

比較 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解與 CAMP 試驗鑑定 B 群鏈球菌的效能

陳柔¹ 鄭仕雯² 蔡文城^{3,4}

國立中興大學植物病理學系，台中市¹；慈濟大學醫學檢驗生物技術系，花蓮縣²；台美檢驗科技有限公司臨床微生物組，新北市³；國立陽明大學微生物及免疫學研究所，台北市，台灣⁴

摘要

行政院衛生福利部國民健康署公告之B群鏈球菌(Group B *Streptococcus*, GBS, *Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, 乙型鏈球菌)標準作業流程中, Carrot broth 係作為檢體中 GBS 的增菌及區分性鑑別之用, 其判別依據為呈現胡蘿蔔色, 表示 100% 為 GBS。檢驗室鑑定 GBS 最常用的試驗為 CAMP 試驗、hippurate 水解試驗及鏈球菌血清分型試驗, 由於操作這些試驗各有其優缺點, 啟新公司(CMP, 台灣)利用 carrot broth 對 GBS 具有 100% 的特異性而將其配方加以改良, 成功地研發出鑑定用不含抗生素的 GBS-ID carrot broth。由於正確且快速地篩檢 GBS 具有臨床重要性, 為了瞭解鑑定用 GBS-ID carrot broth 的效能, 本研究以此培養基與 GBS 的其它鑑定方法, 包括 CAMP 試驗與 hippurate 水解進行效能包括敏感性(sensitivity)及特異性(specificity)的比較。以臨床分離株及標準菌株作為測試對象, 試驗菌株包括 120 株β溶血型 GBS, 其它β溶血型鏈球菌: 7 株 A 群鏈球菌(GAS)、1 株 G 群鏈球菌(GGS)及其它非鏈球菌菌屬的菌種 32 株, 總共 160 株, 結果顯示 GBS-ID carrot broth、CAMP 試驗與 hippurate 水解試驗的特異性分別為 100%、77.5% 與 92.5%; 敏感性分別為 98.3%、100% 與 100%。綜合上述, GBS-ID carrot broth 鑑定 GBS 的效能顯然地優於 CAMP 及 hippurate 水解試驗, 值得臨床檢驗人員加以應用。

關鍵字: B 群鏈球菌、乙型鏈球菌、CAMP、hippurate 水解、GBS-ID carrot broth、敏感性及特異性

前言

B 群鏈球菌(Group B *Streptococcus*, GBS, *Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, 乙型鏈球菌)為革蘭氏兼性厭氧性雙球菌(diplococci), 常存在於人體腸道、陰道、膀胱。帶有 GBS 的孕婦在分娩時新生兒通過產道常引起垂直傳染, 導致新生兒腦膜炎、敗血症和肺炎, 甚至死亡^[1,2]。美國、瑞典、英國等國

家, GBS 感染佔新生兒所有感染類別中約 22-60%。在 1970 年代, GBS 在美國新生兒感染的致死率高達 50%^[3], 因此, 美國疾病管制局 (Center for Disease Control and Prevention, CDC) 積極制定管理政策, 使新生兒 GBS 感染致死率成功地降至 1990 年代的 4%^[4-8]。該機構的公告建議懷孕 35~37 週孕婦需進行陰道及肛門拭子的 GBS 檢測, 若呈陽性, 則在周產期給予預防性抗生素, 將新生兒感染率降低 75% 以上^[9]。2008 年蘇等調查台灣北、中、南部地區 10 家醫院 35~37 週周產期孕婦陰道的 GBS, 結果發現帶菌率為 17.2%, 其中北部地區為 16.1%、中部地

*聯絡地址: 台美檢驗科技有限公司
24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城
電話: 886-(02)2293-1887
E-mail: wctsai@superlab.com.tw

區 18.3%、南部地區 16.7%^[10]。為了提倡優生保健政策，衛福部國民健康署從提升產前 GBS 檢查普及率著手，於 2014 年 4 月起將 GBS 的檢測納入健保給付^[11]，對生育低的台灣，顯然地，是一項重大的福利措施，值得其它開發中國家參考。

國民健康署公告的 GBS 檢驗流程^[12]建議以無菌棉棒拭子自陰道及/或直腸口採檢後，放入一般嗜氧檢體運送管(aerobic transport system)運送到檢驗室，檢驗人員取出拭子移種於 blood agar plate (BAP)，再將拭子插入選擇性培養基 Lim broth 或 carrot broth 選擇性培養液，在 35°C 培養，18-24 小時後觀察 BAP 是否有疑似 GBS 菌落或觀察 carrot broth 產生胡蘿蔔色，若培養後顯色，則不需移種 BAP。若無，則移種 Lim broth/carrot broth 至另一個 BAP，培養後再觀察。若有疑似菌落，則操作 CAMP 試驗、hippurate 水解試驗或鏈球菌血清分型試驗，然後發出最終報告。

現在市面上有許多 GBS 增菌培養基產品，包括 Lim broth、GBS carrot broth (啟新，台灣)、StrepB carrot broth (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)及 GBS Medium (Northeast Laboratory Services, Winslow, ME)。兩種廠牌 carrot broth 相較於傳統的 Lim broth 增菌培養基，更可提高特異性及敏感性、簡化流程、並縮短鑑定時間^[9,13-15]。

GBS 檢測流程中，增菌前後均需移種 BAP，當長出疑似 GBS 菌落，需進一步加以鑑定，此將延長報告時間。為了及早發出報告，因此，一些廠家研發出區分性培養基包括 GBS carrot agar (CMP, 啟新, 台灣)^[16]、GBS Detect agar (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)^[17]及 CHROMagar StrepB (CHROMagar, 法國)^[18]。期能從生長菌落的顯色或溶血特性及能判斷出其為 GBS，但實際應用上，僅 GBS carrot agar 能夠達到

快速鑑定 GBS 的目標^[16]。

BAP 生長的疑似 GBS 菌落最常用的鑑定試驗為 CAMP 試驗、hippurate 水解試驗^[19-22]及鏈球菌血清分型試驗，由於 carrot broth 選擇性培養基對 GBS 具有 100% 的特異性，啟新公司將其配方加以改良，成功地研發出鑑定用不含抗生素的 GBS-ID carrot broth。為了瞭解鑑定用 GBS-ID carrot broth 的效能，本研究比較 GBS-ID carrot broth、CAMP 試驗及 hippurate 水解試驗對 GBS 鑑定的敏感性及特異性。

材料及方法

試驗菌種來源

供試的 GBS、*S. pyogenes* (GAS)、Group G Streptococci (GGS) 及非鏈球菌種/菌株共 160 株，除了 ATCC 標準菌株外，臨床測試菌種皆來自台美醫事檢驗所(新北市，台灣)。臨床菌株係從大台北地區各醫院產前檢查檢體中分離，而各種標準菌株則購自美國菌種保存中心(ATCC)的授權公司 MicroBioLogicals 公司 (MBL, 加拿大)。這些菌種/菌株保存於 -70°C 冷凍櫃中的 GermBank 菌種保存裝置 (啟新公司，台灣)。

菌種的特性及確認

進行試驗前，由 -70°C 的 GermBank 裝置取出庫存菌，除了嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)移種 chocolate agar 及退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)移種 BCYE α agar 外，所有其它菌種皆移種於 BAP，分別培養於 35°C 的適當環境，18~24 小時挑取單一菌落繼代培養兩次，觀察菌落特徵，若有懷疑，則進行必要的鑑定試驗，而 GBS 的確認試驗則包括在 BAP 上的菌落特徵、溶血狀況及染色抹片顯微鏡底下特徵，並配合 CAMP 試驗、Streptococcal grouping kit (DR0585A, Oxoid, UK) 之 latex serologic test 與 hippurate

水解試驗。若菌落溶血型為 β 溶血或不溶血，革蘭氏陽性球菌，觸酶陰性，且血清分群試驗符合 GBS，則做為測試菌。

GBS-ID carrot broth 試驗

GBS-ID carrot broth 配製 2 mL/試管，而有別於增菌用的 GBS carrot broth 4 mL/試管。操作時，以接種環挑取測試株的單一菌落接種 GBS-ID carrot broth，於 35°C 一般培養箱 18~24 小時，觀察顏色變化，並以 *S. agalactiae* (ATCC 12386) 為陽性對照及以 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 14289) 為陰性對照，判讀時，呈胡蘿蔔色或淡胡蘿蔔色為陽性，不變色為陰性（圖 1），GBS-ID carrot broth 弱陽性的判讀方式為以白紙為背景與陰性管同時觀察呈色。

CAMP 試驗^[19]

使用的培養基為 BAP (blood agar plate)，實驗進操作時，在 BAP 上先接種 β 溶血型的 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (金黃色葡萄球菌) 劃一橫線，再以試驗菌與前一劃線作垂直接種，直角交界處兩菌需相距 5~7 mm^[13]，於培養在 35°C，5% CO₂ 培養箱 18~24 小時，即可觀察是否有加強溶血現象。每次試驗皆以 *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386) 作為陽性對照及以 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 14289) 為陰性對照（圖 2）。

Hippurate 水解試驗^[19-22]

接種大量新鮮試驗菌於含有 0.4 mL sodium hippurate (1%) 的試管中，於 35°C 一般培養箱培養 2 小時後，加 5 滴 ninhydrin reagent 再放回培養箱 10 分鐘，不可超過 30 分鐘，並進行觀察，*Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386) 作為陽性對照；*Streptococcus pyogenes* (ATCC 14289) 最為陰性對照，呈現藍色為陽性，不變色極弱陽性為陰性（圖 3）。

上述培養基及試劑皆購自啟新生物科技有限公司（新北市，台灣）。

結果

本研究使用 120 株 β 溶血型 GBS 臨床菌株及其它非 GBS 菌株包括 7 株 GAS 與 1 株 GGS，以及其它菌株共 32 株，進行 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解及 CAMP 試驗以評估其等鑑定 GBS 的效能。結果指出 GBS-ID carrot broth 特異性為 100%；CAMP 試驗 77.5% (31/40)；Hippurate 水解為 92.5% (37/40)，GBS-ID carrot broth 特異性較其它兩者高；而敏感性方面，GBS-ID carrot broth 敏感性為 98.3% (118/120)（表 1），Hippurate 水解與 CAMP 試驗皆為 100% (120/120)。120 株 GBS 臨床菌株中有 22 株呈現弱陽性，但仍甚易與陰性結果區分（圖 1），其中有 2 株未產胡蘿蔔色。進行 CAMP 試驗時發現

表 1. 以 GBS-ID carrot broth 偵測 120 株 β 溶血型 GBS 臨床菌株之效能^a

GBS-ID carrot broth	傳統鑑定結果 ^b	
	陽性	陰性
陽性	118	0
陰性	2	40
菌株共計	120	40

^a GBS-ID carrot broth 的敏感性(sensitivity)為 98.3% (118/120)，而特異性(specificity)為 100% (40/40)，效能(efficiency)為 98.8% (158/160)，陽性預測值(positive predictive value, PPV)100% (118/118)，陰性預測值(negative predictive value, NPV)95.2% (40/42)。^b 傳統鑑定結果代表 CAMP、hippurate 水解及 latex serologic test 三種試驗中至少有兩種呈現陽性為符合 GBS 的特性。



圖 1. 接種 GBS 至 GBS-ID carrot broth：由左至右分別為陰性、弱陽性及陽性反應。



圖 2. GBS 的 Hippurate 水解試驗：由左至右分別為陰性、陽性、陽性及些微呈色(陰性)反應。

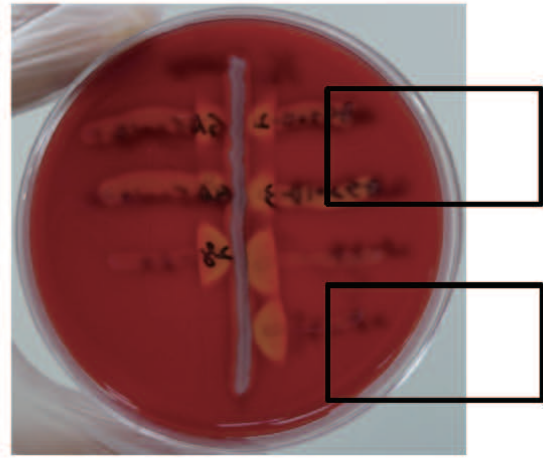


圖 3. CAMP 試驗：右上框為臨床 GAS 測試株，而右下框為 GBS 測試株，兩者皆有加強溶血的現象。

7 株 GAS 中有 1 株參考菌株(*Streptococcus pyogenes*, ATCC 19615)與 4 株臨床菌株呈現陽性。

討 論

不論早發型或晚發型 GBS 感染皆會造成新生兒嚴重的併發症，快速準確的篩檢 GBS 有其臨床上必要性。衛福部國民健康署公告的標準檢驗流程^[12]提到採檢棉棒移種 Lim broth 或 GBS carrot broth 增菌培養基的前後需移種 BAP，若有疑似菌落則進行 CAMP 試驗、Hippurate 水解試驗與鏈球菌血清學分型，然後發出鑑定報告。

以實際應用性比較 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解及 CAMP 試驗，結果指出 hippurate 水解試驗操作上有其不便性，即必須接種大量菌落，而臨床上則常無法因應，必須以 BAP 再進行次培養，需多一天的時間以及增加培養基成本，另外進行一個試驗項目需 3~5 分鐘，培養 2 小時後，再加 ninhydrin reagent 反應 10~15 分鐘，雖一天即可顯示反

應結果，但時間分配必須精準。Hippurate 水解試驗之陽性呈現深藍色，但 160 株試驗菌株中有 5 株試驗菌株(3.1%)呈現淡藍色使判讀不易。CAMP 試驗操作時 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 與試驗菌直角交界處需相距 5~7 mm，若菌距太近也會有加強溶血的現象，吾等發現 7 株 GAS 菌株中有 5 株呈現 CAMP 陽性，需觀察其菌落為寬形溶血特徵才能與 GBS 區分，若臨床經驗不足則會有誤辦之情形(圖 3)，GBS-ID carrot broth 判讀容易，若為弱陽性，以白紙為背景與陰性管作對照即可區別(圖 1)，且弱陽性或呈現陰性之 β 溶血型 GBS 測試株呈色效果不隨培養環境及時間而改變，包括 35°C 一般培養箱、厭氧箱及 5% CO₂ 培養箱不同之培養環境。總之，本研究發現 GBS 測試菌株接種至 GBS-ID carrot broth，18~24 小時培養後即可達到呈色效果。

參考文獻

1. Schuchat A. Group B streptococcus. Lancet 1999; 353:

- 51-6.
- Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002; 347:233-9.
 - Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973; 82:707-18.
 - Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, et al. Prevention of perinatal group streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2002; 16:1-22.
 - CDC. Adoption of prenatal group B streptococcal disease prevention recommendations by prenatal-care providers—Connecticut and Minnesota. 1998. *MMWR Recomm Rep* 2000; 49:228-32.
 - CDC. Early-onset group B streptococcal disease, United States, 1998-1999. *MMWR Recomm Rep* 2000; 49:793-6.
 - CDC. Laboratory practices for prenatal group B streptococcal screening and reporting—Connecticut, Georgia, and Minnesota, 1997-1998. *MMWR Recomm Rep* 1999; 48:426-8.
 - Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR Recomm Rep* 1992; 41:25-32.
 - Jennifer V, Lesley M, Stephanie S. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1-23.
 - 蘇勳璧、謝保群、呂衍孟、吳昆哲、許權霖。台灣地區周產期 B 群鏈球菌感染評估。 *疫情報導* 2008; 24:336-48。
 - http://www.bhp.doh.gov.tw/BHPNet/Portal/File/ThemeDocFile/201003020902046432/預防保健服務問答集_1010813.pdf
 - 行政院衛生署國民健康局。孕婦乙型鏈球菌(Group B *Streptococcus*)檢驗標準作業手冊 2002:1-6。
 - Schreckenberger P, Hsiung A, Marnell C, Terrile L, Soto Y, Miller M, Ilendo E, Nachum R, DiPersio J, Fairbanks L, Abbey G, Luper D, Phillips W, Peterson G, Hardy J. Evaluation of Strep B Carrot Broth™ and LIM broth methods for recovery of group B streptococci (GBS). Results of a multi-center trial. 2005. Abstracts of the Annual Meeting of the ASM (C-109).
 - Facklam R, Elliott J, Hsiung A. Y, Clasen R, Peterson G, Strickler S, Hardy J. Evaluation of accuracy of Strep B carrot broth™ in the detection of different serotypes of group B streptococci (GBS). A poster presentation at ASM 106th General Meeting, Orlando, FL. 2006.
 - Church D L, Baxter H, Lloyd T, Miller B, Elsayed S. Evaluation of Strep B carrot broth versus Lim broth for detection of group B *Streptococcus* colonization status of near-term pregnant women. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2780-2.
 - 鄭仕雯、陳柔、沈慧珊、歐宇祥、蔡文城。GBS Carrot Agar 鑑別 B 群鏈球菌的效能。 *檢驗及品保雜誌* 2014; 3:35-95。
 - GBS Detect - for the detection of non-hemolytic strains of Group B *Streptococcus* - for use with Carrot Broth. https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/GBSDetect.html
 - CHROMagar. CHROMagar™ Strep B instructions for use. www.chromagar.com.
 - 蔡文城、蔡岳廷。實用臨床微生物診斷學，第十版。2011:571-658。九州圖書文物有限公司，台北，台灣。
 - Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In Versalovic JV, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. 2011:331-49. ASM press, Washington DC, U.S.A.
 - Winn W, Jr., Allen S, Janda W et al. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. 2006:683-8. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A.
 - MacFaddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd ed. 2000: 35-56; 138-204. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A.

Comparison of the Efficacy of GBS-ID Carrot Broth, Hippurate Hydrolysis and CAMP Test for the Identification of Group B *Streptococcus*

Jou Chen¹, Shih-wen², Wen-cherng Tsai^{3,4}

¹Department of Plant Pathology, National Chung-Hing University, Taichung; ²Department of Medical Technology, Tzu Chi University, Hualien; ³Super laboratory, Ltd., New Taipei City; ⁴Institute of Microbiology and Immunology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

The standard laboratory method to test for Group B *Streptococcus* (GBS) promulgated by the Bureau of Health Promotion, Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan, Taiwan, recommends that carrot broth be used to enrich and differentiate GBS in samples from preterm pregnant women. The identification of GBS is based on the presence of carrot-pigment, meaning that any appearance of this pigment is 100% due to the presence of GBS. The frequently used diagnostic methods to test for GBS in laboratories are the CAMP test, hippurate hydrolysis and the serological grouping of streptococci. Because of some disadvantages involved in conducting those methods, and because carrot broth can identify GBS with 100% specificity, we revised a carrot broth formula and thereby successfully developed an antibiotic-free GBS-ID carrot broth. It is clinically important to screen GBS rapidly and accurately. To understand the efficacy of the GBS-ID carrot broth for GBS identification,

we compared the efficacy (specificity and sensitivity) of the GBS-ID carrot broth, the CAMP test and hippurate hydrolysis. We used clinical isolates and reference strains including 120 strains of β -hemolytic GBS, other β -hemolytic species of *Streptococcus* (including 7 strains of group A and 1 strain of group G), as well as 32 other non-*Streptococcus* species. In total, 160 test strains were used. The results indicated that specificity rates for the GBS-ID carrot broth, the CAMP test and hippurate hydrolysis were 100%, 77.5% and 92.5%, respectively, whereas the sensitivity rates were 98.3%, 100% and 100%, respectively. Based on the above findings, we conclude that the efficacy of GBS-ID carrot broth is superior to that of the CAMP test and hippurate hydrolysis, and therefore worthy of application in clinical laboratories.

Key words: GBS-ID carrot broth, CAMP, Hippurate hydrolysis.