

CMP efSwab[®]-Amies broth 具有保存臨床嗜氧性及厭氧性病原菌的效能

黃伊萱¹，張祐榕¹，蔡文城^{1-3*}

¹台美檢驗科技股份有限公司，新北市；²國立陽明交通大學微生物及免疫學研究所，
以及³食品安全及健康風險評估研究所，台北市，台灣

摘要

自動化檢體接種設備如 Inoqula (BD-Kiestra, USA)與 Wasp (Walk-Away Specimen Processor, Copan, Italy)已經在大型微生物檢驗室中廣泛使用，由於此兩種機台需要使用液態檢體進行接種，因此通常使用植絨拭子(nylon-flocked swab)配合 Amies 輸送培養基進行檢體採集。為了因應自動接種的要求，台灣啟新生物科技股份有限公司研發一種套組，稱為 CMP efSwab[®]-Amies broth，用於檢體的採集與輸送。本研究根據 CLSI 之微生物輸送系統規範 M40-A2 (2014 年)，評估 CMP efSwab[®]-Amies broth 套組對嗜氧菌包含 *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 43069)與 *Haemophilus influenzae* (ATCC 10211)以及厭氧菌包含 *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337)與 *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)的保存效能。為了模擬檢體輸送過程，將每種菌株懸浮液調整至相當於 McFarland 0.5 的濃度，菌數約為 1.5×10^8 CFU/mL，然後將各懸浮液分別取 100 μ L 菌液置於植絨拭子(efSwab[®])，再將接種的拭子插入含有 Amies broth 的試管中，分別在 4°C 和室溫 (25°C)下儲存 6、24 和 48 小時。依據 CLSI 標準，在 4°C 或室溫下儲存後，菌量計數對數值的減少(log reduction)不應大於 3，另外，4°C 還要求上升值不可大於 1。結果顯示在 4°C 或室溫儲存下，*H. influenzae*、*P. anaerobius* 與 *B. fragilis* 均可在 48 小時後可被回收，而 *N. gonorrhoeae* 在 24 小時後可被回收，細菌計數的對數值變化均不超過 3。由於 CMP efSwab[®]-Amies broth 的採檢套組且具有良好保存細菌的能力，符合 CLSI M40-A2 規範，因此，可完全配合自動化檢體接種儀器的接種。

關鍵字：自動化檢體接種設備、CMP efSwab[®]-Amies broth 套組、*Neisseria gonorrhoeae*、*Haemophilus influenzae*、*Peptostreptococcus anaerobius*、*Bacteroides fragilis*

前言

微生物檢驗室自動化為當前發展的趨勢，台灣已經有多家大型微生物檢驗室已經購買如 Inoqula (BD-Kiestra, USA)或 Wasp (Walk-Away Specimen Processor, Copan, Italy)之自動化檢體接種/劃片機台^[1,2]。此兩種機台要求使用液態檢體接種以及應用植絨拭子(nylon-flocked swab)

採集微生物檢體以增加檢驗室對病原菌的偵測能力。傳統上，檢驗室採用手工方法接種檢體常使用棉花纖維拭子(cotton swab)或人造絲材質拭子(rayon swab)採集細菌檢驗檢體，然後插入 Amies 半固態培養基輸送與保存^[3]，因此，傳統的半固態採檢裝置將無法應用於自動化微生物檢驗室之自動化接種/劃片機台。

當前，植絨拭子常用於採集細胞與病毒檢驗用檢體以及用於採集工業廠房（包括：藥廠、食品廠、化妝品廠、醫療器材廠）或醫院的環境微生物檢測檢體^[4,5]，植絨拭子其

*通訊地址：台美檢驗科技股份有限公司
24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城
電話：886-(02) 2298-1887
E-mail address: wctsai@superlab.com.tw

製作係採用先進的「噴絨技術」，將超細尼龍纖維透過靜電電荷垂直地將大量的尼龍微纖維附著在塑膠材質的手柄尖端^[6]。由於尼龍纖維束之間的毛細管作用促進液體樣品可被強液壓吸收，而可將檢體保持在表面，因此，更可立即將吸附的檢體釋放到輸送培養基（如 Amies broth）或任何液體介質（如生理食鹽水）中，而傳統的棉花拭子或人造絲拭子所收集的大部分檢體仍然被捕獲在尖頭的纖維基質中，不容易釋放或僅少量釋放。研究指出，植絨拭子可釋放高達 95% 的檢體量，而一般之棉花纖維或人造絲尖頭拭子僅可釋放約 25%^[7]。在這種不同釋放檢體能力之下，如果檢體量小，尤其凸顯採用植絨拭子採檢的重要性與必要性。

美國臨床與實驗室標準機構(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)出版之 CLSI M40-A2^[8]文件，對臨床檢體輸送培養基明確規範其必須在不同輸送時間點具有維持菌量存活的效能。其規範檢體輸送培養基對於 *Haemophilus influenzae*、*Peptostreptococcus anaerobius* 與 *Bacteroides fragilis* 三種菌株的保存能力在 4°C 和室溫(25°C) 需達 48 小時，且在 4°C 環境下之下，菌量對數下降值(log reduction)不可大於 3，且上升值不可大於 1；在室溫(25°C)環境之下，菌量對數下降值不可大於 3；而對 *Neisseria gonorrhoeae* 的保存能力則需在 4°C 和室溫(25°C)保存 24 小時，且在 4°C 環境下之下，菌量對數下降值不可大於 3，且上升值不可大於 1；在室溫(25°C)環境之下，菌量對數下降值不可大於 3。

由於臨床檢體的採集方法需要優化、自動化接種機台的廣泛運用、以及工業廠房環境監控與醫院院內感染環境調查的需要，啟新生物科技股份有限公司（新北市）研發一種臨床微生物檢體的採集與輸送二合一裝置，稱為 CMP efSwab®-Amies broth 套組（圖

1），其含有高吸附與釋放能力的尼龍植絨拭子(efSwab®)以及改良的液態 Amies broth。

為了瞭解 CMP efSwab®-Amies broth 採檢/輸送套組保存臨床微生物的效能，本研究依據 CLSI M40-A2 規範進行模擬採檢與輸送，並利用規範所建議的兩種嗜氧菌與兩種厭氧菌菌株進行 4°C 和室溫(25°C)兩種保存溫度，在不同保存時間分別測試其等的生長效能，以供作臨床微生物檢驗室應用的參考。

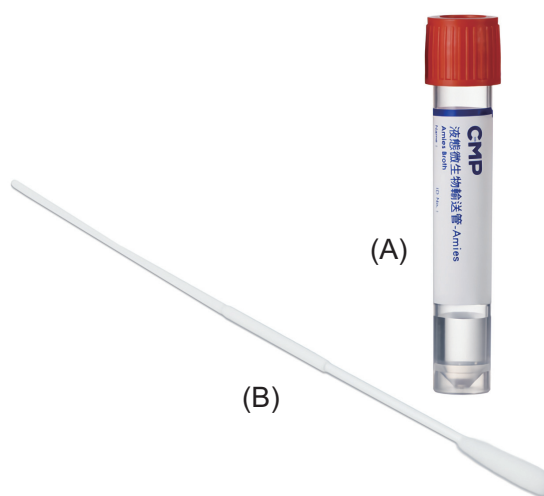


圖 1. 完整的 CMP efSwab®-Amies broth 套組，包括主件液態的 Amies broth 管(A)，以及附有的組件 efSwab® (B)。

材料與方法

菌株

本研究使用的淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*, ATCC 43069)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*, ATCC 10211)、厭氧消化鏈球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*, ATCC 27337)與脆弱擬桿菌(*Bacteroides fragilis*, ATCC 25285)分別購自美國菌種保存中心 ATCC (American Type Cell Collection) 授權之 MicroBioLogics Co. Ltd., Minnesota, USA，作為評估 CMP efSwab®-Amies broth 套組的菌種／菌株。

試驗菌株的活化

以無菌接種環挑取庫存於-70°C之菌株保存管，將嗜氧菌 *N. gonorrhoeae* 和 *H. influenzae* 移種至 chocolate agar，置於 35°C±2°C 的 5% CO₂ 培養箱中培養；厭氧菌 *P. anaerobius* 與 *B. fragilis* 則移種至 AnBAP (anaerobe blood agar)，然後置入厭氧盒中以及放入 MGC 厭氧產氣包(Mitsubishi Co., Ltd, Japan)，置於 35°C±2°C 厭氧環境中培養。上述菌株經過移種三次後長出的菌落，即可用於評估試驗中。

試驗菌株懸浮液配製

測試菌株稀釋液為 0.85% 無菌生理食鹽水。將已經活化之新鮮試驗菌株以無菌接種環挑取數個相同的單一菌落，移種至 4~5 mL trypticase soy broth (TSB) 之試管，調整懸浮液的混濁度至相當於 McFarland no. 0.5 硫酸鋇標準液，菌數約為 1.5×10^8 CFU/mL。

試驗方法

將上述調整之不同菌株的懸浮液分別取 100 µL 接種至 CMP efSwab®-Amies broth 套組組件植絨拭子(efSwab®) 中，並將其插入套組中的主件含有 Amies broth 之輸送管中，整個操作過程需在 20 分鐘內完成。含 Amies broth 之輸送管的保存溫度分別為 4°C 和室溫 (25°C)，試驗菌株保存時間長短因菌株而異，其中，*N. gonorrhoeae* 製備 6 組，保存溫度分為 4°C 與室溫 (25°C)，且保存時間為 0、6 與 24 小時，其餘菌株則製備 8 組，保存溫度亦分為 4°C 與室溫 (25°C)，且保存時間為 0、6、24 與 48 小時。

當試驗菌株接種後存放至預先設定的時間點，將 Amies broth 劇烈震盪約 15 秒以釋出菌體，取 1 mL 至 9 mL 0.85% 生理食鹽水稀釋液，使用同樣的稀釋液進行一序列 5 次的十倍稀釋，再將不同稀釋倍數之菌液分別取 100 µL 接種至適當的平板培養基上，然後

使用無菌玻棒塗抹均勻，操作二重複。由於有些菌株對於溫度較為敏感，需將平板培養基預先置於 35°C±2°C 培養箱中回溫，再進行試驗。無菌玻棒塗抹後，將嗜氧菌接種於 chocolate agar 並放置於 35°C±2°C 含有 5% CO₂ 培養箱中，培養 16~24 小時，而厭氧菌則接種於 AnBAP，然後放入厭氧盒中，並且使用 MGC 厭氧產氣包，然後置於 35°C±2°C 一般培養箱中，培養 24~48 小時，紀錄每個培養皿的菌落數，以 30~300 CFU/平板為計數依據，平均後，依不同稀釋度換算原始菌落數，最後將每個時間點所獲得的菌落數與 0 小時的菌落數相比較，分別計算個別菌株存放在不同溫度與時間之存活率，然後進行比較。

培養基與耗材

上述試驗所使用之 CMP efSwab®-Amies broth 套組、各種接種培養基(chocolate agar 與 AnBAP)、稀釋液、McFarland no. 0.5 硫酸鋇標準液以及各種試驗耗材均購自啟新生物科技股份有限公司 (新北市，台灣)。

結 果

分別接種不同測試菌於 CMP efSwab®-Amies broth 中的 Amies broth 後，將培養基存放於不同溫度與時間點，然後進行生長效能測試，結果指出在 4°C 存放 24 或 48 小時後，4 種菌株增長或下降的比率皆小於 1 個 log 值，均符合 CLSI M40-A2 規範的要求。*P. anaerobius* 在 4°C 存放 6、24 與 48 小時的回收率分別為 1.86 倍、0.57 倍與 1.33 倍 (表 1)，其中，存放 6 與 48 小時為正成長，而 24 小時為負成長 (圖 2-A)；*B. fragilis* 在 4°C 存放 6、24 與 48 小時的回收率分別為 0.63 倍、0.5 倍與 0.41 倍 (表 1)，均為負成長 (圖 2-B)；*N. gonorrhoeae* 在 4°C 存放 6 與 24 小時的回收率分別為 0.33 倍與 0.06 倍 (表

1)，均為負成長（圖 2-C）；*H. influenzae* 在 4°C 存放 6、24 與 48 小時回收率分別為 1.29 倍、1.12 倍與 0.33 倍（表 1），其中，存放 6 與 24 小時為正成長，而 48 小時為負成長（圖 2-D）。測試的每株菌在室溫（25°C）存放 24 或 48 小時後，菌數下降比率皆小於 3 個 log 值，均符合 CLSI M40-A2 規範被要求。

另外，*P. anaerobius* 在室溫（25°C）存放 6、24 與 48 小時的回收率分別為 8.43 倍、0.38 倍與 0.81 倍（表 1），其中，存放 6 小時為正成長，24 與 48 小時為負成長（圖 2-A）；*B. fragilis* 在室溫（25°C）存放 6、24 與 48 小時回收率分別為 0.24 倍、0.06 倍與 0.04 倍（表 1），均為負成長（圖 2-B）；*N. gonorrhoeae* 在室溫（25°C）存放 6 與 24 小時的回收率分別為 0.07 倍與 0.00052 倍（表 1），均為負成長（圖 2-C）；*H. influenzae* 在室溫（25°C）存放 6、24 與 48 小時的回收率分別為 1.57 倍、0.17 倍與 0.04 倍（表 1），其中，存放 6 小時為正成長，24 與 48 小時為負成長（圖 2-D）。

討 論

過去十年來，由於植絨拭子在採集檢體時具有吸附能力強以及容易釋放至液態培養基或介質中的特性，因此，植絨拭子的各種不同用途已被採樣者廣泛地認可，並且應用到臨床微生物或環境微生物檢體的採集，以取代傳統的棉花拭子或人造絲拭子。尤其自動化檢體接種／劃片機台如 Kiestra inoqlA (BD) 或 WASP (Copan) 等的接種，要求使用液態培養基，因此，有必要開發含有植絨拭子組件的液態輸送培養基以符合這些自動化機台的使用。

啟新生物科技有限公司為了配合自動化檢體接種／劃片機台的接種，特別改良原始的半固態 Amies medium，並搭配植絨拭子，而設計出 CMP efSwab®-Amies broth 套組。

其中，植絨拭子(efSwab®)組件由具有硬度的垂直尼龍纖維所組成，適用於口咽、皮膚傷口或環境採檢。植絨拭子的手柄設計一個折斷點，可將拭子輕鬆折斷至套組的主件 Amies broth 中。Amies broth 係改良原始 Amies medium 配方，增加特殊營養成分，以及將半固態改為液態，以符合自動化檢體接種機台的需要。

吾等根據 CLSI M40-A2 的規範要求^[8]測試兩株嗜氧菌與兩株厭氧菌以評估 CMP efSwab®-Amies broth 套組保存檢體中嗜氧性與厭氧性病原菌的效能，試驗結果顯示，CMP efSwab®-Amies broth 套組中的 Amies broth 保存 *H. influenzae*、*P. anaerobius* 與 *B. fragilis* 於 4°C 或室溫（25°C）存放 6~48 小時的效果，皆符合 CLSI M40-A2 的規範之菌量濃度對數下降值小於 3 或上升值小於 1 的標準。另外，*N. gonorrhoeae* 在 4°C 或室溫（25°C）保存效果在 6 到 24 小時，亦皆符合 CLSI M40-A2 的規範之菌量濃度對數下降值小於 3 或上升小於 1 的標準。

傳統上，用於檢體輸送的 Amies medium 組成包括添加活性碳(charcoal)或不添加活性碳的配方，分別稱為 Amies medium w/ charcoal 與 Amies medium。前者為含有活性碳的非營養性培養基，添加活性碳的目的為中和微生物所產生之毒性，並維持微生物的活性^[9]。另有文獻指出，含活性碳或不含活性碳之 Copan Amies gel agar 配方對 *N. gonorrhoeae* 之保存效果並無差異^[10]，CMP efSwab®-Amies broth 套組中的 Amies broth 使用的是不含活性碳之改良配方。雖然一些文獻指出 *N. gonorrhoeae* 不耐低溫，但本研究的結果卻非如此，此可能係因套組中之改良 Amies broth 的成分中添加了具有使營養挑剔性菌獲得耐低溫的特性。有些文獻^[11-13]指出 *N. gonorrhoeae* 在 4°C 存放的效果甚至比室溫（25°C）者佳，美國 CLSI 標準規範並未提供冷藏輸送的標準，

表 1. 將 4 種測試菌株接種 CMP efSwab®-Amies broth 中的 Amies broth，存放在 4°C 或室溫 (25°C) 環境之不同時間點的菌數與消長情形

存放溫度	菌株名稱	存放時間 (h)			
		0*	6	24	48
4°C	<i>P. anaerobius</i>	$1.05 \times 10^{7*}$ (1.0)**	1.95×10^7 (1.86)	6×10^6 (0.57)	1.4×10^7 (1.33)
	<i>B. fragilis</i>	2.65×10^8 (1.0)	1.68×10^8 (0.63)	1.33×10^8 (0.50)	1.09×10^8 (0.41)
	<i>N. gonorrhoeae</i>	2.6×10^7 (1.0)	8.5×10^6 (0.33)	1.5×10^6 (0.06)	—
	<i>H. influenzae</i>	1.21×10^8 (1.0)	1.56×10^8 (1.29)	1.36×10^8 (1.12)	4.05×10^7 (0.33)
室溫 (25°C)	<i>P. anaerobius</i>	1.05×10^7 (1.0)	8.85×10^7 (8.43)	4×10^6 (0.38)	8.5×10^6 (0.81)
	<i>B. fragilis</i>	2.65×10^8 (1.0)	6.3×10^7 (0.24)	1.45×10^7 (0.06)	1.0×10^7 (0.04)
	<i>N. gonorrhoeae</i>	2.6×10^7 (1.0)	1.9×10^6 (0.07)	1.35×10^4 (0.00052)	—
	<i>H. influenzae</i>	1.21×10^8 (1.0)	1.9×10^8 (1.57)	2.05×10^7 (0.17)	5×10^6 (0.04)

* 菌數單位：CFU/mL；—，未測；4°C 與室溫儲存之測試菌在 0 小時的計數使用相同之菌液。

**括弧內為與 0 小時菌數（以 1.0 為單位）比較儲存不同時間後所回收到的菌數消長倍數，回收率高於 1.0 為正成長；低於 1.0 為負成長。

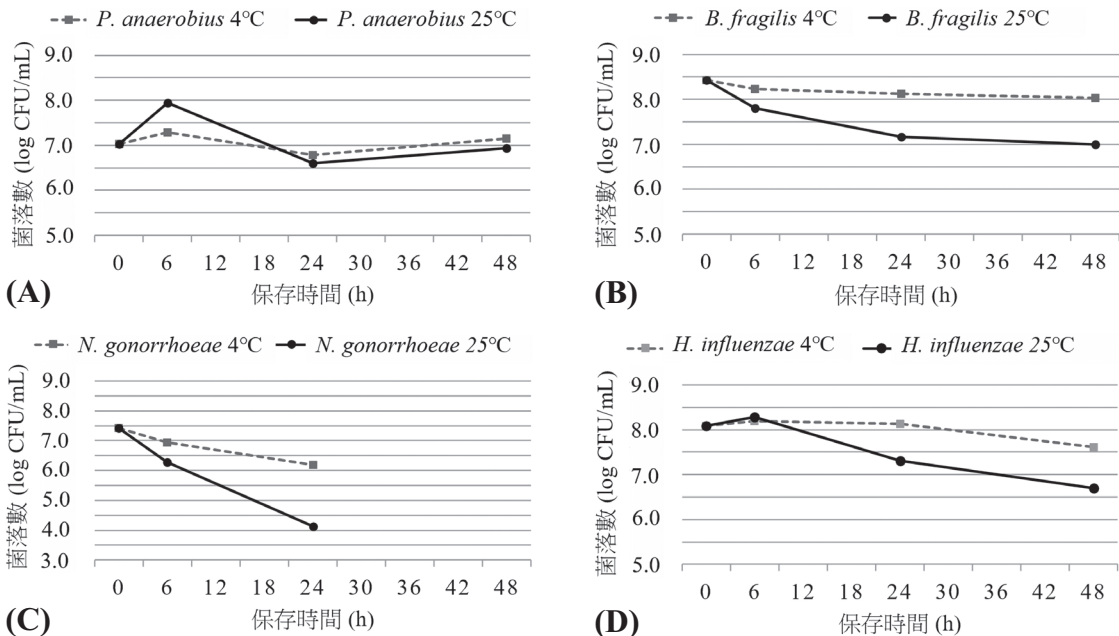


圖 2. 將嗜氧菌或厭氧菌接種至 CMP efSwab®-Amies broth 套組的組件 Amies broth 中，存放在 4°C 和室溫 (25°C) 環境之於不同時間點的菌數消長情形。(A) *P. anaerobius*；(B) *B. fragilis*；(C) *N. gonorrhoeae*；(D) *H. influenzae*。

但建議製造商需在冷藏(4°C)溫度和室溫(25°C)下進行測試。

由於本研究發現 CMP efSwab®-Amies broth 套組中的液態 Amies broth 與傳統半固態輸送培養基對於厭氧菌的保存能力具有更佳的效果，吾等建議：臨床或環境檢體採檢後可經由 4°C 輸送，若有菌存在的狀況下，將可減緩／停止所含有菌種進行代謝，並有效維持檢體中菌種的活性、菌量與比例；若無冷鏈設備而需在室溫(25°C)輸送檢體時，則建議在採檢後 6 小時內送達實驗室，且完成接種／劃片工作。

目前市面上常見採檢拭子的材質包括棉花、人造絲與尼龍植絨拭子。最近十年來，植絨拭子也應用於臨床檢體以及醫院、工業廠房環境採檢，由於尼龍植絨拭子的檢體吸附與釋放能力優於棉花與人造絲拭子^[4,7]。因此，當前微生物實驗室採集／輸送臨床細菌檢驗檢體（如 aerobic 或 anaerobic swab w/ transport medium）所附的棉花或人造絲拭子組件，將可能被植絨拭子所取代。

總之，CMP efSwab®-Amies broth 套組使用的植絨拭子(efSwab®)組件具有甚佳的檢體吸附與釋放能力，而套組主件之改良的 Amies broth 於不同的存放時間均能良好保存微生物的活性，因此，efSwab®與 Amies broth 的組合可完全配合使用自動化檢體接種／劃片機台的採檢、輸送與接種要求，其將可使檢驗室的微生物偵測能力更加精準與快速，並且可減少檢驗人員的操作時間與檢驗成本，大大地提升檢驗室的功能。

參考文獻

1. Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F *et al.* Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22:217-35.
2. 李珮寧，邱晟榮，林函頤，蔡文城。從 PreLUD 自動化檢體接種機與手工接種痰檢體的初步效能比較探討市面上的三種自動化接種系統。檢驗及品保雜誌。2017; 6:63-70。
3. 邱彥昕，謝賢修，羅晟展等人。評估 CMP™ 嗜氧檢體輸送管對臨床細菌之保存效果。檢驗及品保雜誌。2012; 1:1-6。
4. Dube FS, Kaba M, Whittaker E *et al.* Detection of *Streptococcus pneumoniae* from different types of nasopharyngeal swabs in children. *Plos ONE* 2013; 8:e68097.
5. Dalmaso G, Ferrari M, Paris A. Validation of the new Irradiated Nylon™ flocked QUANTISWAB™ for the quantitative recovery of micro-organisms in critical clean room environments. PDA Europe Conference and Exhibition "Best Practices in Aseptic Manufacturing". 2007. Milan, Italy.
6. Copan. FLOQSwab®: Frequently Asked Questions. 2022. <https://www.copanusa.com/floqswab-frequently-asked-questions/#Q1>
7. 葉芝榕，歐柏廷，蔡文城。尼龍植絨、人造絲與棉花拭子採集微生物檢體的效能。檢驗及品保雜誌。2022; 10:162-6。
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality control of microbiological transport systems, 2nd ed. Approved standard M40-A2. 2015. CLSI. Wayne, PA, USA.
9. Thermo Fisher Scientific Manual. Amies transport medium w/ and w/o charcoal 2008.
10. Olsen CC, Schwebke JR, Benjamin Jr WH *et al.* Comparison of direct inoculation and Copan transport systems for isolation of *Neisseria gonorrhoeae* from endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3583-5.
11. Lindy G, Frans R, Duduzile N *et al.* Evaluation of the Copan eSwab®, a liquid-based microbiology transport system, for the preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at different temperatures. *South Afr J Infect Dis* 2017; 1:1-4.
12. Serra-Pladevall J, Gulin BC, Vila ON *et al.* Preservation of *Neisseria gonorrhoeae*: should swabs be refrigerated or not? *Neisseria gonorrhoeae* preservation. *J Microbiol Methods* 2018; 145:37-9.
13. Wade JJ, Graver MA. Refrigeration does not compromise recovery of *Neisseria gonorrhoeae* from charcoal transport swabs. *Sex Transm Infect* 2005; 81:93-4.

CMP efSwab[®]-Amies Broth is Effective in Preserving both Aerobic and Anaerobic Pathogenic Bacteria

Yi-Hsuan Huang¹, Yu-Jung Chang, Wen-cherng Tsai¹⁻³

¹Super laboratory Ltd., New Taipei City ; ²Institute of Microbiology and Immunology, and ³Institute of food Safety and Health Risk Assessment, National Yang Ming Chiao Tung University, Taipei, Taiwan

Abstract

Automated specimen inoculation devices, such as Inoqula (BD-Kiestra, USA) and WASP (Walk-Away Specimen Processor, Copan, Italy), have become widely used in large microbiology laboratories. As these instruments require liquid medium for inoculation, it is common to use flocced swabs coupled with Amies transport medium for specimen collection. To meet the requirement of automated inoculation, the Taiwan Creative Life Science Co., Ltd. has developed a kit, referred to as CMP efSwab[®]-Amies broth, for specimen collection. In this study, we evaluated its efficacy according to the CLSI Microbiological Transport System Specification M40-A2 (2014) on both aerobic bacteria including *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 43069) and *Haemophilus influenzae* (ATCC 10211) and anaerobic bacteria including *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) and *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285). To simulate the process of specimen transport, each bacterial suspension was adjusted to McFarland 0.5 with a bacterial count of approximately 1.5×10^8 CFU/mL, and 100 μ L each of such suspensions was placed on a flocced swab (efSwab[®]). The inoculated swab was then

inserted into the tube containing Amies broth and stored at 4°C or room temperature (25°C) for 6, 24, and 48 hours. According to the CLSI standard, the decrease in the log value of bacterial count of a specimen should not be greater than 3 and the increase value should not be greater than 1 after being stored at 4°C or room temperature. Results showed that *H. influenzae*, *P. anaerobius*, and *B. fragilis* could be recovered after 48 hours and *N. gonorrhoeae* could be recovered after 24 hours of storage at 4°C or room temperature with a change in the log value of bacterial count less than 3. As these results met the CLSI M40-A2 standard, we conclude that the CMP efSwab[®]-Amies broth specimen collection kit is compatible with automated specimen inoculation instruments.

Keywords: Automated specimen inoculation devices, efSwab[®]-Amies broth, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides fragilis*