

## ***Usefulness of Flocked Swabs for Sample Collection of Adenovirus***

Tsuguto FUJIMOTO 1), Miki ENOMOTO 1) 2), Masami KONAGAYA 1) & Kiyosu TANIGUCHI 1)

1) Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,

2) Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Japanese Journal of Antimicrobial Agents and Infectious Diseases (J.J.A. Inf. D.)  
83 : 398~400, 2009

English translation can be found at the end of this article.

## フロックドスワブのアデノウイルス検体採取での有用性

<sup>1)</sup> 国立感染症研究所感染症情報センター, <sup>2)</sup> 兵庫県立健康環境科学研究所

藤本 嗣人<sup>1)</sup> 榎本 美貴<sup>1)2)</sup> 小長谷昌未<sup>1)</sup> 谷口 清州<sup>1)</sup>

(平成 21 年 1 月 14 日受付)

(平成 21 年 4 月 27 日受理)

Key words: adenovirus, sample collection, flocked swab

### はじめに

咽頭拭い液は、呼吸器関連ウイルスの病原体検出検査において最も多用される検体の一つであるが、その検体採取の成否はその後のウイルス分離や遺伝子増幅検査などの結果に影響する。近年、ウイルス検査に適したスワブとしてフロックドスワブ、品番 502CS01 (microRheologics S.r.l., Italy) (以下 FS) がウイルス検査および細菌検査用の滅菌スワブ (医療用具) として国内で市販 (シン・コーポレーション, 神戸市)<sup>1)</sup>された。その評価が国内外で 2006~2008 年に報告されはじめている<sup>2-6)</sup>、検査成績を大きく左右する要因であるにもかかわらず、感染症発生动向調査におけるウイルス検査において検体採取法は必ずしも統一的になされていない。そこで、検体採取用のスワブの最適化を目的に、我々が常用している滅菌スワブ (綿部はポリエステル製; 以下 PS) と FS のアデノウイルス (Ad) 採取効率を比較した。

### 方 法

FS と PS [ニッスイ滅菌綿棒 (ニッスイ, 品番 06526)] の吸収液量の測定は、FS と PS を 10 秒、30 秒および 60 秒間、精製水に浸漬してその前後のスワブの重さ (グラム数) を測定し、その差により求めた。それぞれの浸漬時間ごとに各 3 回測定した。

Ad 採取効率の比較は、Ad1, 2, 4, 5, 6, および 11 型の分離株を用いた。24 ウェルマイクロプレート (Costar 3526; Corning, NY, USA) に A549 細胞を培養して単層となった状態で各ウェルの増殖培地を捨てて無血清のイーグル MEM 培地 100 $\mu$ L を加えた。アデノウイルスの各血清型をいずれも 4 ウェル (1 ウェルの面積は 1.88cm<sup>2</sup>) に 50 $\mu$ L ずつ接種した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター (35 $^{\circ}$ C) 中で 30 分間インキュベ

トしてその間に 4 回プレートを震とうした後、接種ウイルス液を除いた。2%FBS を添加した MEM 培地 1 mL を加えて 2~3 日間培養した。CPE が出現しはじめた段階で、各血清型を接種した 4 ウェルについて上清を 300 $\mu$ L 残して除いた。それぞれの 4 ウェルのうち 2 ウェルずつを FS および PS 試験用とし、1 ウェルを 1 本で 2 本ずつ完全に拭った。無血清 MEM 培地 1 mL 入りのチューブ中でスワブを絞り、遠心した上清 200 $\mu$ L を検体とした。ハイビュアウイルス核酸キット (Roche Diagnostics, Swiss) を用いてキットに添付の溶出液 50 $\mu$ L 中に溶出した溶液を最終試料とした。試料中の DNA について、既報<sup>7)</sup>に準じて Ad の DNA (copy/ $\mu$ L) を測定した。リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, 滋賀) を用いた。リアルタイム PCR の各測定値は、3 回測定した平均値を用いた。

### 結 果

精製水の吸収量は、FS で浸漬時間にかかわらず 0.15~0.18g であった。これに対して PS では 10, 30 および 60 秒でそれぞれ 0.11, 0.18 および 0.19g であった (Table 1)。

Table 1 Comparison of absorbed weight with polyester swabs and flocked swabs

absorbed time	PS		FS	
	absorbed liquid (g)	mean (g)	absorbed liquid (g)	mean (g)
10 sec.	0.11	0.11	0.15	0.17
	0.12		0.18	
	0.10		0.17	
30 sec.	0.16	0.18	0.17	0.17
	0.19		0.17	
	0.20		0.18	
60 sec.	0.19	0.19	0.17	0.16
	0.20		0.15	
	0.19		0.17	

別刷請求先: (〒162-8640) 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所感染症情報センター

藤本 嗣人

Table 2 Comparison of copy numbers of adenovirus genomes collected by flocked swabs and polyester swabs

sero type	swab	sample I.D.	copies/ $\mu$ L	mean (copies/ $\mu$ L)	FS/PS
Ad 1	FS	1	$6.01 \times 10^6$	$5.78 \times 10^6$	9.52
		2	$5.54 \times 10^6$		
	PS	3	$5.48 \times 10^5$	$6.07 \times 10^5$	
		4	$6.66 \times 10^5$		
Ad 2	FS	5	$1.78 \times 10^3$	$1.47 \times 10^3$	3.65
		6	$1.15 \times 10^3$		
	PS	7	$5.38 \times 10^2$	$4.03 \times 10^2$	
		8	$2.68 \times 10^2$		
Ad 4	FS	9	$7.09 \times 10^4$	$5.63 \times 10^4$	23.4
		10	$4.17 \times 10^4$		
	PS	11	$1.51 \times 10^3$	$2.41 \times 10^3$	
		12	$3.30 \times 10^3$		
Ad 5	FS	13	$2.79 \times 10^7$	$2.03 \times 10^7$	3.59
		14	$1.26 \times 10^7$		
	PS	15	$9.01 \times 10^6$	$5.65 \times 10^6$	
		16	$2.28 \times 10^6$		
Ad 6	FS	17	$3.41 \times 10^5$	$4.99 \times 10^5$	4.71
		18	$6.57 \times 10^5$		
	PS	19	$1.04 \times 10^5$	$1.06 \times 10^5$	
		20	$1.08 \times 10^5$		
Ad 11	FS	21	$5.34 \times 10^6$	$9.72 \times 10^6$	11.9
		22	$1.41 \times 10^7$		
	PS	23	$1.14 \times 10^6$	$8.18 \times 10^5$	
		24	$4.95 \times 10^5$		

Ad 接種細胞を拭った各スワブからの Ad DNA 回収量は同一検体で常に FS が PS より多かった (Table 2)。Ad 抽出効率では FS と PS で FS が平均 9.46 倍、最大 23.4 倍 PS より Ad 回収量が大きく、最小でも 3.59 倍回収効率が良かった。

### 考 察

Ad の血清型によって採取効率 (Table 2 の FS/PS) が 3.59~23.4 倍と異なったのは血清型による差なのか他の要因によるのかは不明で、今後の検討課題である。しかし、すべての型で FS の検体採取効率が PS より高かったので、Ad 遺伝子検査における FS の使用は有用性が高いと考えられた。また、FS の浸漬時間の長短による差が見られず、短時間での検体採取が可能と考えられた。

FS が有用との結果は、遺伝子検査以外の蛍光抗体法等の検査での報告<sup>3)5)</sup>と一致した。なお、本研究で 1 スワブに 2well を用いたのは、リアルタイム PCR を生物試料に適用する際には 1 つの試料に対して複数検体を試験することが重要<sup>3)</sup>とされるためである。

microRheologics S.r.l. 社がグループ企業として属する Copan 社 (<http://copanusa.com/products/microrheologics/>) によると FS はスワブの先端が柔らかい

ナイロン繊維のブラシのようになっていてサンプルの採取効率および試料中への放出効率が良いとされ、我々の結果はそれと矛盾しなかった。

本研究は *in vitro* の結果であるが、拭う面積などの条件を統一できた点で信頼性が高いものと思われた。今後、臨床現場での Ad 検査に FS を使用し、検出感度が *in vitro* での結果と同様に、PS を用いた場合より向上するか否かを検討し、検体採取法の標準化のためのデータを得る必要があると考えられた。

これまで、Ad 抽出効率に対するスワブの検討は十分なされてこなかった。Ad 感染症では、咽頭から  $10^2 \sim 10^6$  copies/ $\mu$ L の Ad ゲノムが採取されることが報告されている<sup>7)</sup>。今回の結果から FS は同じ採取法で PS より多くの Ad が採取することができ、Ad 遺伝子検査の偽陰性を防ぐ一助になることが示唆された。ウイルス検査での検体採取法は統一されていないが、今回の *in vitro* による検討結果から FS を臨床現場での Ad 遺伝子検査に導入することが検査感度を上げる上で有用であることが示唆された。

### 文 献

- 1) シン・コーポレーション：フロックドスワブ 502 CS01 添付文書、2007 年 12 月 (新様式第 1 版)。
- 2) Chernesky M, Castriciano S, Jang D, Smieja M: Use of flocked swabs and a universal transport medium to enhance molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1084-6.
- 3) Daley P, Castriciano S, Chernesky M, Smieja M: Comparison of flocked and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2265-7.
- 4) Moore C, Corden S, Sinha J, Jones R: Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. *J Virol Methods* 2008; 153: 84-9.
- 5) Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, Ghneim R, Zoughbi M, Turkuman S, *et al.*: Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2414-7.
- 6) 大内好美, 田中千香子, 横井 一, 秋山美穂, 木村博一, 野田雅博, 他: 市販ウイルス保存輸送液およびスワブ採取キットの評価。臨床とウイルス 2008; 36: 61-4.
- 7) Watanabe M, Kohdera U, Kino M, Haruta T, Nukuzuma S, Suga T, *et al.*: Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr Int* 2005; 47: 286-91.
- 8) Nolan T, Hands RE, Bustin SA: Quantification

## Usefulness of Flocked Swabs for Sample Collection of Adenovirus

Tsuguto FUJIMOTO<sup>1)</sup>, Miki ENOMOTO<sup>1)2)</sup>, Masami KONAGAYA<sup>1)</sup> & Kiyosu TANIGUCHI<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,<sup>2)</sup>Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

[J.J.A. Inf. D. 83 : 398~400, 2009]

STUDY CONDUCTED BY Dr. Tsuguto Fujimoto, chief coordinator of Adenovirus Reference Center Meeting, Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan.

[Title/Short Communication]

Influence of Swab Materials on Adenovirus Diagnosis

[Authors]

Tsuguto FUJIMOTO, Miki ENOMOTO, Masami KONAGAYA, Kiyosu TANIGUCHI

[Affiliation]

- 1) Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases
- 2) Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

[Key words]

adenovirus, sample collection, flocked swab

[Running title]

Usefulness of flocked swab in sampling

[Desired reprints]

30 copies

[Billing address for reprint]

Tsuguto Fujimoto, Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

[Number of pages]

4 pages

[Figure/Table]

2 (tables)

## [Introduction]

Pharyngeal swab sample is one of the most frequently used means of checking for pathogenic viruses associated with respiratory organs. Whether or not this kind of sample can be collected appropriately determines the success/failure in isolation of viruses and the results of gene amplification. Recently, flocked swab (microRheologics S.r.l., Italy) was marketed in Japan as a new sterile cotton swab (a medical device) suitable for virological and bacterial tests. Its assessment results began to be reported in 2006 through 2008 [1-5]. Although the method of sampling is a factor having critical impacts on the results of virological test, there is no uniform method of sampling for virological test conducted to analyze the trend of infections. The present study was undertaken to compare the efficiency of adenovirus (Ad) collection between this new swab (FS) and an existing sterile cotton swab (CS), with a goal of optimizing the swab materials used for sampling.

## [Methods]

The volume of fluid absorbable with FS and CS was measured by comparing the weight (in grams) of each cotton swab after 10, 30 and 60 seconds of immersion in purified water with the baseline weight before immersion. After immersion for each period of time, measurement was done in triplicate. The Ad collection efficiency was evaluated using isolates of AD type 1, 2, 4, 5, 6 and 11. Monolayer culture of A549 cells was conducted in 24-well microplates (COSTAR 3526, Corning). When a monolayer was formed in the plate, the medium was discarded from each well and serum-free Eagle's MEM medium (100  $\mu$ L) was added. Each serotype of Ad was inoculated into 4 wells (well area: 1.88 cm<sup>2</sup>) in a volume of 50  $\mu$ L/well. This was followed by 30-minute incubation in a 5% CO<sub>2</sub> incubator (35°C). During incubation, the plate was shaken 4 times. The fluid was then discarded, and MEM medium supplemented with 2% FBS was added in a volume of 1 mL. Incubation was then performed for 2-3 days. When CPE began to appear, the supernatant was partially discarded from each of the 4 wells inoculated with each serotype of Ad, leaving 300  $\mu$ L of the supernatant in each well. Of these 4 wells, 2 were wiped completely with FS and the other two with CS. The tip of each swab was snapped off and the swab was squeezed within a tube filled with 1 mL of serum-free MEM medium. Then, DNA of Ad was extracted from the spinned down

supernatant (200  $\mu$ L), using a Viral Nucleic Acid Kit (Roche). Ad DNA (copy/ $\mu$ L) in the extracted DNA was quantified by the method described elsewhere [6]. Real-time PCR was carried out using SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa). For each parameter measured with real-time PCR, the average of three measurements was adopted.

#### [Results]

The amount absorbed with FS was 0.15-0.18 g regardless of the duration of immersion. With CS, the amount absorbed was 0.11, 0.18 and 0.19 g when the duration of immersion was 10, 30 and 60 seconds, respectively (Table 1).

The amount of Ad DNA collected by applying each swab to the Ad-inoculated cell culture was always greater with FS than with CS (Table 2) when the comparison was made on the same serotype of Ad. Ad extraction efficiency with FS was 9.46 times higher on average (23.4 times higher at maximum and 3.59 times higher at minimum) than that with CS.

#### [Discussion]

Prior to the present study, the Ad extraction efficiency of swabs had not been evaluated adequately. The results from the present study suggest that FS is useful as a swab to check for Ad. Although the present study was conducted *in vitro*, the reliability of the data from this study seems to be high because the conditions for sampling (wiped area, etc.) were kept constant. The results differed among different serotypes of Ad. This point requires further study. In any event, the sampling efficiency was higher with FS than with CS for each serotype, suggesting that FS is very useful for Ad test. In addition, FS requires less time in extraction and is thus expected to allow quick sampling.

#### [References]

5) Ouchi Y, Tanaka C, Yokoi H, Akiyama M, Kimura H, Noda M et al.: Evaluation of commercial virus preservatives and swab collection kits. *Clinical Virology* 2008; 36: 61-4.

**Table 1 Comparison of absorbed weight with cotton swabs and flopped swabs**

absorbed time	CS		FS	
	absorbed liquid (g)	mean (g)	absorbed liquid (g)	mean (g)
10 sec	0.11	0.11	0.15	0.17
	0.12		0.18	
	0.10		0.17	
30 sec	0.16	0.18	0.17	0.17
	0.19		0.17	
	0.20		0.18	
60 sec	0.19	0.19	0.17	0.16
	0.20		0.15	
	0.19		0.17	

**Table 2 Comparison of copy number of Ad genomes collected by flopped swabs and cotton swabs**

sero type	swab	sample ID.	copies/ $\mu$ L	mean (copies/ $\mu$ L)	FS/CS
Ad 1	FS	1	6.01E+06	5.78E+06	9.52
		2	5.54E+06		
	CS	3	5.48E+05	6.07E+05	
		4	6.66E+05		
Ad 2	FS	5	1.78E+03	1.47E+03	3.65
		6	1.15E+03		
	CS	7	5.38E+02	4.03E+02	
		8	2.68E+02		
Ad 4	FS	9	7.09E+04	5.63E+04	23.4
		10	4.17E+04		
	CS	11	1.51E+03	2.41E+03	
		12	3.30E+03		
Ad 5	FS	13	2.79E+07	2.03E+07	3.59
		14	1.26E+07		
	CS	15	9.01E+06	5.65E+06	
		16	2.28E+06		
Ad 6	FS	17	3.41E+05	4.99E+05	4.71
		18	6.57E+05		
	CS	19	1.04E+05	1.06E+05	
		20	1.08E+05		
Ad 11	FS	21	5.34E+06	9.72E+06	11.9
		22	1.41E+07		
	CS	23	1.14E+06	8.18E+05	
		24	4.95E+05		