Short Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Comparison different methods of long-term maintenance and survival of *Streptococcus pneumoniae* isolates

Ali Ahmadi[1], Malihe Talebi[2], Elnaz Parvizi[3], Gholamreza Irajian[2]

1. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/04/06
Accepted: 2016/10/17
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 10(6): 72-77

Corresponding author at:

Dr. Gholamreza Irajian

Department of Medical Bacteriology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0982188058649

Email:
irajian@gmail.com

Abstract

Background and Aim: One of the major problems for the isolation and detection of *S. pneumoniae* from clinical specimens, high sensitivity, rapid autolysis and thus the inability to hold isolates of *pneumococcus*. So, it is essential to use specific techniques for the preservation of the organism. In this study several different cultures for *S. pneumoniae* isolates were compared and evaluated.

Materials and Methods: In 2014, 2 ATCC standard , 30 clinical, and 30 normal flora *pneumococcal* available isolates were selected from a previous study. Dorset egg medium was prepared for midterm preservation, three storage environments, including Skim milk-Tryptone-Glucose-Glycerin (STGG), nutrient broth enriched and Todd Hewitt Broth (THB) was constructed to long-term preservation, and their performance on maintenance *pneumococcal* isolates was assessed.

Results and Conclusions: 95% of the isolates cultured on Dorset after 70 days and 80% after four months later had the ability to grow. All three long-term storage environment, had a good performance for one year but enriched nutrient broth could keep bacteria with but better-quality up to 2 years. There is no difference between isolates from the patients and isolates from normal flora to survive in the environment. Also aggressive origin of iclinical isolates had no effect on their survival rate. Dorset egg (DE) medium can be considered as a simple, low cost and efficient, medium for midterm preservation and enriched nutrient broth for long term storage of *pneumococcal* isolates in clinical laboratories.

KeyWords: *Streptococcus pneumonia*, Midterm preservation, Dorset medium, Long term preservation

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ahmadi A, Talebi M, Parvizi E, Irajian G. Comparison different methods of long-term maintenance and survival of *Streptococcus pneumoniae* isolates. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 66-71

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

مقایسه روش‌های مختلف نگهداری طولانی‌مدت و بقای ایزوله‌های *استرپتوکوک پنومونیه*

علی احمدی[۱]، ملیحه طالبی[۲]، الناز پرویزی[۳]، غلامرضا ایراجیان[۲]

۱. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۲. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳. گروه میکروب‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۱۸
پذیرش:۱۳۹۵/۰۷/۲۶
انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶
موضوع:
باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(6): 72-77

نویسنده مسئول:
دکتر غلامرضا ایراجیان

گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۸۸۰۵۸۶۴۹

پست الکترونیک:
irajian@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: یکی از مشکلات مهم در جداسازی و تشخیص *استرپتوکوکوس پنومونیه* از نمونه‌های بالینی، حساسیت زیاد، اتولیز سریع و درنتیجه ناتوانی در نگهداری ایزوله‌های پنوموکوک می‌باشد . ازاین‌رو برای حفظ ایزوله‌ها به روش‌های اختصاصی نگهداری میان‌مدت و طولانی‌مدت باکتری موردنیاز است. در این مطالعه کارایی چندین محیط کشت مختلف برای نگهداری ایزوله‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* باهم مقایسه و بررسی شد.

مواد و روش کار: در سال ۱۳۹۴، دوسویه استاندارد پنوموکوک ATCC 49619 و ATCC 6305، ۳۰ ایزوله بالینی، و ۳۰ ایزوله فلور نرمال پنوموکوک موجود از مطالعه قبلی انتخاب شدند. سپس برای نگهداری میان‌مدت، محیط کشت دورسه آگار و برای نگهداری طولانی‌مدت، سه محیط نگه‌دارنده شامل Skim milk-Tryptone-Glucose-Glycerin (STGG)، نوترینت براث غنی‌شده و Todd Hewitt Broth (THB) ساخته‌شده و کارایی آن‌ها در نگهداری ایزوله‌های پنوموکوک ارزیابی شد.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: ۹۵ درصد از ایزوله‌های کشت داده‌شده روی محیط دورسه پس از ۷۰ روز و ۸۰ درصد پس از ٤ ماه بعد توانایی رشد داشتند. هر سه محیط نگه‌دارنده طولانی‌مدت، تا یک سال کارایی خوبی داشتند، اما نوترینت براث غنی‌شده توانست تا ۲ سال باکیفیت بهتری باکتری را حفظ کند. تفاوتی بین ایزوله‌های جداشده از بیمار و ایزوله‌های فلور نرمال در توانایی بقا در محیط وجود نداشت. همچنین مهاجم بودن منشأ بالینی ایزوله‌ها تأثیری روی میزان بقای آن‌ها نداشت. می‌توان از محیط کشت دورسه اگار به‌عنوان یک روش ارزان و ساده و بسیار کاربردی برای نگهداری میان‌مدت و از محیط نوترینت براث غنی‌شده برای نگهداری بلندمدت ایزوله‌های پنوموکوک در آزمایشگاه تشخیص طبی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس پنومونیه*، نگهداری میان‌مدت، محیط دورسه، نگهداری بلندمدت

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک) یکی از مهم‌ترین پاتوژن های انسان و عامل طیف وسیعی از عفونت‌های مهاجم و غیر مهاجم به‌ویژه در کودکان زیر ۵ سال می‌باشد (۱). اگرچه مطالعات مشابه خارجی و نیز گزارش‌های سالانه WHO آمار بالایی از عفونت‌های ناشی از پنوموکوک (به‌ویژه در پنومونی های اطفال) را نشان می‌دهد (۲)، اما آمار جداسازی و گزارش آن از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کشور بسیار پایین است. در کنار مصرف بالا و پیش از موقع آنتی‌بیوتیک، به نظر می‌رسد یکی از علل این امر، مشکلات موجود در جداسازی و تشخیص صحیح این باکتری در آزمایشگاه باشد. این امر باعث شده است در بسیاری از موارد تشخیص آزمایشگاهی به‌صورت مثبت یا منفی کاذب انجام شود؛ به‌طوری‌که در مطالعه قبلی ما، میزان خطای موجود در جداسازی این باکتری در آزمایشگاه‌های تهران حدود ۵۰ درصد گزارش شد (۳). همچنین اتولیز سریع کلنی و درنتیجه ناتوانی در نگهداری ایزوله‌های پنوموکوک در محیط کشت (به دلیل تولید آنزیم Lyt A) نیز باعث می‌شود

ایزوله‌های جداشده بیش از یک هفته در یخچال قابل نگهداری و بررسی بیشتر توسط محققین نباشد (۴، ۵). ازاین‌رو برای حفظ ایزوله‌ها با کمترین کشت مجدد، نیاز به روش‌های اختصاصی نگهداری میان‌مدت و طولانی‌مدت باکتری با کمترین هزینه و نیروی انسانی است. هدف از این مطالعه مقایسه کارایی چندین محیط کشت مختلف برای نگهداری ایزوله‌های بالینی و فلور نرمال *پنوموکوک* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری

دو سویه استاندارد پنوموکوک ATCC 49619 و ATCC 6305 ، ۳۰ ایزوله جداشده از نمونه‌های بالینی، و ۳۰ ایزوله فلور نرمال پنوموکوک که در مطالعات قبلی ما از بیماران و افراد سالم جداسازی و با روش‌های استاندارد تعیین هویت شده بود انتخاب و در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران بررسی شد (۶،۷).

نگهداری میان‌مدت

برای این منظور محیط کشت دورسه آگار ساخته شد. بدین ترتیب که تخم‌مرغ پس از شستشو، برای ۴ ساعت در اتانول ۷۰٪ قرارگرفته و سپس داخل یک مزور حاوی پرل استریل شکسته شده و به میزان یک‌سوم حجم، سرم فیزیولوژی استریل به آن اضافه شد. پس از یکنواخت کردن، در شرایط استریل به مقدار ۱۵ میلی‌لیتر در هر شیشه دردار تقسیم‌شده و یک ساعت در ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. به‌منظور کشت ایزوله‌ها، ابتدا ایزوله‌ها روی محیط کشت بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت‌شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جار شمعی، تعداد کلنی تقریبی معادل با استاندارد کدورت ۲ مک فارلند از هر ایزوله در محیط دورسه آگار تلقیح شده و ۲۴ ساعت در جار حاوی شمع در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از رشد ایزوله‌ها، محیط‌ها در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شده و هرماه ازنظر رشد بررسی گردیدند (۸).

نگهداری طولانی‌مدت

برای این منظور دو محیط نگه‌دارنده شامل Skim milk-Tryptone-Glucose-Glycerin (STGG)، و Todd Hewitt Broth (THB) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ساخته شد. همچنین محیط نوترینت براث غنی‌شده با سرم اسب (۱۰درصد) و مزواینوزیتول (۰/۵درصد) و گلوکز (۰/۵درصد) نیز ساخته شد (۹).

سپس ایزوله‌های موردنظر روی محیط بلاد آگار (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده‌شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تعداد بالایی از کلنی‌های باکتری (تقریباً دو پلیت کشت بلاد آگار) از هر ایزوله آماده و بلافاصله در منفی ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس به فواصل یک هفته برای محیط‌های کشت دورسه، و یک‌ماهه برای محیط‌های دیگر طولانی‌مدت روی محیط بلاد آگار و شکلات آگار کشت مجدد و بررسی ازنظر میزان رشد انجام شد (۱۰).

یافته‌ها و بحث

پس از ساخت و بررسی کارایی محیط کشت دورسه آگار، مشخص شد ایزوله‌های کشت داده‌شده روی این محیط ۷۰ روز پس از کشت مجدد، رشد کردند. تعدادی از ایزوله‌ها اعم از فلور و بالینی حتی تا ۴ ماه بعد هم توانایی حیات و رشد خود را حفظ کردند. جدول ۱ نتایج رشد مجدد ایزوله‌ها در محیط دورسه در دمای اتاق و تصویر ۱ محیط‌های کشت دورسه آگار را نشان می دهد.

تصویر ۱: محیط کشت دورسه آگار

همچنین در مرحله ساخت محیط‌های نگه‌دارنده طولانی مدت، هر سه محیط ساخته‌شده تا یک سال کارایی خوبی داشتند، اما نوترینت براث غنی‌شده توانست تا ۲ سال باکیفیت بهتری باکتری را حفظ کند. به این معنی که احتمال از دست رفتن ایزوله‌ها به دلایلی اعم از بروز آلودگی در محیط فریز و نیز عدم توانایی در جداسازی باکتری از محیط کشت مجدد در این محیط نسبت به سایر محیط‌ها کمتر بود. جدول ۲ ماندگاری ایزوله‌ها در محیط‌های مختلف فریز را نشان می‌دهد. جهت

خلاصه کردن نتایج، فواصل زمانی ۲ ماهه ذکرشده و ازآنجاکه کوتاه‌ترین زمان ماندگاری ایزوله‌ها ۱۲ ماه می‌باشد بنابراین نتایج از ماه هشتم به بعد در جدول مربوطه نشان داده‌شده است.

جدول ۱: نتایج رشد روی محیط دورسه آگار

زمان انکوباسیون در RT	ماه ۱	ماه ۲	ماه ۳	ماه ۴	ماه ۵	ماه ۶
تعداد (٪) ایزوله‌های زنده فلور نرمال	(۵۰)۳۰	(۵۰)۳۰	(۴۷)۲۸	(۳۸)۲۳	(۲۵)۱۵	(۱۸)۱۱
تعداد (٪) ایزوله‌های زنده بالینی	(۵۰)۳۰	(۵۰)۳۰	(۴۳)۲۶	(۴۲)۲۵	(۲۵)۱۵	(۲۲)۱۳
تعداد (٪) کل ایزوله‌های زنده	(۱۰۰)۶۰	(۱۰۰)۶۰	(۹۰)۵۴	(۸۰)۴۸	(۵۰)۳۰	(۴۰)۲۴
سویه استاندارد ATCC 6305	+	+	+	+	_	_
سویه استاندارد ATCC 49619	+	+	+	+	_	_

جدول ۲: نتایج رشد روی محیط‌های نگه‌دارنده در ۸۰- درجه سلسیوس

زمان نگهداری (ماه)		۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶	۱۸	۲۰	۲۲	۲۴
Nutrient broth	استاندارد ۴۹۶۱۹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	مجموع تعداد ایزوله زنده	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
Skim milk	استاندارد ۴۹۶۱۹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	مجموع تعداد ایزوله زنده	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۵۹	۵۹	۵۸	۵۸	۵۷
THB	استاندارد ۴۹۶۱۹	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	مجموع تعداد ایزوله زنده	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۵۸	۵۸	۵۶	۵۳	۵۳

میزان جداسازی کم و لیز سریع در محیط کشت، از معضلات همیشگی کار با *پنوموکوک* در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی است (۳). همچنین تهیه بانک میکروبی در آزمایشگاه برای بررسی خصوصیات مولکولی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مورد *پنوموکوک* به علت مشکل نگهداری در بسیاری موارد قابل انجام نیست (۱۱) در این مطالعه محیط کشت دورسه کارایی بسیار مطلوبی نشان داد. از مزایای محیط کشت دورسه آگار، نیاز به ساب کالچر(کشت مجدد) دو ماه یک‌بار، آلودگی بسیار پایین، بسیار ارزان بودن و سهولت ساخت بسیار ساده آن است. این محیط به‌سادگی قابل ساخت است و مواد غذایی بسیار کمی دارد و ازاین‌رو ریسک آلودگی بسیار کمی دارد و بهترین محل برای نگهداری آن در دمای اتاق در تاریکی است(۸،۳). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۸ روی این محیط انجام شد نشان داد که ایزوله‌های *پنوموکوک* به مدت ۴۴ روز در این محیط زنده می‌مانند، درحالی‌که در محیطی مانند کلمبیا فقط ۳۰ روز توانایی زنده ماندن داشتند. همچنین نسبت آلودگی این محیط به محیط نگه‌دارنده پایه کلمبیا آگار، ۲ به ۲۳ درصد بوده است (۸). طی یک مطالعه که در سال ۲۰۰۶ در روسیه بر روی نمونه‌های نازوفارنکس انجام شد، از این محیط برای انتقال نمونه‌ها استفاده شد که کارایی مطلوبی داشت و از بین ۱۴۰ ایزوله به‌دست‌آمده، تنها ۱۰ ایزوله از دست رفت (۱۲). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۳ انجام شد علیرغم اینکه ۶٪ از ایزوله‌های *پنوموکوک* در محیط فریز ۷۰- درجه از بین رفته بودند اما پس از انتقال بقیه سویه‌ها در محیط دورسه جهت کشت مجدد و انتقال نمونه‌ها، هیچ ایزوله‌ای از بین نرفته بود (۱۳). تفاوتی بین ایزوله‌های جداشده از بیمار و ایزوله‌های فلور نرمال در توانایی بقا در محیط وجود نداشت. همچنین در این مطالعه کلنی‌های موکوئید زودتر از بین می‌رفتند که این مسئله نشان می‌دهد نوع سروتایپ احتمالاً در میزان بقا مؤثر است (۱۴). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که مهاجم بودن یا نبودن منشأ بالینی ایزوله‌های *پنوموکوک* تأثیر چندانی روی میزان بقای آن ندارد (اطلاعات نشان داده نشده). در مورد محیط‌های فریز شده، اگرچه هر سه محیط ساخته‌شده تا یک سال کارایی خوبی داشتند، اما پس از دو سال، محیط نوترینت براث غنی‌شده کارایی بهتری داشته و دلیل احتمالی کارایی بهتر وجود سرم اسب در این محیط بود (۵). بنابراین استفاده از محیط نوترینت براث غنی‌شده برای نگهداری بلندمدت *پنوموکوک* پیشنهاد می‌شود (۱۵). طی یک مطالعه نشان داده شد که محیط STGG کارایی خوبی برای

نگهداری *پنوموکوک* و دیگرگونه‌های باکتری در دمای فریز دارد. *پنوموکوک* در این محیط در دمای ۲۰- درجه سلسیوس و۷۰- درجه سلسیوس حداقل به مدت ۹ هفته ماندگاری دارد که این تساوی در میزان کارایی به دلیل کوتاه بودن طول مدت تحقیق می‌باشد که احتمالاً با طولانی‌تر شدن آن میزان ماندگاری در فریز۲۰- درجه کاهش می‌یابد و همچنین در این مطالعه میزان ماندگاری ایزوله‌ها در ۴ درجه سلسیوس به ۵ روز کاهش یافت (۱۵). مطالعه دیگری نیز نشان داد پاتوژن های تنفسی ازجمله پنوموکوک به مدت ۱۲ سال در محیط STGGB در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ماندگار بودند (۱۶). اگرچه در مطالعات خارجی محیط دورسه آگار توانایی خود را برای نگهداری *پنوموکوک* برای ۴۰ روز نشان داده بود، اما در این مطالعه این محیط به‌صورت دستی ساخته‌شده و حدود ۷۰ روز توانست اغلب ایزوله‌های موردنظر را زنده نگه دارد (۱۳،۱۲،۸). البته در این مورد نوع سروتیپ اهمیت دارد و درواقع اگرچه با توجه به سروتیپ های مختلف نمی‌توان برای مدت ۷۰ روزبه محیط دورسه آگار اعتماد ۱۰۰درصد کرد، اما اولاً نگهداری برای همین مدت‌زمان هم برای این باکتری بسیار اهمیت دارد، ثانیاً در مطالعه بعدی با تعیین سروتیپ این ایزوله‌ها می‌توان با دقت بیشتری مشخص کرد که دقیقاً کدام سروتیپ ها توان بقای بیشتری دارند. درنهایت پیشنهاد می‌شود هر دو سال یک‌بار باید ساب کالچر (کشت مجدد) از روی تیوب‌ها و تقریباً هر ۷۰ روز یک‌بار از روی دورسه انجام شود. درنهایت این روش می‌تواند به‌عنوان یک روش ارزان و ساده و بسیار کاربردی برای نگهداری میان‌مدت و طولانی‌مدت ایزوله‌های *پنوموکوک* در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بکار رود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از تمامی همکاران بخش میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران و همچنین کسانی که در مرحله جمع‌آوری نمونه همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Mitchell AM, Mitchell TJ. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. CMI 2010;16(5):411-8.
2. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. Bulletin of the World Health Organization. 2008;86(5):408-16B.
3. Ahmadi A, Talebi M, Sayahfar S, Irajian G. Accuracy of detection of Streptococcus pneumoniae in clinical laboratories by using phenotypic and molecular methods. Koomesh. 2015;16(3):384-8. [in Persian]
4. WHO manual. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae: WHO manual. Centers for Disease Control and Prevention. 2nded. Switzerland: WHO Press; 2011.
5. Restrepo A, Salazar B, Agudelo M, Rodriguez C, Zuluaga F, Vesga O. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumonia*. BMC Microbiology. 2005;5(34):1-8.
6. Sadeghi J, Ahamadi A, Douraghi M, Pourshafie MR, Talebi M. Molecular Analysis of pbp2b in Streptococcus pneumonia Isolated From Clinical and Normal Flora Samples. Curr Microbiol 2015;70(2):206-11.
7. Ahmadi A, Esghaei M, Irajian G, Talebi M. Differentiation of Penicillin Susceptible and Nonsusceptible Streptococcus pneumoniae. JMB 2015;4(1, 2):15-20.
8. Wasas AD, Huebner RE, De Blanche M, Klugman KP. Long-term survival of Streptococcus pneumoniae at room temperature on Dorset egg medium. JCM 1998;36(4):1139-40.
9. Rubin LG, Rizvi A, Baer A. Effect of Swab Composition and Use of Swabs versus Swab-Containing Skim Milk-Tryptone-Glucose-Glycerol (STGG) on Culture- or PCR-Based Detection of Streptococcus pneumoniae in Simulated and Clinical Respiratory Specimens in STGG Transport Medium . JCM 2008;46(8):2635-40.
10. Winters RD, Winn WC. A simple, effective method for bacterial culture storage: A brief technical report. JBV 2010;40(2):99-101.

11. Charalambous BM, Batt SL, Peek AC, Mwerinde H, Sam N, Gillespie SH. Quantitative validation of media for transportation and storage of Streptococcus pneumoniae. JCM 2003;41(12):5551-6.

12. Stratchounski LS, Kozlov RS, Appelbaum PC, Kretchikova OI, Kosowska-Shick K. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study. CMI 2006;12(9):853-66.

13. Victor LY, Chiou CC, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, Morris AJ, Baddour LM, Luna CM, Snydman DR, Ip M, Ko WC. An international prospective study of pneumococcal bacteremia: correlation with in vitro resistance, antibiotics administered, and clinical outcome. CID 2003;37(2):230-7.

14. Kwambana BA, Mohammed NI, Jeffries D, Barer M, Adegbola RA, Antonio M. Differential effects of frozen storage on the molecular detection of bacterial taxa that inhabit the nasopharynx. BMC Clin Pathol 2011;11(1):2.

15. O'Brien KL, Bronsdon MA, Dagan R, Yagupsky P, Janco J, Elliott J, Whitney CG, Yang YH, Robinson LG, Schwartz B, Carlone GM. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of Streptococcus pneumoniae from nasopharyngeal secretions collected during field studies. JCM 2001;39(3):1021-4.

16. Hare KM, Smith-Vaughan HC, Leach AJ. Viability of respiratory pathogens cultured from nasopharyngeal swabs stored for up to 12years at−70° C in skim milk tryptone glucose glycerol broth. J Microbiol Methods 2011;86(3):364-7.