌之移種培養：庫存菌保存於 -70°C 之 GermBank 菌種保存管，試驗前取出移種在適當培養基，*S. pyogenes* 以 BAP 培養，*N. gonorrhoeae* 以 chocolate agar 培養，兩種菌皆培養於 35°C，5% CO₂ 培養箱，再挑取單一菌落移種兩次備用。

方法

根據 CLSI M40-A⁷ 的方法，挑選實驗菌株之單一菌落於培養基上培養 16 到 24 小時後，以 0.85% 無菌生理食鹽水 (pH 7.0±0.2)，調整菌量濃度到 1.5×10^8 CFU/mL (相當於 0.5 McFarland)，再以 0.85% 無菌生理食鹽水十倍稀釋使菌量濃度成為 1.5×10^7 CFU/mL，取 100 μL 稀釋菌液 (內含 10^6 CFU 之菌量) 分別接種到三個批號的 CMP™ 嗜氧檢體輸送管之棉棒上，再將棉棒置入嗜氧檢體輸送管中進行保存。以上程序不可超過 20 分

鐘，以避免接種之菌種存活數量降低。

CMP™ 嗜氧檢體輸送管之保存溫度分為室溫 (22.5±2.5°C) 以及 4°C；*S. pyogenes* 的保存時間共有 0、24 及 48 小時三組，而 *N. gonorrhoeae* 的保存時間共有 0 及 24 小時兩組，每個時間點皆以三個不同批號之 CMP™ 嗜氧檢體輸送管進行試驗。

每個保存時間點取出含兩種試驗菌 *S. pyogenes* 或 *N. gonorrhoeae* 之保存管後，將棉棒放置於 1 mL 0.85% 無菌生理食鹽水中劇烈震盪 15 秒，將震盪後之回收菌液連續進行五次之十倍序列稀釋，並將不同稀釋度之菌液各取 100 μL 接種於三片適當之培養基上，以無菌玻棒塗抹，置於 35°C，5% CO₂ 培養箱進行培養，經 16 到 24 小時後進行菌落計數，並將所得數據以平均之後取對數值做比較。

結果

室溫下之保存情況

對於 *S. pyogenes*，本實驗所使用之 CMP™ 嗜氧檢體輸送管在各時間點所含存活菌量濃度，與 0 小時之菌量濃度相比，保存 8 小時後之對數下降值為 0.23，保存 24 小時後之對數下降值為 0.39，保存 48 小時後之對數下降值為 0.56 (圖 2)。*N. gonorrhoeae* 之保存結果，保存 8 小時後之對數下降值為 1.28，保存 24 小時後之對數下降值為 1.92 (圖 3)。



圖 1. 本次試驗評估之 CMP™ 嗜氧檢體輸送管實品圖

4°C 下之保存情況

對於 *S. pyogenes*，本實驗所使用之 CMP™ 嗜氧檢體輸送管在各時間點所含存活菌量濃度，與 0 小時之菌量濃度相比，保存 8 小時後之對數下降值為 0.15，保存 24 小時後之對數下降值為 0.22，保存 48 小時後之對數下降值為 0.32（圖 4）。對於 *N. gonorrhoeae*，在保存 8 小時之內對數下降值為 2.13，但在保存 24 小時之後的對數下降值達到 3.50（圖 5）。

討 論

由試驗結果可得知，此次試驗所使用之嗜氧檢體輸送管對於 *S. pyogenes* 在室溫的環境下，其保存效果在 8 小時到 48 小時之內，皆能符合 CLSI M40-A 規範之菌量濃度對數下降值小於 3 的要求²；而在 4°C 環境下，其保存效果在 8 小時到 48 小時之內也符合 CLSI

M40-A 規範之菌量濃度對數下降值小於 3 且菌量濃度對數上升值小於 1 的要求^[2]。

對於 *N. gonorrhoeae* 的部分，在室溫的環境下，其保存效果在 8 小時到 24 小時之內，皆能符合 M40-A 規範之菌量濃度對數下降值小於 3 的要求，但在 4°C 環境下，其保存效果只能在 8 小時之內符合規範要求，在 24 小時其對數下降值達到 3.5，主要原因為 *N. gonorrhoeae* 之菌種特性不耐低溫^[9,10]，因此在檢體運輸過程中，不宜以低溫運送之^[1,10]。

市售相似產品 Copan M40 Transystem Amies without charcoal (C-M40, Copan Innovation Inc., Corona, CA, USA)、Starplex StarSwab II (SSII, Remel, Eobicoke, Ontario, Canada.)、Medical Wire & Equipment Transwab (MWET, Medical Wire & Equipment Co. Ltd., England.) 在相同試驗中^[6,11]，對 *S. pyogenes*

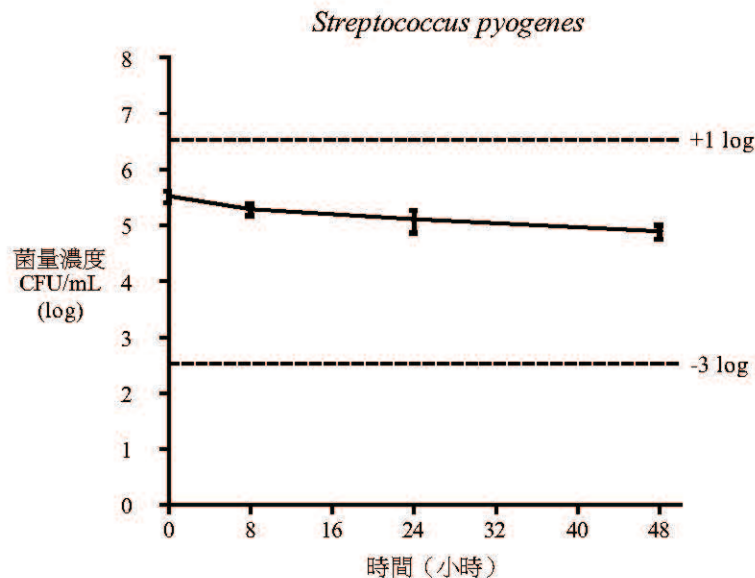


圖 2. *S. pyogenes* 保存於室溫下在不同時間點存活菌量之變化。經 48 小時保存後菌量濃度仍落於 CLSI M40-A 之允受範圍內。圖中 error bar 代表一倍標準差 (standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算濃度平均值 ± 標準差。共操作三個批號之輸送培養基，每個批號二重複，因此 n=6。在 0 小時為 $3.3 (\pm 0.8) \times 10^5$ CFU/mL，8 小時為 $1.9 (\pm 0.4) \times 10^5$ CFU/mL，24 小時為 $1.3 (\pm 0.6) \times 10^5$ CFU/mL，48 小時為 $7.8 (\pm 2.2) \times 10^4$ CFU/mL。

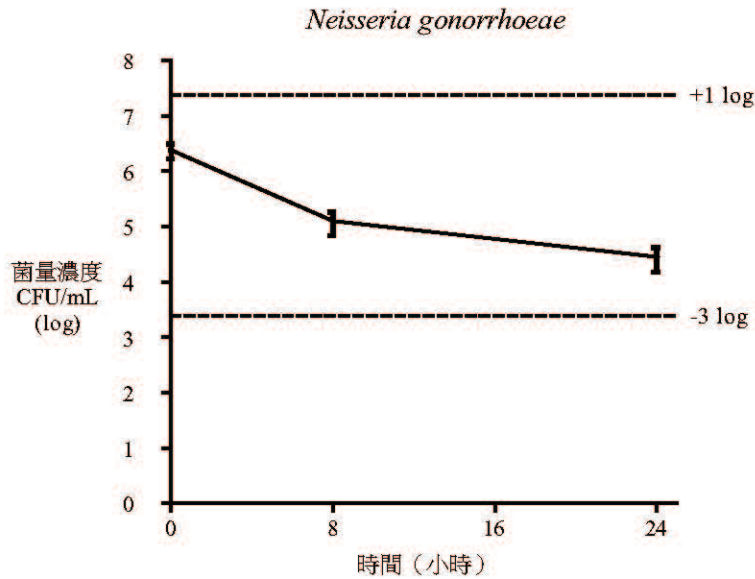


圖 3. *N. gonorrhoeae* 保存於室溫下在不同時間點存活菌量之變化。經 24 小時保存後菌量濃度仍落於 CLSI M40-A 之允受範圍內。圖中 error bar 代表一倍標準差(standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算濃度平均值±標準差。共操作三個批號之輸送培養基，每個批號二重複，因此n=6。在 0 小時為 $2.4 (\pm 0.7) \times 10^6$ CFU/mL，8 小時為 $1.3 (\pm 0.6) \times 10^5$ CFU/mL，24 小時為 $2.8 (\pm 1.3) \times 10^4$ CFU/mL。

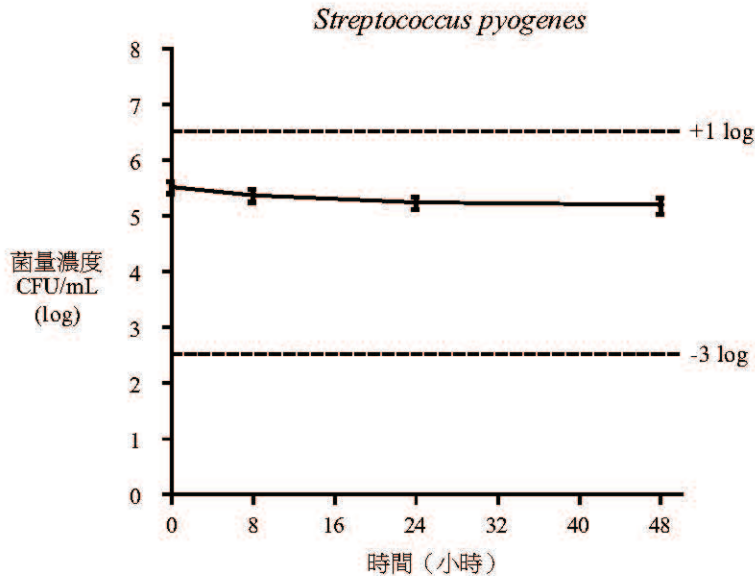


圖 4. *S. pyogenes* 保存於 4°C 下在不同時間點存活菌量之變化。經 48 小時保存後菌量濃度落於 CLSI M40-A 之允受範圍內。圖中 error bar 代表一倍標準差(standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算濃度平均值±標準差。共操作三個批號之輸送培養基，每個批號二重複，因此n=6。在 0 小時為 $3.3 (\pm 0.8) \times 10^5$ CFU/mL，8 小時為 $2.4 (\pm 0.6) \times 10^5$ CFU/mL，24 小時為 $1.8 (\pm 0.4) \times 10^5$ CFU/mL，48 小時為 $1.6 (\pm 0.5) \times 10^4$ CFU/mL。

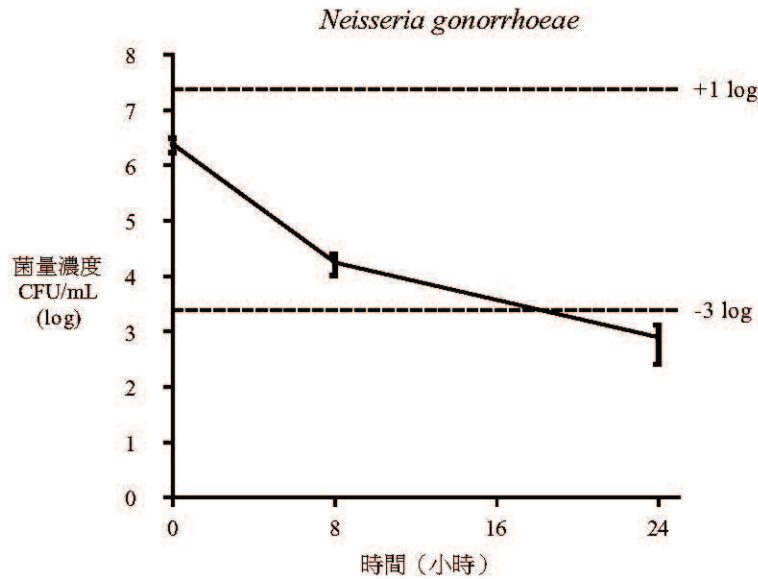


圖 5. *N. gonorrhoeae* 保存於 4°C 下在不同時間點存活菌量之變化。經 8 小時保存後菌量濃度落於 CLSI M40-A 之允受範圍內。圖中 error bar 代表一倍標準差 (standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算濃度平均值 ± 標準差。共操作三個批號之輸送培養基，每個批號二重複，因此 n=6。在 8 到 24 小時區間菌量濃度下降到允受範圍外。0 小時為 $2.4 (\pm 0.7) \times 10^6$ CFU/mL，8 小時為 $1.8 (\pm 0.7) \times 10^4$ CFU/mL，24 小時為 $7.8 (\pm 5.2) \times 10^2$ CFU/mL。

保存效果皆可維持 48 小時，此指出 CMP™ 嗜氧檢體輸送管與這些輸送管之菌量濃度變化並無明顯差異。對於 *N. gonorrhoeae* 在室溫中保存狀況，SSII 及 MWET 在 6 小時之對數下降值已達 2 和 3，且 24 小時後無法從採檢棒中分離出菌體，而 C-M40 在 24 小時後，對數下降值也在 2 以上，可知 CMP™ 嗜氧檢體輸送管對於 *N. gonorrhoeae* 之保存效能比 SSII 及 MWET 運送裝置相對地較佳。

參 考 文 獻

1. 蔡文城, 蔡岳廷。實用臨床微生物診斷學, 第十版。2011: 65-6, 97, 601-5, 653-5。九州圖書文物有限公司, 台北。
2. Roelofsen E, van Leeuwen M, Meijer-Severs GJ *et al.* Evaluation of the effects of storage in two different swab fabrics and under three different transport conditions on recovery of aerobic and anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3041-3.
3. Lauer BA, Masters HB. Toxic effect of calcium alginate swabs on *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1988; 26:54-6.
4. Mandler F, Sfondrini D. Evaluation of survival of bacteria on dry swabs and transport systems. *Ann Sclavo* 1977; 19:537-45.
5. Rishmawi N, Ghneim R, Kattan R *et al.* Survival of fastidious and nonfastidious aerobic bacteria in three bacterial transport swab systems. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1278-83.
6. Perry JL. Assessment of swab transport systems for aerobic and anaerobic organism recovery. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1269-71.
7. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Quality control of microbiological transport systems. Approved standard M40-A. 2003. NCCLS, Wayne, PA, USA.
8. Chapel T, Jeffries C, Gatewood C. Effect of medium temperature on recovery of gonococci. *Am J Clin Pathol* 1979; 72:84-7.
9. Ratner HB, Tinsley H, Keller RE *et al.* Comparison of the effect of refrigerated versus room temperature media on the isolation of *Neisseria gonorrhoeae* from genital specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21:127-8.

10. Sng EH, Rajan VS, Yeo KL, Goh AJ. The recovery of *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens: effects of different temperatures, transport times, and media. *Sex Transm Dis* 1982; 9:74-8.
11. Morosini MI, Loza E, Gutiérrez O *et al.* Evaluation of 4 swab transport systems for the recovery of ATCC and clinical strains with characterized resistance mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56:19-24.

Evaluation the Efficacy of CMP™ Aerobic Transtube for Use in the Preservation of Clinical Bacteria

Yen-Hsin Chiu¹, Shian-Shiou Shie¹, Cheng-Chan Lo¹, Yu-June Huang¹,
Shih-Chien Yang¹, Gen-Der Ho¹, Yueh-Ting Tsai^{1,2}

SuperLaboratory Ltd, New Taipei City, Taiwan¹;
Institute of Biochemical Science and Technology, College of Life Science, NTU, Taipei, Taiwan²

Abstract

The efficiency of bacteria preservation of CMP™ Transtube (Creative Biotechnology Co., Ltd. Taiwan.) was evaluated according to the CLSI approved standard M40-A “Quality control of microbiological transport systems”(2003). The experiments used fastidious clinical bacteria, *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus pyogenes*, to evaluate the efficacy of CMP™ transtube. After inoculated 10⁶ CFU organisms on the transtube, the transtubes were preserved in room temperature or at 4°C to simulate how the clinical specimen is transported. The survived *N. gonorrhoeae* were recovered by saline after 0, 8, 24 hours storage, and *S. pyogenes* were recovered after 0, 8, 24, 48 hours storage. The recovered bacterial suspensions were performed in a ten-fold serial dilution method, and then plating with spreading method and counting the number of the survival bacteria after incubating at suitable conditions. According to CLSI M40-A statement: “In room temperature, there should be no more than a 3 log decline in CFU between

the zero-time CFU count and the CFU of the swabs that were stored at different time interval; at 4°C, there should be no more than a 1 log increase in CFU and no more than a 3 log decline in CFU between the zero-time CFU and the CFU of the swabs that were stored at different time interval.” The results of this study showed that CMP™ Transtube can well preserved the *S. pyogenes* up to 48 hours whether stored in room temperature or at 4°C. It fulfills the CLSI M40-A guideline. The CMP™ Transtube can also well-preserved *N. gonorrhoeae* up to 24 hours in room temperature, but only last 8 hours at 4°C. The experiment result could be act as reference data when Clinical Microbiology Laboratory choosing their transport device.

Key word: Transport medium, Transtube, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*.