

## 乙型鏈球菌(Group B Streptococcus)檢驗標準作業手冊(103 年版)

### 1. 目的：

乙型鏈球菌(Group B *Streptococcus*; GBS; 學名 *Streptococcus agalactiae*)被認為是嬰兒出生前後感染及死亡的重要原因。被乙型鏈球菌感染的嬰兒往往會導致嚴重的併發症，包括敗血症、肺炎及腦膜炎等，嚴重則會造成死亡及永久性的神經性後遺症。乙型鏈球菌感染新生兒的途徑，通常是在分娩的時候經由母體感染，所以若能在孕婦懷孕時期早期診斷出是否感染乙型鏈球菌，就可以有效預防新生兒感染的危險。

因此，美國疾病管制局建議懷孕 35-37 週的婦女應做全面性的篩檢，採檢的部位為陰道及直腸末端，可以增加乙型鏈球菌的診斷機率約 50% 以上，若在確定診斷後給予孕婦抗生素的治療，新生兒感染乙型鏈球菌的機率則可以降低 75% 以上。

### 2. 範圍：

懷孕 35-37 週的婦女(包括計畫性剖腹產孕婦)。

### 3. 材料及試劑：

#### 3.1 Amies 或 Stuart's 的運送培養基

#### 3.2 增菌培養基：可選擇使用，步驟中以 LIM broth 為例說明之。

3.2.1 LIM broth (含 10µg/ml 的 colistin 及 15µg/ml 的 nalidixic acid 之 Todd-Hewitt 培養液)

3.2.2 含 5% 綿羊血的 Trans-Vag broth (含 8 µg/ml 的 gentamicin 及 15 µg/ml 的 nalidixic acid 之 Todd-Hewitt 培養液)

3.2.3 StrepB carrot broth(含 Granada medium 可偵測溶血型的 GBS 菌株，無法偵測不溶血型的 GBS 菌株)

#### 3.3 建議培養基

3.3.1 Blood agar plate (BAP)

3.3.2 Columbia colistin-nalidixic acid agar (CNA)

3.3.3 乙型鏈球菌選擇性培養基(ChromID™ agar、GBS Detect™ agar)

#### 3.4 二氧化碳(5%)培養箱

3.5 觸媒(3% catalase): 10 mL, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 90 mL 無菌水，2-8°C 保存

#### 3.6 革蘭氏染色套組(Gram stain kit)

#### 3.7 標準菌株

3.7.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.7.2 *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386

3.7.3 *S. pyogenes* ATCC 19615

#### 3.8 Hippurate 試劑：依廠商規定保存

#### 3.9 自動化鑑定儀器或其他商業試劑套組

### 4. 培養步驟：

#### 4.1 LIM broth

- 4.1.1 將陰道-肛門拭子接種到 LIM broth 中。
- 4.1.2 將接種後之 LIM broth 於 35-37°C，二氧化碳(5%)培養箱中，培養 18-24 小時。
- 4.1.3 無論是否混濁，將 LIM broth 次培養於 BAP (CNA、ChromID™ agar 或 GBS Detect™ agar) 上。
- 4.1.4 將次培養之 BAP (CNA、ChromID™ agar 或 GBS Detect™ agar) 於 35-37°C，二氧化碳(5%)培養箱中培養 18-24 小時。
- 4.1.5 若無懷疑菌落，則延長培養 18-24 小時後再行觀察。

#### 4.2 StrepB carrot broth

- 4.2.1 將陰道-肛門拭子接種到 StrepB carrot broth 中。
- 4.2.2 將接種後之 StrepB carrot broth 於 35-37°C 培養箱中，培養 18-24 小時。
- 4.2.3 若 broth 產生橘色至紅色的變化，則判定為 GBS 陽性。
  - (1) 將 broth 次培養於 BAP(或 CNA)上。
  - (2) 將次培養之培養基，於 35-37°C，二氧化碳(5%)培養箱中培養 18-24 小時。
  - (3) 挑取 GBS 菌落進行藥物感受性試驗。
- 4.2.4 若 broth 無顏色變化
  - (1) 將 broth 次培養於 BAP (CNA、ChromID™ agar 或 GBS Detect™ agar) 上。
  - (2) 將次培養之培養基於 35-37°C，二氧化碳(5%)培養箱中培養 18-24 小時。
  - (3) 選取懷疑的菌落進行 5.2~5.4 之鑑定流程。
  - (4) 若無懷疑菌落，則延長培養 18-24 小時後再行觀察。

### 5. 鑑定流程(圖二)：

#### 5.1 觀察培養基之菌落型態

- 5.1.1 BAP 培養基上灰色半透明菌落(窄型之 Beta 溶血或無溶血)。
- 5.1.2 ChromID™ agar 上紫紅色菌落。
- 5.1.3 GBS Detect™ agar 上大型 Beta 溶血

#### 5.2 做觸媒(3% catalase)試驗。

#### 5.3 若觸媒試驗陰性，進一步做革蘭氏染色。

#### 5.4 若染色呈現革蘭氏陽性鏈球菌(Gram positive coccus in chains)，則進行下列任一個確定試驗來鑑定。

##### 5.4.1 CAMP test (Christie, Atkins, Munch-Peterson test)(圖一)

- (1) 以直線劃法將標準菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 劃於 BAP 中間的位置。
- (2) 同樣以直線劃法，將測試菌株垂直步驟(1)之菌線劃於 BAP 上，切勿碰觸步驟(1)之菌線

- (3) 將 BAP 於 35-37°C，二氧化碳(5%)培養箱中培養 18-24 小時。
- (4) 觀察在 *Staphylococcus aureus* 與測試菌株之交界處是否產生箭頭狀 (arrowhead) 的加強溶血現象，有的話則為陽性反應，確認為乙型鏈球菌。
- (5) 陰性則不會產生箭頭狀 (arrowhead) 的加強溶血現象。

#### 5.4.2 Hippurate hydrolysis test

- (1) 取出三管已分裝好的 Hippurate 試劑。
- (2) 分別加入培養 18-24 小時的測試菌株、陽性對照菌株(*S. agalactiae* ATCC 12386)與陰性對照菌株(*S. pyogenes* ATCC 19615)，濃度約需達 McFarland No.3. (注意勿將培養基挑起，以免內含之蛋白質影響試驗結果)。
- (3) 於 35-37°C 培養 2 小時。
- (4) 加入 4 滴的 ninhydrin 試劑。
- (5) 於 35-37°C 培養 30 分鐘。
- (6) 每隔 10 分鐘觀察一次顏色，陽性反應會於 30 分鐘內出現深藍色變化，陰性則呈現淡淡的紫色或不變色。

#### 5.4.3 鏈球菌血清分型乳膠凝集試驗 (Latex serologic test for streptococcal grouping)：依試劑操作說明執行。

#### 5.4.4 自動化鑑定儀器或商業化套組(Vitek 2, Phoenix, 或 API 等)：依儀器或套組操作說明執行。

### 6. 報告：

- 6.1 陰性報告：乙型鏈球菌培養陰性。
- 6.2 陽性報告：乙型鏈球菌培養陽性。

### 7. 品管：

#### 7.1 CLSI M22-A3 規範之排除品管項目：LIM broth, BAP, CNA; 若自行配製者，依下列規範操作

##### 7.1.1 LIM broth

- (1) 陽性對照：*S. agalactiae* ATCC 12386, 生長(混濁)
- (2) 陰性對照：*Escherichia coli* ATCC 25922 抑制(部份至全部)
- (3) 頻率：每批

##### 7.1.2 BAP

- (1) 陽性對照：*S. aureus* ATCC 25923, 生長良好， $\beta$  溶血
- (2) 陰性對照：無
- (3) 頻率：每批

##### 7.1.3 CNA

- (1) 陽性對照：*S. aureus* ATCC 25923, 生長良好， $\beta$  溶血
- (2) 陰性對照：*Proteus mirabilis* ATCC 12453 抑制(部份至全部)
- (3) 頻率：每批

## 7.2 觸媒(3% catalase)

7.2.1 陽性對照：*S. aureus* ATCC 25923, 產生氣泡。

7.2.2 陰性對照：*S. pyogenes* ATCC 19615, 無氣泡產生。

7.2.3 頻率：每批

## 7.3 CAMP test

7.3.1 陽性對照：*S. agalactiae* ATCC 12386, 產生箭頭狀加強溶血。

7.3.2 陰性對照：*S. pyogenes* ATCC 19615, 無加強溶血的現象。

7.3.3 頻率：每批(BAP)

## 7.4 Hippurate test (hippurate and ninhydrin reagent)

7.4.1 陽性對照：*S. agalactiae* ATCC 12386, 30 分鐘內出現深藍色反應。

7.4.2 陰性對照：*S. pyogenes* ATCC 19615, 淡紫色或不變色。

7.4.3 頻率：每批

## 7.5 StrepB carrot broth

7.5.1 陽性對照：*S. agalactiae* ATCC 12386, 產生橘色至紅色。

7.5.2 陰性對照：*S. pyogenes* ATCC 19615, 無顏色變化。

7.5.3 頻率：每批

## 7.6 ChromID™ agar

7.6.1 陽性對照：*S. agalactiae* ATCC 12386, 產生紅色至紫紅色。

7.6.2 陰性對照：*S. pyogenes* ATCC 19615, 未產生紅色至紫紅色菌落。

7.6.3 頻率：每批

## 7.7 GBS Detect™ agar

7.7.1 陽性對照：*S. agalactiae* ATCC 12386, 大型溶血圈菌落。

7.7.2 陰性對照：*E. faecalis* ATCC 29212, 小型溶血圈菌落。

7.7.3 頻率：每批

## 8. 參考文獻：

8.1 Clinical microbiology procedure handbook, 3<sup>rd</sup> ed., Section 3.9.2, Group B Streptococcus Culture.

8.2 CDC website: [www.cdc.gov/groupbstrep/lab](http://www.cdc.gov/groupbstrep/lab)

8.3 Clinical Laboratory Standard Institute M22-A3

8.4 CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report, No. RR-10, Vol. 59, 2010.

## 9. 附圖：

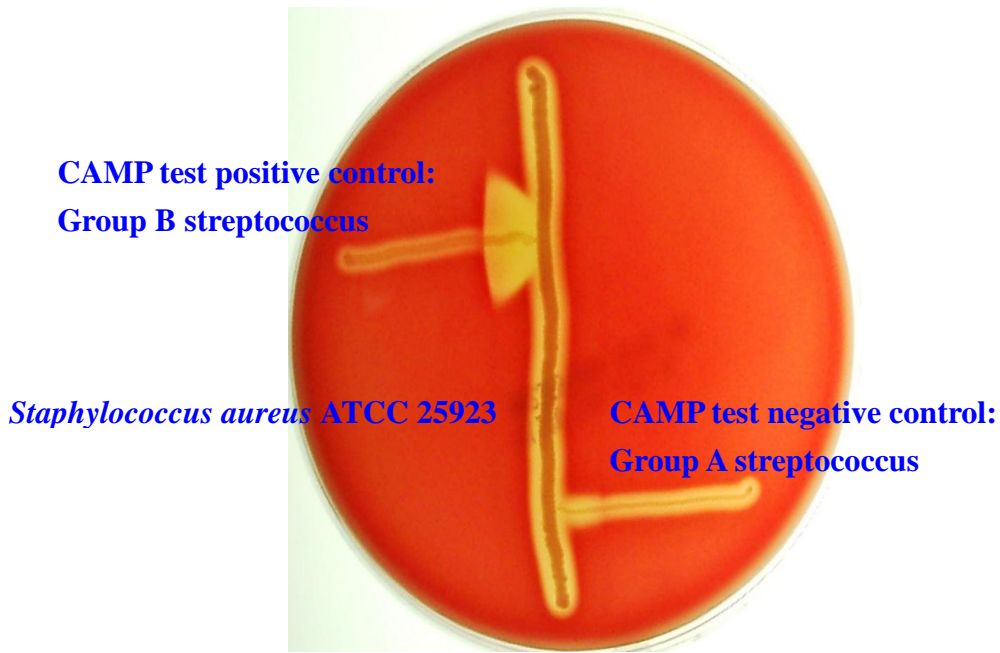
9.1 圖一，CAMP test 操作結果示意圖

9.2 圖二，乙型鏈球菌檢驗鑑定流程圖

圖二，乙型鏈球菌檢驗鑑定流程圖

附圖一、CAMP test

BAP 中間直立菌線：*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 左側水平菌線：Group B streptococcus, 與 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 交界處可見箭頭狀加強溶血區；右側水平菌線：Group A streptococcus, 與 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 交界處可見無加強溶血的現象。



附圖二、乙型鏈球菌檢驗鑑定流程圖

