

## 評估厭氧檢體輸送管 CMP™ Anaerobic TranSwab 對厭氧菌之保存效能

邱彥昕<sup>1</sup> 謝賢修<sup>1</sup> 羅晟展<sup>1</sup> 黃玉君<sup>1</sup> 楊士杰<sup>1</sup> 何耿德<sup>1</sup> 蔡岳廷<sup>1,2</sup>

台美檢驗科技有限公司，新北市<sup>1</sup>；國立台灣大學生命科學院生化科技學系研究所，台北市<sup>2</sup>

### 摘要

為評估厭氧檢體輸送管 CMP™ Anaerobic TranSwab (啟新生物科技股份有限公司，台灣) 之菌種保存效能，吾等參考 CLSI 之微生物輸送系統之規範 M40-A (2003 年) 做為評估方法，選用厭氧菌 *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) 與 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919) 進行測試，將約 10<sup>6</sup> CFU 之菌量接種於棉棒後插入厭氧輸送裝置的培養基中，同時為模擬檢體不同的輸送條件，分別將 CMP™ Anaerobic TranSwab 保存於室溫及 4°C 環境。經過 0、24 及 48 小時後以生理食鹽水回收，取回收菌液進行十倍連續序列稀釋，然後取各稀釋液 100 µL 塗抹於平板培養基 Brain-heart infusion agar，培養在厭氧操作培養箱 (含 80% N<sub>2</sub>，10% CO<sub>2</sub> 及 10% H<sub>2</sub> 之混合氣) 48 小時之後，選取 3000 CFU 生長菌落之平板培養基進行菌落計數，再依稀釋度換算成總菌量，然後將各不同時間點回收之總菌量與 0 小時之總菌量做比較。依據 CLSI 之標準：在 4°C 環境之下，菌量對數值下降 (log reduction) 不大於 3，上升值不大於 1；在室溫環境之下，則菌量對數值下降不大於 3。本試驗結果顯示，CMP™ Anaerobic TranSwab 在 24 及 48 小時之保存時間無論是在室溫或 4°C 環境下皆能夠有效保存 *B. fragilis* 及 *P. acnes*，符合 CLSI M40-A 規範之要求。本試驗結果將可供作臨床微生物實驗室選用厭氧檢體輸送管的參考。

關鍵字：厭氧檢體輸送管、*Bacteroides fragilis*、*Propionibacterium acnes*

### 前言

病患檢體採集後，是否在運輸過程中受到妥善的保存，將影響後續病原菌的偵測判讀結果，為避免醫師因檢體保存不良而對病患之診斷與治療發生錯誤，臨床檢體的送驗品質的維護將具有重要性及必要性<sup>[1]</sup>。為獲得優質檢體，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是相當重要的環節<sup>[2,3]</sup>，維持檢體採樣棉棒上之菌量總數以及不同菌種間之相對比例<sup>[4,5]</sup>是檢體輸送管主要目的，在美國臨床與實驗室標準機構 (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) 文件 CLSI M40-A6 中有明

確規範厭氧輸送裝置在不同輸送時間維持菌量數目的要求。在規範中有關厭氧菌 *Bacteroides fragilis* 及 *Propionibacterium acnes* 的保存效能，須經過 48 小時的測試才能判斷是否符合規範要求。為評估 CMP™ Anaerobic TranSwab 對厭氧菌的保存效能，本研究根據 CLSI M40-A 規範之要求進行厭氧菌保存效能的驗證。

### 材料及方法

供試之厭氧檢體採檢及輸送裝置：

為了評估厭氧輸送裝置 CMP™ Anaerobic TranSwab (圖 1) (啟新生物科技股份有限公司，台灣) 保存厭氧菌的效能，吾等共評估三批



圖 1. 本試驗評估之厭氧輸送管 CMP™ Anaerobic TranSwab 實品圖

號 (Lot no. 051202, 120210 及 120213) 之測試物質。

#### 測試菌株：

包括兩種厭氧菌 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 及 *Propionibacterium acnes* ATCC 6919。

#### 培養基及稀釋液：

厭氧菌菌株確認的培養基為 Brain-heart infusion agar (BHI agar)，而稀釋液則使用 0.85% 無菌生理食鹽水；培養基及稀釋液均購自啟新生物科技有限公司。

#### 試驗菌之移種培養：

庫存的兩種厭氧菌保存於  $-70^{\circ}\text{C}$  之 GermBank 菌種保存管，試驗前取出一顆陶瓷珠移種於 BHI agar，然後培養於厭氧操作培養箱 [含 80%  $\text{N}_2$ 、10%  $\text{CO}_2$  及 10%  $\text{H}_2$  之混合氣，並以 Anaerobic indicator (Oxoid, England) 監測培養箱內的無氧狀態]，再挑取單一菌落移種兩次作為備用。

#### 測試方法：

根據 CLSI M40-A<sup>[6]</sup> 的 elution method (沖提法)，挑選測試菌種之單一菌落接種

BHI agar，培養 368 小時後，挑選菌落種入含 0.85% 無菌生理食鹽水 ( $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ ) 的試管中，並調整菌量濃度至  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL (相當於 McFarland no. 0.5)，再十倍稀釋使菌量濃度成為  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL，以微量分注器取 100  $\mu\text{L}$  稀釋菌液分別接種到三個不同批號之 CMP™ Anaerobic TranSwab 之棉棒上，使棉棒約含  $10^6$  CFU 之菌量，再將棉棒置入厭氧輸送管中進行保存。以上之操作須於 20 分鐘內完成，以避免厭氧菌接觸氧氣過久導致存活數量減少。

CMP™ Anaerobic TranSwab 之保存時間分為 0、24 及 48 小時三組，於各時間點下再依保存溫度分為  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  以及室溫 ( $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ) 兩組，每個組別皆以三個不同批號 CMP™ Anaerobic TranSwab 進行二重複試驗。

在每個保存時間點取出兩種試驗菌之保存管後，以 1 mL 0.85% 無菌生理食鹽水劇烈震盪 15 秒以溶出棉棒上之菌體，將回收菌液連續進行 5 次之十倍稀釋，並將混合均勻的不同稀釋度菌液各取 100  $\mu\text{L}$  接種於三片 BHI agar 上，以無菌玻棒塗抹後，置於厭氧操作培養箱進行培養，48 小時後挑取生長菌落介於 30~300 間之平板進行菌落計數，再依稀釋度換算成總菌量，並將所得總菌數



平均後，取對數值進行比較。

## 結果

室溫下之厭氧菌保存效能：

本實驗所使用之 CMP™ Anaerobic TranSwab 在各時間點（24 及 48 小時之保存時間）所含 *B. fragilis* 存活菌量濃度與 0 小時之菌量濃度相比，保存 24 小時後之菌量對數值下降 0.26；保存 48 小時後之菌量對數值下降 0.30（圖 2）。對於 *P. acnes*，在保存 24 小時後之菌量對數值下降 0.36；保存 48 小時後之菌量對數值下降 0.52（圖 3）。

4°C 下之厭氧菌保存效能：

本實驗所使用之 CMP™ Anaerobic TranSwab 在各時間點（24 及 48 小時之保存時間）所含 *B. fragilis* 存活菌量濃度與 0 小時之菌量濃度相比，保存 24 小時後之菌量對

數值下降 0.14；保存 48 小時後之菌量對數值下降 0.24（圖 4）。對於 *P. acnes*，在保存 24 小時後之菌量對數值下降 0.13；保存 48 小時後之菌量對數值下降 0.08（圖 5）。

## 討論

在 CLSI M40-A<sup>[6]</sup> 的規範中提供了 Elution method（沖提法）和 Roll plate method（塗劃平板法）兩種標準方法評估厭氧檢體輸送管的表現差異，以挑選出在輸送過程可避免或減少檢體中菌體滋長或死亡的檢體輸送管。Elution method 是以相同濃度之菌液接種至棉棒，保存於檢體輸送管一定時間後，取出棉棒以生理食鹽水溶出菌體，經過連續稀釋後，再將不同濃度的稀釋菌液均勻塗抹（spread）於平板培養基 BHI agar，培養後再計算菌落數做為比較之依據，而 Roll plate method 則是接種不同濃度之菌液至棉棒，並

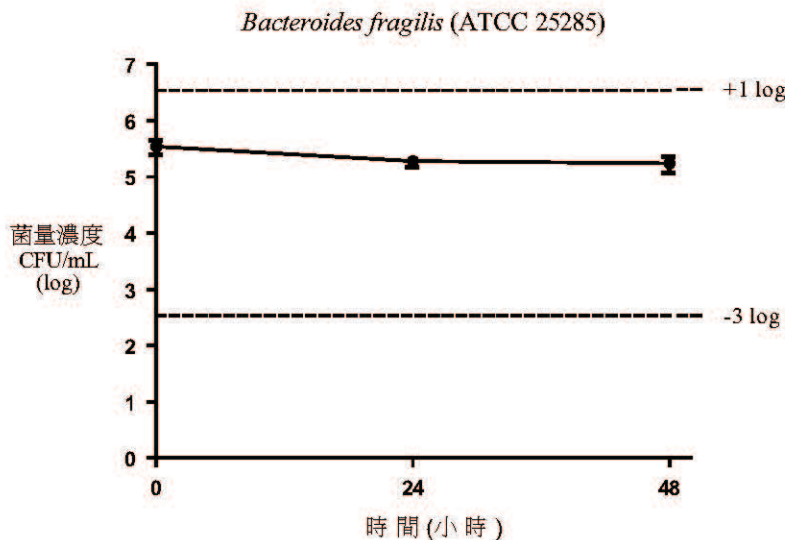


圖 2. *B. fragilis* 保存於室溫下在不同時間點存活菌量之變化。經 48 小時保存後菌量濃度仍落於 CLSI M40-A 之容許範圍內。圖中誤差棒 (error bar) 代表一倍標準差 (standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算細菌濃度平均值 ± 標準差。共操作三個批號之厭氧輸送裝置 CMP™ Anaerobic TranSwab，每個批號進行二重複測試，並選取兩片生長菌量適當的平板進行計數，因此 n=12 (n 為檢測總數)。在 0 小時為  $3.4 (\pm 1.0) \times 10^5$  CFU/mL，24 小時為  $1.9 (\pm 0.4) \times 10^5$  CFU/mL，48 小時為  $1.7 (\pm 0.6) \times 10^5$  CFU/mL。

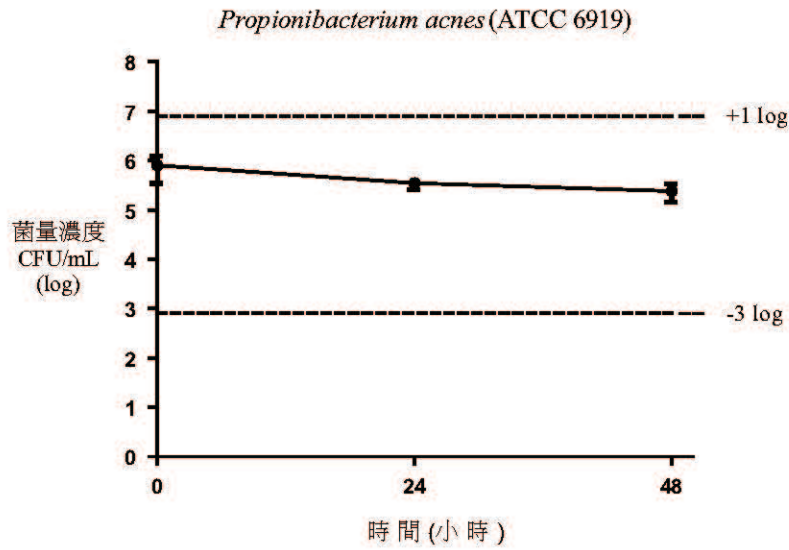


圖 3. *P. acnes* 保存於室溫下在不同時間點存活菌量之變化。經 48 小時保存後菌量濃度仍落於 CLSI M40-A 之容許範圍內。圖中誤差棒 (error bar) 代表一倍標準差 (standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算細菌濃度平均值 ± 標準差。共操作三個批號之厭氧輸送裝置 CMP™ Anaerobic TranSwab，每個批號進行二重複測試，並選取兩片生長菌量適當的平板進行計數，因此 n=12 (n 為檢測總數)。在 0 小時為 8.0 (±4.6) × 10<sup>5</sup> CFU/mL，24 小時為 3.5 (±0.9) × 10<sup>5</sup> CFU/mL，48 小時為 2.4 (±1.0) × 10<sup>5</sup> CFU/mL。

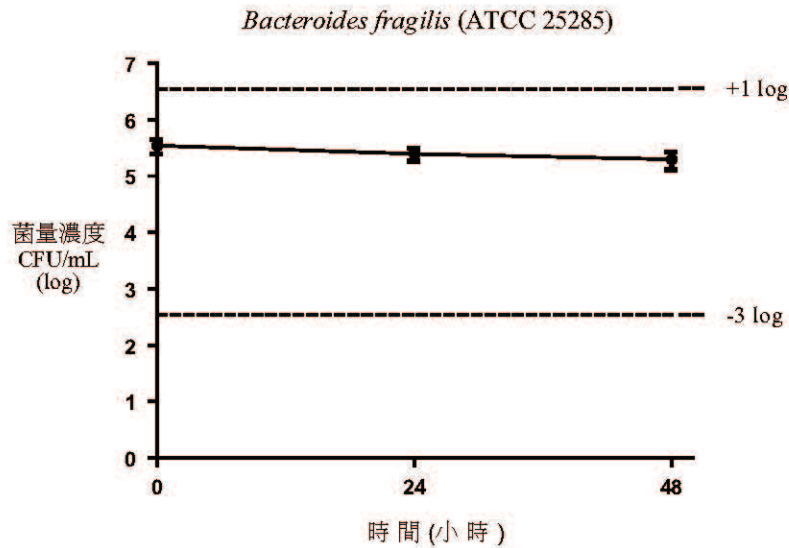


圖 4. *B. fragilis* 保存於 4°C 下在不同時間點存活菌量之變化。經 48 小時保存後菌量濃度仍落於 CLSI M40-A 之容許範圍內。圖中誤差棒 (error bar) 代表一倍標準差 (standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算細菌濃度平均值 ± 標準差。共操作三個批號之厭氧輸送裝置 CMP™ Anaerobic TranSwab，每個批號進行二重複測試，並選取兩片生長菌量適當的平板進行計數，因此 n=12 (n 為檢測總數)。在 0 小時為 3.4 (±1.0) × 10<sup>5</sup> CFU/mL，24 小時為 2.5 (±0.6) × 10<sup>5</sup> CFU/mL，48 小時為 2.0 (±0.7) × 10<sup>5</sup> CFU/mL。



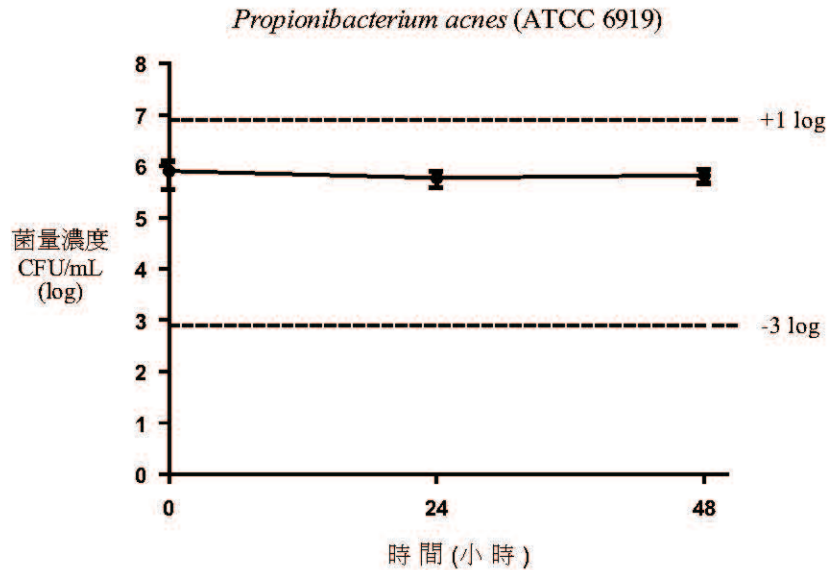


圖 5. *P. acnes* 保存於 4°C 下在不同時間點存活菌量之變化。經 48 小時保存後菌量濃度仍落於 CLSI M40-A 之容許範圍內。圖中誤差棒 (error bar) 代表一倍標準差 (standard deviation, SD)，數據表示方式為菌落計數換算細菌濃度平均值 ± 標準差。共操作三個批號之厭氧輸送裝置 CMP™ Anaerobic TranSwab，每個批號進行二重複測試，並選取兩片生長菌量適當的平板進行計數，因此 n=12 (n 為檢測總數)。在 0 小時為  $8.0 (\pm 4.6) \times 10^5$  CFU/mL，24 小時為  $5.9 (\pm 2.1) \times 10^5$  CFU/mL，48 小時為  $6.6 (\pm 2.0) \times 10^5$  CFU/mL。

保存於檢體輸送管一定時間後，直接將棉棒取出塗劃 (streak) 於 BHI agar，然後培養在 35°C 之厭氧環境中 48 小時後，觀察是否有菌落存活。雖然 Roll plate method 較近似於檢體輸送管之實際使用方法，但僅能提供定性之結果，無法提供量化之數據做為效能比較。為了瞭解不同時間點及不同保存條件下，厭氧檢體輸送管保存厭氧菌的效能，本試驗採用 Elution method 做為評估方式<sup>[7]</sup>。

由試驗結果得知，CMP™ Anaerobic TranSwab 對於 *B. fragilis* 在室溫的環境下，其保存效能在 48 小時之內，皆能符合 CLSI M40-A 規範之菌量濃度對數值下降小於 3 的要求；在 4°C 環境下，其保存效能在 48 小時之內也符合 CLSI M40-A 規範之菌量濃度對數值下降小於 3 且菌量濃度對數值上升小於 1 的要求 (表 1)。

對於 *P. acnes* 的部分，在室溫的環境下，其保存效能在 48 小時之內，皆能符合 M40-A 規範之菌量濃度對數值下降小於 3 的要求；在 4°C 環境下，其保存效能在 48 小時之內也符合 CLSI M40-A 規範之菌量濃度對數值下降小於 3，且菌量濃度對數值上升小於 1 的要求 (表 1)。

另外，試驗結果亦指出，厭氧檢體輸送管 CMP™ Anaerobic TranSwab 儲藏於 4°C 比室溫環境更能提升厭氧菌之存活率 (圖 4，圖 5 及表 1)。

在相同依據之評估試驗中<sup>[8-10]</sup>，市售相似產品 Copan ESwab (CE, Copan Innovation Inc., Corona, CA, USA)，Becton Dickinson CultureSwab (BDC; Becton Dickinson, NJ, USA) 及 Remel BactiSwab (RBS; Remel, Lenexa, KS, USA)，對於 *B. fragilis*，無論

表 1. 比較 CMP™ TranSwab 與國外上市之輸送培養基在不同保存的時間點對厭氧菌的保存效能

測試菌株	保存溫度	廠牌	24 小時	48 小時
<i>B. fragilis</i>	4°C	CMP <sup>a</sup>	-0.14 <sup>b</sup>	-0.24
		BDC	-0.28	-0.42
		CE	-0.08	-0.34
		RBS	+0.18	-0.61
	室溫	CMP	-0.26	-0.30
		BDC	-0.04	-0.17
		CE	+1.37	-0.19
		RBS	-0.16	-0.42
<i>P. acnes</i>	4°C	CMP	-0.13	-0.08
		BDC	-0.05	-0.17
		CE	-0.05	-0.15
		RBS	-0.20	-0.37
	室溫	CMP	-0.36	-0.52
		BDC	-0.02	+0.05
		CE	+0.07	+0.30
		RBS	+0.36	+0.05

<sup>a</sup> 縮寫：CMP, CMPTM Anaerobic TranSwab; BDC, Becton Dickinson CultureSwab; CE, Copan ESwab 及 RBS, Remel BactiSwab.

<sup>b</sup> 表中對數值 (log) 數據為各廠牌厭氧輸送培養基保存在不同環境經 24 及 48 小時後與 0 小時比較之變化；-，代表減少；+，代表增加。

在室溫或 4°C 之保存效能皆可維持 48 小時。在室溫下保存 24 及 48 小時後菌量濃度的變化上，CE 的對數值變化分別為上升 1.37 和下降 0.19，BDC 的對數值變化分別為下降 0.04 和下降 0.17，而 RBS 的對數值變化分別為下降 0.16 和下降 0.42。在 4°C 環境下保存 24 及 48 小時後，CE 的對數值變化分別為下降 0.08 和下降 0.34，BDC 的對數值變化分別為下降 0.28 和下降 0.42，而 RBS 的對數值變化分別為上升 0.18 和下降 0.61。對於 *P. acnes*，此三種產品同樣地無論在室溫或 4°C 之保存效能皆可維持 48 小時。在室溫下保存 24 及 48 小時後菌量濃度的變化

上，CE 的對數值變化分別為上升 0.07 和上升 0.30，BDC 的對數值變化分別為下降 0.02 和上升 0.05，而 RBS 的對數值變化為上升 0.36 和上升 0.05。在 4°C 環境下保存 24 及 48 小時後，CE 的對數值變化分別為下降 0.05 和下降 0.15，BDC 的對數值變化分別為下降 0.05 和下降 0.17，而 RBS 的對數值變化分別為下降 0.20 和下降 0.37 (表 1)。依據美國藥典 (USP)<sup>[11]</sup> 規範內容，菌量之對數值差異在 0.5 log 內可視為合理誤差範圍，此指出，國外廠牌之產品皆與 CMP™ Anaerobic TranSwab 一樣地對 *B. fragilis* 及 *P. acnes* 都有相同的保存效能。

### 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, 336-9, 1171。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. Mandler F, Sfondrini D. Evaluation of survival of bacteria on dry swabs and transport systems. *Ann Sclavo* 1977; 19:537-45.
4. 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.
5. Perry JL. Assessment of swab transport systems for aerobic and anaerobic organism recovery. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1269-71.
6. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Quality control of microbiological transport systems. Approved standard M40-A. 2003. NCCLS, Wayne, PA, USA.
7. 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.
8. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D et al. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1655-8.
9. Citron DM, Warren YA, Hudspeth MK et al. Survival of aerobic and anaerobic bacteria in purulent clinical specimens maintained in the Copan Venturi Transystem and Becton Dickinson Port-a-Cul transport systems. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38:892-4.
10. Van Horn KG, Rankin I. Evaluation and comparison of two Stuart's liquid swab transport systems tested by the CLSI M40 method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:583-6.
11. The United States Pharmacopeia, <1227> Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles.. USP-35, 2012: 883-5. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD

## Evaluation the Efficacy of CMP™ Anaerobic TranSwab for Use in the Preservation of Anaerobic Bacteria

Yen-Hsin Chiu<sup>1</sup>, Shian-shiou Shie<sup>1</sup>, Cheng-chan Lo<sup>1</sup>, Yu-june Huang<sup>1</sup>, Shih-chien Yang<sup>1</sup>, Gen-der Ho<sup>1</sup>, Yueh-ting Tsai<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> SuperLaboratory Ltd, New Taipei City, Taiwan. <sup>2</sup> Institute of Biochemical Science and Technology, College of Life Science, NTU, Taipei, Taiwan.

### Abstract

The efficiency of bacteria preservation of CMP™ Anaerobic TranSwab (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 anaerobic clinical bacteria, *Bacteroides fragilis* and *Propionibacterium*

*acnes*, to evaluate the efficacy of CMP™ Anaerobic TranSwab. After inoculated 10<sup>6</sup> CFU organisms on the CMP™ TranSwab, the CMP™ TranSwab were preserved in room temperature or at 4°C to simulate how the clinical specimen is transported. The survived bacterium were recovered by saline after 0, 24 and 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 to 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™ Anaerobic TranSwab can well preserved the *B. fragilis* and *P. acnes* up to 48 hours whether stored in room temperature or at 4°C. It fulfills the CLSI M40-A guideline. The experiment result could be act as reference data when Clinical Microbiology Laboratory choosing their transport device.

**Key word:** Transport medium, Transtube, *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium acnes*