

CMP™ β/γ GBS Detection Agar：一種偵測 B 群鏈球菌 γ 溶血型菌株的創新培養基

蔡文城^{1,2*} 葉卜碩³ 蔡偉勳¹ 洪晟峯⁴ 王彥博⁴ 蔡岳廷¹ 呂旭峯^{5,6}

台美檢驗科技有限公司，新北市¹；國立陽明大學微生物及免疫學研究所，台北市²；生命科學系，中央大學，桃園市³；
啟新生物科技股份有限公司，新北市⁴；振興醫療財團法人振興醫院臨床病理科，台北市⁵；輔仁大學，新北市⁶，台灣

摘要

懷孕婦女產前檢查 B 群鏈球菌 (Group B streptococci, GBS, *Streptococcus agalactiae*，台灣醫事檢驗學會翻譯為乙型鏈球菌) 為預防新生兒及產婦受到此菌感染的重要措施。檢體採檢後送至檢驗室，首先接種 carrot broth 或 Lim broth 進行增菌培養，18~24 小時後再移種 blood agar plate (BAP) 以便偵測 GBS 的 β 溶血型菌株，但約有 3~5% 的無溶血型 (γ 溶血型) GBS 菌株常被忽略，為了解決此項缺失而有 CMP™ β/γ GBS detection agar 的創新設計 (啟新公司，台灣)。本研究利用 12 株常見的革蘭氏陽性球菌/桿菌評估此培養基的效能，結果指出 CMP™ β/γ GBS detection agar 能誘導 GBS 的 γ 溶血型成為 β 溶血型，而不影響其它測試菌的溶血型式及菌落外觀。總之，若以 CMP™ β/γ GBS detection agar 替代 BAP 應用於產前 GBS 的檢查，將可轉變 γ 溶血型成為 β 溶血型而提升 GBS 偵測的靈敏度及分離率，值得檢驗室加以採用做為 GBS 檢驗的移種培養基。

關鍵字：B 群鏈球菌、CMP™ β/γ GBS detection agar, GBS 的 γ 溶血型

前言

由於 B 群鏈球菌 (GBS, 乙型鏈球菌, *Streptococcus agalactiae*) 可引起新生兒敗血症、肺炎及腦膜炎以及產婦的敗血症及肺炎，美國疾病控制中心及衛福部國民健康署公告方法建議懷孕婦女在 35~37 週時的產前檢查必須包括陰道及肛門直腸棉拭檢體的 GBS 檢查^[1-3]。台灣醫事檢驗學會公佈的方法^[4]中建議實驗室收到產前檢查的嗜氧檢體運送管後，需先插入 Lim broth 或 carrot broth

增菌培養基，放置於 35~37°C 培養箱內增菌 18~24 小時後，若使用 Lim broth，則移種 BAP；若使用 carrot broth 而出現胡蘿蔔色則可直接發出陽性報告，若無顯色，亦同樣地移種至 BAP，培養隔日再觀察是否有疑似 GBS 菌落生長，然後進行鑑定，此操作流程的 GBS 分離率約 20%^[5,6]。雖然 GBS 在 BAP 的生長菌落大多呈 β 溶血型 (beta-hemolytic, 菌落周圍呈完全溶血)；然而約有 3~5% 的菌株呈 γ 溶血型 (不溶血)^[7,8]，一般認為 GBS 的溶血能力與在 carrot broth 增菌培養基的顯色有關^[9]，這些不溶血菌株將不會產生胡蘿蔔顏色，因此若 carrot broth 無顯色必須移種至 BAP 或其它適當的培養基，以便觀察 GBS 的典型 β 溶血型或 γ 溶血型菌落。由於在 BAP 的 γ 溶血型菌落不易與其它具有小、且不溶

*通訊地址：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)2298-1887
E-mail address: wctsai@superlab.com.tw

血菌落的菌種區分，因此，除非檢驗人員特別警覺，否則將忽略而導致錯誤的報告。有鑑於此，啟新生物科技有限公司特別針對 Υ 溶血型 GBS 研發一種創新的偵測培養基：CMP™ β/Υ GBS detection agar，為了瞭解 CMP™ β/Υ GBS detection agar 的效能，本研究分別以 GBS 的 β 與 Υ 溶血型菌株及一些其它臨床上常見革蘭氏陽性菌種進行測試。

材料及方法

試驗菌種來源

本研究使用的試驗菌共計 12 菌株(表 1)，除了 1 株 G 群鏈球菌(GGS)為來自台美醫事檢驗所(新北市，台灣)的臨床菌株外，其它 11 株測試菌包括 *Staphylococcus aureus* (金黃色葡萄球菌)、*S. epidermidis* (表皮葡萄球菌)、*S. saprophyticus* (腐生葡萄球菌)、*S. pyogenes* (GAS，化膿性鏈球菌)、*S. pneumoniae* (肺炎鏈球菌)、*Enterococcus faecalis* (糞腸球菌)及一些其它菌種均為 ATCC 標準菌株，皆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/菌株種入 GermBank 菌種保存管(啟新公司，台灣)，然後放置於-70°C 冷凍櫃中保存。

試驗菌種之移種培養

進行試驗前，從 Germbank 裝置中分別取出 ATCC 及臨床分離株移種 BAP，將 BAP 培養於 35°C 的 5%~10% CO₂ 培養箱，18~24 小時後，再以四區劃線法移種至 BAP 以便獲得單一菌落，共移種三次。

菌種的確認

進行移種後生長菌落的觀察以了解是否符合該測試菌應有的特徵，其中二個 GBS 菌株以 GBS-ID carrot broth、CAMP 試驗與 hippurate hydrolysis 試驗確認其反應為陽性

[10-13]，並配合鏈球菌分群套組(Streptococcal Grouping Kit, 目錄號 DR0585A, Oxoid 公司, 英國)的快速乳膠凝集試驗(latex agglutination test)結果，確認其為 GBS。至於 Group A streptococci (GAS)與 Group G streptococci (GGS)亦以快速乳膠凝集試驗進行群別確認，而其它測試菌則依傳統方法進行鑑定^[10,12,13]。

培養基與試劑

本研究使用的培養基主要包括 BAP、CMP™ GBS carrot agar 與 CMP™ β/Υ GBS detection agar 及各種鑑定用培養基/試劑皆購自啟新生物科技有限公司，新北市。

測試培養基的接種步驟

接種 BAP、CMP™ GBS carrot agar 及 CMP™ β/Υ GBS detection agar 前將培養基回復至室溫，操作時將測試菌分別以一般的四分劃線法接種 (CMP™ GBS carrot agar 在第一區另外插種 5 次)，置於 35°C 的一般或 CO₂ 培養箱，18~24 小時後觀察各菌在三種培養基生長的菌落特徵與溶血型態。

結果

GBS (ATCC 13813) 生長在 BAP 的菌落為不溶血性(Υ 溶血型，圖 1 左上)，但在 CMP™ β/Υ GBS detection agar 則轉變為 β 溶血型(beta-hemolytic) (圖 1 左下)，在 CMP™ GBS carrot agar 不產生胡蘿蔔色；而 GBS(ATCC 12386)在 BAP 及 CMP™ β/Υ GBS detection agar 均呈同樣地 β 溶血型 (圖 1 右上及右下)，且在 CMP™ GBS carrot agar 顯現胡蘿蔔色 (表 1)。

三種葡萄球菌、2 株 GAS 及各 1 株 Group G Streptococci (GGS)、*S. pneumoniae*、*E. faecalis*、*L. monocytogenes* 在 BAP 及 CMP™ β/Υ GBS detection agar 均能生長良好，且溶血型均不變 (表 1)。至於 *Bacillus cereus*

在 BAP 生長良好，但不能在 CMP™ β/γ GBS detection agar 生長。

GAS、GGs 及 *E. faecalis* 在 CMP™ GBS carrot agar 均生長良好，而 *S. aureus* 則生長較差，這些測試菌均不能在此培養基顯色，因此其生長不會干擾 GBS 的即時鑑定。測試菌中，不能在 CMP™ GBS carrot agar 生長的測試菌包括 *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* 及 *B. cereus* (表 1)。

討 論

將 1 個 γ 溶血型菌株 (ATCC 13813) 及 1 個 β 溶血型菌株 (ATCC 14289) 的 GBS 分別劃種在 CMP™ β/γ GBS detection agar，培養

後的生長菌落均呈現 β 溶血型特徵 (圖 1)，顯示 CMP™ β/γ GBS detection agar 對 GBS 的 β 及 γ 溶血型株偵測效果良好。其它能夠在 BAP 與 CMP™ β/γ GBS detection agar 生長的革蘭氏陽性球菌或桿菌所顯現的溶血型均相同，此指出 CMP™ β/γ GBS detection agar 的檢驗室應用將不改變其它菌在 BAP 應有的溶血型式 (表 1)。

一些在 BAP 呈 β 溶血型的菌種亦能在 CMP™ β/γ GBS detection agar 產生同樣的 β 溶血型 (包括 *S. aureus*、GAS、GGs 及 *L. monocytogenes*)，雖然可利用菌落的大小或其它特徵與 GBS 區分，但仍有其不確定性，因此任何疑似 GBS 的生長菌落，仍需要進一步鑑定加以確認。唯一不能在 CMP™ β/γ

表 1. 各種測試菌種/菌株分別在 BAP 與 CMP™ β/γ GBS detection agar 的溶血型以及在 GBS carrot agar 的生長情況與顯色特徵

菌種	溶血型 ^c		生長情況與顯色	
	BAP	CMP™ β/γ GBS detection agar	CMP™ GBS carrot agar	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC 13813) ^a	γ	β	生長良好	無顯色
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC 12386) ^b	β	β	生長良好	呈胡蘿蔔色
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 14289)	β	β	生長較差	無顯色
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	β	β	生長良好	無顯色
Group G Streptococci (GGs) 臨床分離株	β	β	生長良好	無顯色
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	α	α	無生長	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	γ	γ	生長良好	無顯色
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	β	β	生長較差	無顯色
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	γ	γ	無生長	- ^d
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305)	γ	γ	無生長	-
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	β	β	無生長	-
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	β	無生長	無生長	-

^a 在 BAP 生長菌落呈 γ 溶血型。

^b 在 BAP 生長菌落呈 β 溶血型。

^c α 溶血型為不完全溶血，菌落周圍有灰綠色的狹窄暈環，如鏡檢此處之培養基將僅能發現少數紅血球被溶解； β 溶血型為完全溶血，菌落周圍有明顯寬廣之完全透明環，環內的紅血球全部被破壞；而 γ 溶血型為不溶血，菌落周圍沒有任何改變^[11,12]。

^d，不相關。

GBS detection agar 生長的測試菌為 *B. cereus* (表 1)，此係因為 *B. cereus* 對任何抗微生物均呈敏感性，因此，其不能生長在含有抗微生物劑的 CMP™ β/γ GBS detection agar 是可預期的。

過去，美國 Hardy Diagnostics 公司曾發展出 GBS Detect™ 平板，其目的與 CMP™ β/γ GBS detection agar 相同，均以偵測 γ 溶血型 GBS 為目標。美國六家大型醫院利用 CDC 公告的方法同時以 BAP 及 GBS Detect™ 平板的移種共評估 619 個臨床檢體^[14]，結果共分離 107 株 GBS (分離率為 17.2%)，其中由 BAP 及 GBS Detect™ 兩種培養基分離者為 83 株，僅由 GBS Detect™ 分離者 24 株，僅由 BAP 分離者 0 株。此指出 GBS Detect™ 可額外增加 22.4% (24/107) 的分離率，不過 GBS Detect™ 上生長的 β 溶血型菌不屬於 GBS (即偽陽性) 高達 58% (62/107)，因此 Hardy Diagnostics 公司有必要改良 GBS Detect™ 配方，同時，任何 β 溶血型菌落均要加以鑑定。同樣地，許多非 GBS 亦能在 CHROMagar StrepB 上生長，因此呈紫色的菌落均需加以確認是否為 GBS^[15]。總之，CMP™ β/γ GBS detection agar 與 GBS Detect™ 及 CHROMagar StrepB 雖然各有其偵測 γ 溶血型 GBS 的優點

(表 2)，但同樣地均具有需對疑似 GBS 生長菌落加以確認而延長檢驗報告時間，增加人力、物力的缺點 (表 2)。

最近，鄭等^[16]評估 CMP™ GBS carrot agar 證實對分離的 β 溶血型 GBS 的特異性為 100%，而靈敏度為 99.1% (培養在無氧環境) 或 98.3% (插種後培養在 5% CO₂ 環境)，因此，培養基上任何呈胡蘿蔔色的生長菌落均為 GBS，並不需進一步鑑定而能發揮即時鑑定的效能，對檢驗室而言，將可縮短檢驗報告時間，其缺點為不能偵測 3~5% GBS 的 γ 溶血型株^[7,8]。有鑑於 CMP™ β/γ GBS detection agar 具有偵測 β 及 γ 溶血型菌株的效能，將可彌補 CMP™ GBS carrot agar 的缺失 (表 2)。因此，若將已接種產前檢查檢體的 Lim broth、carrot broth、或 CMP™ GBS 檢體運送/增菌培養管^[15] 同時移種 CMP™ GBS carrot agar 及 CMP™ β/γ GBS detection agar (圖 2)，預期將更能提高 GBS 分離率而可達到 100% 的靈敏度 (準確性)，且可簡化操作流程、縮短報告時間與節省人力及物力，因此值得檢驗人員加以採用。在短期的未來，本研究室將根據此預測進行臨床檢體的實際評估。

表 2. 使用不同類別 GBS 分離培養基與檢測效能的關係

培養基 GBS 檢測效能	分離培養基				
	BAP、CNA 或 PZA	CHROMagar StrepB	GBS Detect™	CMP™ β/γ GBS detection agar	CMP™ GBS carrot agar
GBS 偽陽性	NA ^a	30% ^[16]	58% ^[14]	— ^b	0% ^[16]
可偵測 GBS 的 γ 溶血型株	否	是	是 ^[14]	是 ^c	否
GBS 的 β 溶血型 株可被立即鑑定	否	否	否	否	是
β 溶血型分離菌 不需進一步鑑定	否	否	否	否	NA ^a

^a NA，不相關。^b 未測定。^c 本研究。

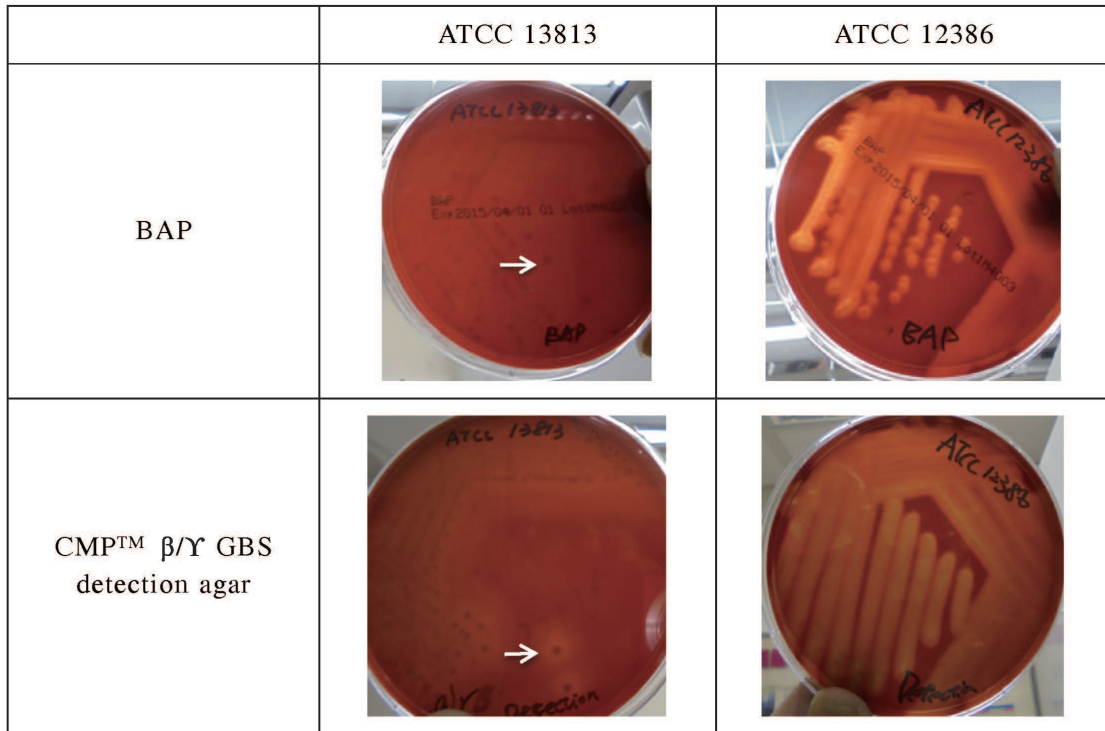


圖 1. *S. agalactiae* ATCC 13813 (左) 及 ATCC 12386 (右) 生長菌落分別在BAP (上排) 及 CMP™ β/Y GBS detection agar (下排) 顯示的溶血型。ATCC 13813 在BAP (左上圖) 箭頭指出γ溶血型菌落，但在CMP™ β/Y GBS detection agar (左下圖) 箭頭則顯示β溶血型菌落。

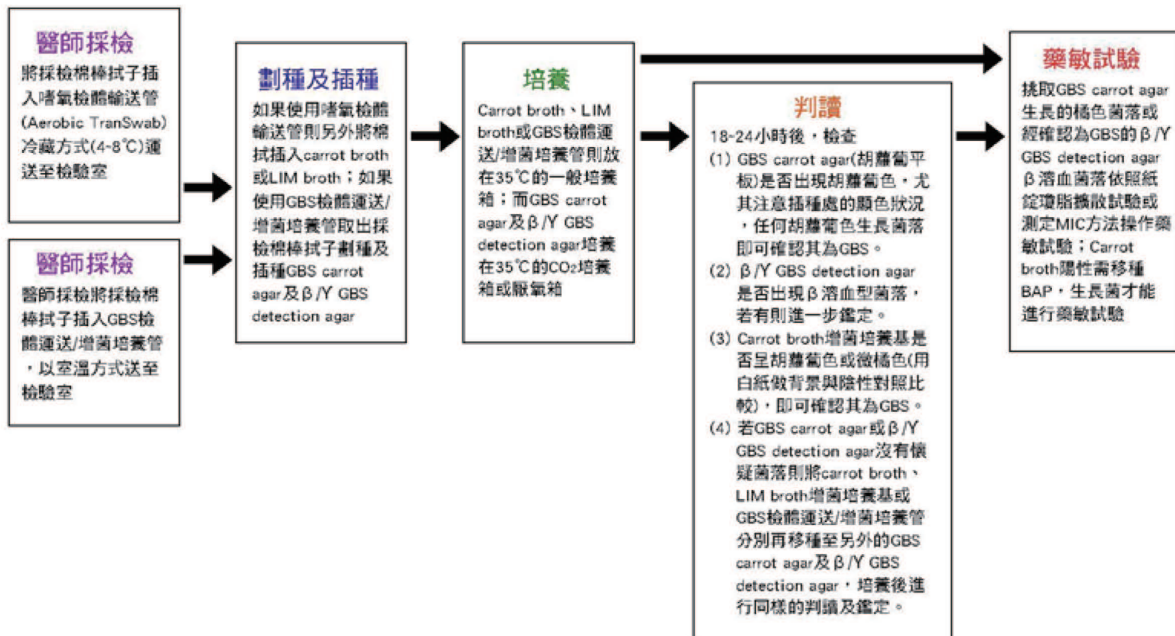


圖 2. 建議以GBS檢體運送/增菌培養管配合CMP™ GBS carrot agar及CMP™ β/Y GBS detection agar的產前GBS檢查操作流程

參考文獻

1. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep 2002; 51:1-22.
2. The Center for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines form CDC. MMWR Recom Rep 2010; 59:1-36.
3. 衛生福利部國民健康署 孕產婦關懷網站 <http://mammy.hpa.gov.tw/kbcontent.asp?cid=502>
4. 台灣醫事檢驗學會。乙型鏈球菌(Group B *Streptococcus*) 檢驗標準作業手冊。2014。台灣醫事檢驗學會，台灣。
5. Yu HW, Lin HC, Yang PH, Hsu CH, Hsieh WS, Tsao LY, Chen CH, Lin HC, Tseng YC. Group B streptococcal infection in Taiwan: maternal colonization and neonatal infection. *Pediatr Neonatol*. 2011; 52:190-5.
6. 蘇勳壁、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。
7. 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.
8. Chen TC, Wei CC, Wang YJ *et al*. Improving GBS screening efficiency by modern tools application. Poster PD-50. 2014 IFBLS & The 31st World Congress of Biomedical Laboratory Science. Program book. 2014:79.
9. Tapsall JW. Pigment production by Lancefield group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J Med Microbiol* 1986; 21:75-81.
10. 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。
11. 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.
12. 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.
13. MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical bacteria*. 3rd ed.2000: 35-56; 188-204. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, U.S.A.
14. Clasen R, Cuna V, Dolan S *et al*. Evaluation of GBS Detect™: a new medium for the detection of non-hemolytic group B strep in subcultures of carrot broth™ and Lim broth. results of a multi-center trial. http://www.hardydiagnostics.com/pdf/sc_posters/gbs_detect_poster_c135.pdf
15. CHROMagar. CHROMagar™ StrepB instructions for use. www.chromagar.com.
16. 鄭仕雯，陳柔，沈慧珊，歐宇祥，蔡文城。評估 GBS Carrot Agar 鑑別 B 群鏈球菌的效能。檢驗及品保雜誌。2014; 3:85-95。

CMP™ β/γ GBS Detection Agar : An Innovative Culture Medium to Detect γ -hemolytic Strains of Group B Streptococci

When-cherng Tsai^{1,2*}, Pu-Shuo Yeh³, Wei-Shiun Tsai¹, Cheng-Fong Hong⁴,
Yen-Po Wang⁴, Yueh-Ting Tsai¹, Hsu-Feng Lu^{5,6}

¹Super Laboratory Co. Ltd., New Taipei City; ²Institute of Microbiology and Immunology, National Yang-Ming University, Taipei;
³Department of Life Sciences, National Central University, Taoyuan city; ⁴Creative Microbiologicals Ltd., New Taipei city; ⁵Department
of Clinical Pathology, Cheng Hsin General Hospital, Taipei; ⁶Fu-Jen Catholic University, New Taipei City, Taiwan

Abstract

Prenatal Group B Streptococci (GBS) examination for pregnant women is an important measure for the prevention of neonatal and maternal infection of this bacterium. After the specimen is collected and sent to the laboratory, it is first inoculated with carrot broth or Lim broth for enrichment. Eighteen to 24 hours later, it is then inoculated with blood agar plate (BAP) to detect β -hemolytic strains of GBS, but about 3~5% of non-hemolytic (γ -hemolytic) GBS strains are often overlooked. In order to overcome this problem, an innovative CMP™ β/γ GBS detection agar has been developed (by Creative Microbiologicals, Taiwan). This study uses 12 common strains of gram-positive cocci/bacilli to assess the effectiveness of this culture medium.

Results showed that CMP™ β/γ GBS detection agar can induce γ -hemolytic GBS to become β -hemolytic GBS without affecting the hemolysis and appearance of other tested bacteria. In summary, if CMP™ β/γ GBS detection agar instead of BAP is used in prenatal GBS examination, γ -hemolytic GBS can be transformed into β -hemolytic GBS and enhance the sensitivity and isolation rate of GBS detection. Therefore, it is worth utilizing as an inoculation culture medium for the detection of GBS in the laboratory.

KeyWord: Group B Streptococci (GBS),
CMP™ β/γ GBS detection agar,
 γ -hemolytic GBS