

常見生殖道定植菌在 CMP™ GBS 運送增菌培養管中的消長評估

黃玉霞¹，蔡文城^{2,3*}

啟新（蘇州）生物科技有限公司，蘇州市¹，江蘇；台美檢驗科技有限公司，新北市²；
國立陽明大學微生物所，台北市³，台灣

摘要

CMP™ GBS 運送增菌培養管(CMP™ GBS TransCultSwab)系針對B群鏈球菌 (Group B Streptococcus, GBS, *Streptococcus agalactiae*, B 族鏈球菌) 檢驗檢體的採檢、輸送、增菌與輔助鑑別的創新裝置，以此裝置中的棉拭從懷孕 35-37 周孕婦的生殖道及/或直腸取得檢體後，插入裝置中含有特殊成分運送培養基的塑膠管，經 35°C 培養箱培養或室溫放置 5 小時(h)後，即可移種至適當的培養基，如 GBS carrot agar/ β/γ detection agar、血平板(BAP)、CNA、PEA 或 CHROMagar *Strept. B*。由於生殖道及/或直腸棉拭檢體常含有定植 (棲息、常在) 該部位的各種微生物，有關定植菌在 CMP™ GBS TransCultSwab 初期的消長狀況尚無相關調查，因此本研究以五種常見的生殖道及/或直腸的定植菌進行評估，測試菌包括 GBS、糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)與棒狀桿菌(*Corynebacterium sp.*)五種菌。GBS 與糞腸球菌分別接種棉拭約 10^3 CFU，而大腸桿菌、金黃色葡萄球菌與棒狀桿菌分別接種棉拭約 10^6 CFU，再插入 CMP™ GBS TransCultSwab，然後置入 35 °C 的一般培養箱，分別於 0、1、2、3、4 與 5 小時進行菌落總數計數(total viable counts)，結果指出隨著培養時間的延長，GBS 與糞腸球菌的菌量隨著增加，培養 5 小時後，菌量分別增加約 154 倍及 86 倍；相反地，大腸桿菌菌量則降低約 36 倍。至於金黃色葡萄球菌與棒狀桿菌的菌數則無顯著變化。基於上述的發現，吾等認為 CMP™ GBS TransCultSwab 可即時讓 GBS 增菌，降低其它定植菌的菌量，從而提高 GBS 分離率，值得臨床醫師及檢驗人員的應用。

關鍵字：B 群鏈球菌、CMP™ GBS 運送增菌培養管、定植菌的消長

前言

B 群鏈球菌(Group B Streptococcus, GBS, *Streptococcus agalactiae*)是一種革蘭氏陽性菌，其感染常導致不良妊娠、死胎、絨毛膜羊膜炎與早產，並且是新生兒敗血症和腦膜炎的主要原因^[1,2]。GBS 在孕婦的直腸和陰道定植率大約 10~30%，約 40%~70%會

傳染給胎兒，導致每年 1,000 名新生兒中有 1.8 名感染 GBS^[3]。美國疾病控制與預防中心建議懷孕 35~37 周的婦女需進行 GBS 篩查，使 GBS 陽性的婦女在分娩前接受預防性抗生素治療，避免傳染給胎兒^[4]，降低胎兒發病率，因此孕產婦篩查 GBS 具有重要意義。臺灣衛生福利部國民健康署在 2014 年也將 GBS 篩查納入健保給付^[5]。

臨床檢驗檢體，特別是病原微生物數量很低的檢體，為了達到分離的效果，需使用運送增菌培養基^[6]。常見用於 GBS 增菌的培

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)2298-1887

E-mail address: wctsai@superlab.com.tw

養基有Lim Broth、Hardy Strep B carrot broth等，用Lim Broth 增菌方法操作繁瑣^[7]，而Hardy Strep B carrot broth 移種嗜氧運送管的棉拭後需加入顯色紙條^[8]，費時又費力。啟新生物科技公司的CMP™ GBS 運送增菌培養管(CMP™ GBS TransCultSwab)系針對B群鏈球菌檢驗檢體的採檢、輸送、增菌與輔助鑒別合為一體的設計，移種所需時間約為15秒/檢體^[9]，大幅度的節約了時間及成本。培養基所含的成分適合GBS的生長，一些特殊成分可抑制其他非鏈球菌生長。CMP™ GBS TransCultSwab的裝置由1支棉拭子和1個含增菌培養基的塑膠管組成，操作時，將棉拭採檢孕婦足量產道分泌物，然後插入CMP™ GBS TransCultSwab，置於35℃的5% CO₂或一般培養箱培養至少5 h，再以三區劃線法移種至CMP™ GBS carrot agar/β/γ GBS detection agar之二分格平板(bi-plate)，置於35℃的5% CO₂或一般培養箱培養18-24 h即可判讀並發出結果報告，GBS檢出率達24.32%^[9]。

孕婦宮內定植有多種微生物，常見的有GBS、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*)^[10]、棒狀桿菌(*Corynebacterium* sp.)，所以當用棉拭採檢陰道分泌物時，檢體常同時含有多種微生物。但各種微生物在CMP™ GBS TransCultSwab初期的消長狀況尚無相關調查，因此本研究以上述5種常見的宮內感染菌作為測試菌，以瞭解各種微生物在CMP™ GBS 運送增菌培養管初期的消長狀況。

材料與方法

GBS 運送增菌培養管

CMP™ GBS 運送增菌培養管(CMP™ GBS TransCultSwab；圖1)由啟新生物科技公司(蘇州，中國)生產，備案號：蘇

蘇械備20152095號。

培養基及稀釋液配製

Blood agar plate (BAP)培養基配製：稱取40 g Trypticase™ Soy Agar (TSA II) (BD公司，USA) 溶於含有1 L純水的錐形瓶中，均勻混合後，置於90℃水浴30 (min) 分鐘，再以121℃滅菌15分鐘，然後置於47℃水浴冷卻，加入50 mL 綿羊血(sheep blood) (新銳生物科技公司，杭州，中國) 混合均勻後注入90 mm塑膠培養皿，製成血平板培養基(blood agar plate, BAP)。

氯化鈉(NaCl)稀釋液(0.85%)配製：稱取0.85 g NaCl 固體(國藥集團，中國)溶於100 mL純化水中，均勻混合後，分裝於試管中，121℃滅菌15分鐘。

試驗菌株

本研究使用的菌株為GBS (*S. agalactiae* ATCC12386)、糞腸球菌(*E. faecalis* ATCC29212)、大腸桿菌(*E. coli* ATCC 25922)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC 25923)、棒狀桿菌(*Corynebacterium* sp. ATCC 43995)，五種菌係保存在-70℃的GermBank菌種保存管[由江蘇省啟新(蘇州)生物科技公司生產，備案號：蘇蘇械備20152103]，試驗前將其取出接種於BAP，於36±1℃一般的培養箱培養18-24 h，共活化兩次。

菌懸液配製

用無菌接種環分別挑取少量GBS、糞腸球菌、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌與棒狀桿菌至0.85% NaCl稀釋液，渦旋振盪混勻後製成菌懸液，調節菌液濃度至相當於McFarland No. 0.5 標準液濃度，此時菌液濃度約為 1.5×10^8 CFU/mL。大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、棒狀桿菌三種細菌10倍稀釋至 1.5×10^7 CFU/mL，而GBS、糞腸球菌稀釋至 1.5×10^4

CFU/mL。

試驗菌株稀釋液接種 CMP™ GBS TransCult Swab 的初期在不同時間進行計數

用移液器分別吸取 0.1 mL 濃度為 1.5×10^7 CFU/mL 的大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、棒狀桿菌稀釋液至棉拭，即接種量約 1.5×10^6 CFU；另外用移液器分別吸取 0.1 mL 濃度為 1.5×10^4 CFU/mL 的 GBS 與糞腸球菌稀釋液至棉拭，接種量約 1.5×10^3 CFU，然後將棉拭子插入 CMP™ GBS TransCultSwab，置於 35 °C 的一般培養箱培養。每種菌各接種 12 支 CMP™ GBS TransCultSwab，分別在培養 0、1、2、3、4 與 5 h 取 2 支培養管，將棉拭在 45 mL 無菌 0.85% NaCl 溶液振盪 15 秒，然後將培養管中的培養基約 4.8 mL 全部加入其中，均勻混合後稀釋適當倍數，分別取 0.2 mL 最終稀釋液至 BAP，用無菌玻璃塗抹棒塗抹均勻，每個樣品稀釋液塗抹 2 個 BAP，倒置於 35 °C 的一般培養箱培養。GBS、糞腸球菌、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌培養 18-24 h 後計數，而棒狀桿菌培養 36-48 h 後計數，然後計算 4 個 BAP 生長菌落的平均數，根據稀釋倍數換算出每種菌在 CMP™ GBS TransCultSwab 培養初期不同時間的菌數。

結 果

分別接種 GBS、糞腸球菌、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、棒狀桿菌五種試驗菌的稀釋液至 CMP™ GBS TransCultSwab，置於 35 °C 的一般培養箱培養 0、1、2、3、4 及 5 h 後，在該設定時段將菌液從培養管取出並稀釋後取 0.2 mL 塗抹於 BAP 上，每個培養管的稀釋菌液塗抹 2 個 BAP，在 35 °C 的一般培養箱培養適當時間後計數，五種試驗菌分別在 CMP™ GBS TransCultSwab 培養 0、1、2、3、4 及 5 h 後的各個時間點菌量如表 1，結果指出 GBS 及糞腸球菌在 GBS Tran-

sCultSwab 明顯增菌，分別增加 154 倍及 86 倍；而大腸桿菌的生長明顯受到抑制，隨著培養時間延長，菌量逐漸減少，降低了 36 倍；而金黃色葡萄球菌及棒狀桿菌也受到抑制，但菌數總體變化不明顯（圖 2）。

討 論

CMP™ GBS TransCultSwab 是一種採檢、運送增菌培養基，且對 GBS 具有選擇性，若移種前呈胡蘿蔔色，則直接判讀 GBS 陽性，而非 B 群鏈球菌者均不會顯現胡蘿蔔色，特異性高達 100%。一般的嗜氧運送管（如 Amies medium）不含營養成分，微生物不能增殖只能保持原本的狀態^[6]，而 CMP™ GBS 運送增菌培養管含營養成分，能促進 GBS 生長，培養 5 h 後即可增菌移種。蔡等^[11]比較了不同增菌培養基檢測 GBS 的效能，認為 CMP™ GBS TransCultSwab 配合 GBS carrot agar/ β/γ GBS detection agar 之 bi-plate 最為簡易快捷，且可縮短發出報告的時間。林等^[12]研究比較了 CMP™ GBS TransCultSwab 裝置培養法與 PCR DNA 法檢測 GBS 的檢出率，分別為 14.43% 與 14.13%，此指出 CMP™ GBS TransCultSwab 對 GBS 的檢出優於 PCR DNA 檢查法。

本研究將五種試驗菌 GBS、糞腸球菌、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌及棒狀桿菌菌懸液調整至相當於 McFarland No. 0.5 標準液濃度，理論值約 1.5×10^8 ，雖這種比濁法調菌液濃度受限於個人肉眼的觀察而有誤差^[13]，但每種試驗菌的稀釋液各接種 12 支 CMP™ GBS TransCultSwab 的菌量相同。培養 0、1、2、3、4 及 5 h 後分別將菌液全部取出後棉棒在 0.85% NaCl 溶液中振盪洗滌，雖然棉棒中可能仍會有少量菌殘留，因每支 CMP™ GBS TransCultSwab 都進行相同操作，因此本研究中棉棒上殘留的菌量均忽略不計。

本研究將五種試驗菌接種於 CMP™ GBS

TransCultSwab 培養 5 h 後，發現大腸桿菌生長受到抑制，隨著培養時間延長，菌數逐漸減少，由 10^5 CFU/mL 降至 10^3 CFU/mL，降低了 36 倍，主要是因為運送培養基中含特殊成分可以抑制大部分革蘭氏陰性菌生長，而金黃色葡萄球菌及棒狀桿菌生長也受到抑制，

但菌數無明顯變化（圖 2）；表明 CMP™ GBS TransCultSwab 可以降低定植菌對 GBS 生長的影響，與預期的結果一致。

蔡等研究認為多種測試菌與 GBS 等量存在時對 GBS 在 CMP™ GBS TransCultSwab 的顯色無影響，但生理特性相近的糞腸球菌



圖 1. GBS 運送增菌培養管的外觀：上為 GBS 的陽性反應；下為未接種的對照管

表 1. 五種不同試驗菌接種於 CMP™ GBS 運送增菌培養管後培養 0~5 h 的菌量(CFU/mL)消長情形

培養時間	GBS	糞腸球菌	大腸桿菌	金黃色葡萄球菌	棒狀桿菌
0 h	3.3×10^3	2.3×10^3	3.7×10^5	1.16×10^5	3.8×10^5
1 h	5.5×10^3	4.3×10^3	2.5×10^5	1.05×10^5	4.0×10^5
2 h	2.6×10^4	2.6×10^4	2.0×10^5	1.41×10^5	6.5×10^5
3 h	5.9×10^4	2.9×10^4	6.6×10^4	7.38×10^4	4.5×10^5
4 h	4.1×10^5	1.3×10^5	2.6×10^4	1.13×10^5	5.8×10^5
5 h	5.1×10^5	2.0×10^5	1.0×10^4	1.28×10^5	5.3×10^5
5 h 培養的 增加/降低倍數	+154 倍	+86 倍	-36 倍	+0.1 倍	+0.4 倍

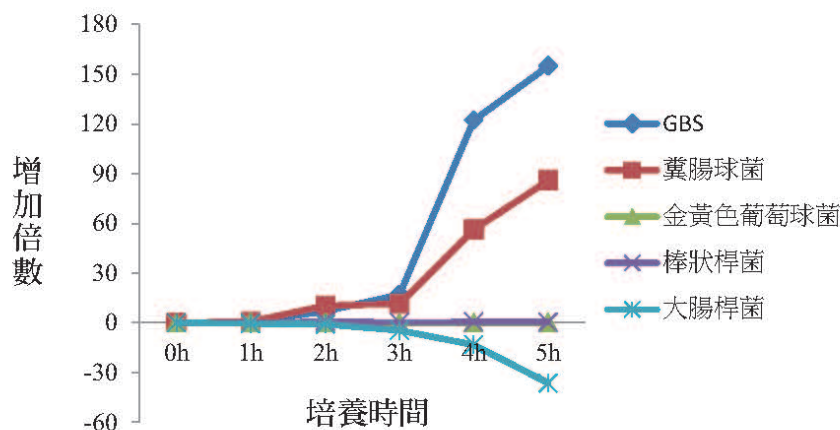


圖 2. 五種不同試驗菌接種於 CMP™ GBS 運送增菌培養管後培養 0~5 h 的菌量增減倍數

仍會干擾 GBS 顯色程度，而當糞腸球菌高於 GBS 10 倍或以上菌量時即會出現偽陰性的結果^[14]。從本研究結果可以看出，GBS 與糞腸球菌在 GBS TransCultSwab 的生長狀況相似，菌量在培養 5 h 後均由 10^3 CFU/mL 增至 10^5 CFU/mL，二者增菌明顯，分別各增加分別各增加約 154 倍及 86 倍，但 GBS 的生長速度快於糞腸球菌（圖 2），因此若檢體中同時存在 GBS 及糞腸球菌時，糞腸球菌將可能生長而抑制並干擾 GBS 顯色。若要避免糞腸球菌干擾，可在接種檢體後初期 5 h 以後的任何時間將 CMP™ GBS TransCultSwab 培養物移種 GBS carrot agar/ β/γ GBS detection agar 之 bi-plate，培養後，可將兩者區分開，GBS 在 GBS carrot agar 顯胡蘿蔔色， β/γ GBS detection agar 上出現 β -溶血型菌落，相反地糞腸球菌則分別為不顯色及無 β -溶血型。CMP™ GBS TransCultSwab 搭配 CMP™ GBS carrot agar 使用可提高 GBS 的分離效率，並且可提早一日操作藥敏試驗，節約成本及人力與物力^[15]。另一方面，還可通過 CAMP 試驗、血清分群試驗、MALDI-TOF MS 等檢測方法鑑定出 GBS（ β 溶血型）。

綜上所述，GBS 在 CMP™ GBS TransCultSwab 裝置中培養於 35 °C 的一般培養箱培養 5 h 後可快速增菌，同時可降低其他定植菌菌量。又 CMP™ GBS TransCultSwab 的最低偵測極限為 10 CFU^[11]，即使檢體中菌量很少也能藉由 CMP™ GBS TransCultSwab 增菌而被檢測出來，因此，其與 GBS carrot agar/ β/γ GBS detection agar 之 bi-plate 的配合應用將可提高 GBS 的檢出率，值得檢驗醫師及實驗室檢驗人員的採用。

參考文獻

1. Patras KA, Wescombe PA, Rosler B, *et al.* *Streptococcus salivarius* K12 limits group B *Streptococcus* vaginal colonization. *Infect Immun* 2015; 83:3438-44.
2. Kothary V, Doster RS, Rogers *et al.* Group B *Streptococcus* induces neutrophil recruitment to gestational tissues and elaboration of extracellular traps and nutritional immunity. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28217556>.
3. El Aila NA, Tency I, Claeys G *et al.* Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. *BMC Infect Dis* 2010; 10:285. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920213>.
4. The Centers for Disease Control and prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. *MMWR Recomb Rep* 2010; 59:1-36.
5. 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>。
6. 蔡文城，蔡岳廷。實用臨床微生物診斷學，第十一版。2017:61-2。九州書文物有限公司，台北，台灣。
7. Jones DE, Friedl EM, Kanarek KS *et al.* Rapid identification of pregnant women heavily colonized with group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1983; 18:558-60.
8. Hardy diagnostics https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/strepBCarrotBrothKit.html.
9. 蔡文城，洪晟峰，陳詩涵。圍產期孕婦產前檢查 B 群鏈球菌的簡易高效快檢技術。2017:161-2。第九屆圍產醫學新進展高峰論壇論文彙編，杭州，浙江。
10. 孫瑜，陳倩，邊旭明等。北京市七家三級甲等醫院宮內感染病例分析。中華圍產醫學雜誌 2009; 12:342-5。
11. 蔡偉勳，何承蓉，洪晟峰，蔡文城。孕婦產前檢查乙型鏈球菌 CMP™ GBS carrot broth 與 CMP™ GBS TransCultSwab 的效能評估。檢驗及品保雜誌 2016; 5:1-10。
12. 林新祝，吳健甯，張雪芹等。晚孕陰道 B 族鏈球菌定植與新生兒感染的關係。中華圍產醫學雜誌 2016; 19:491-6。
13. 朱豔靜，李宇。測定菌體濃度的簡便方法。工業微生物 2006; 36:47-9。
14. 邱彥昕，黃玉君，洪晟峰等。快速篩檢 B 群鏈球菌之簡易創新設計-GBS 檢體運送培養管。檢驗及品保雜誌 2013; 2:49-59。
15. 蔡文城，蔡偉勳，呂旭峰等。CMP™ GBS 檢體運送管配合 GBS carrot agar 的移種可提升產前檢查 B 群鏈球菌的分離率及效率。檢驗及品保雜誌 2014; 4:51-7。

Evaluation of Growth of Commonly Encountered Colonizing Bacteria of the Genitourinary Tract in the CMP™ GBS TransCultSwab

Yuxia Huang¹, Wen-cherng Tsai^{2,3*}

¹Creative Microbiologicals, Ltd., Suzhou, China ; ²Super Laboratory, Ltd., New Taipei City ; ³Institute of Microbiology and Immunology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

The CMP™ GBS TransCultSwab is an innovative device used for specimen collection and transport, as well as for the enrichment and preliminary detection of group B Streptococcus (GBS, *Streptococcus agalactiae*). The swab contained in the device is applied to collect genitourinary or rectal specimens between weeks of 35 and 37 of pregnancy, after which it is inserted into a plastic tube containing the special ingredients of a GBS enrichment medium and then transported to the laboratory. After 5 hours of incubation either at 35°C or room temperature, the swab is then inoculated in an appropriate isolation medium, e.g. carrot agar/ β / γ detection agar (bi-plate), blood agar, Columbia colistin nalidixic acid agar, phenylethyl agar or CHROMagar Strept. B. There are several commonly encountered colonizing microorganisms in the genitourinary tract and/or the rectum; however, their initial growth conditions in the GBS TransCultSwab have not yet been studied. Therefore, this study investigated the growth of the 5 most commonly found colonizing microorganisms, namely, GBS, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium sp.*, when they were present in the GBS TransCultSwab. Among them, GBS and *E. faecalis* were separately

inoculated with 10³ CFU on the swab, whereas *E. coli*, *S. aureus*, and *Corynebacterium sp.* were separately inoculated with 10⁶ CFU. The swabs were then inserted into a GBS TransCultSwab individually and incubated at a 35°C in an ambient incubator. After 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours, total viable counts for each of the swabs were performed in trypticase soy agar. The results indicated that the longer the incubation time, the greater the growth of GBS and *E. faecalis*. Their bacteria counts were increased by 154x and 86x respectively. In contrast, the growth of *E. coli* decreased by 36x, whereas the growth of *S. aureus* and *Corynebacterium sp.* were not significantly altered. Based on the above findings, we concluded that the CMP™ GBS TransCultSwab can induce GBS growth, reduce the bacteria counts of other colonized bacteria. Therefore, the device can increase the isolation (detection) rate of GBS, and thus it is worthy of being integrated into the routine work of obstetricians and laboratory technologists.

Keywords: CMP™ GBS TransCultSwab, *Streptococcus agalactiae*, GBS, growth of colonizing microorganisms in the genitourinary tract and/or the rectum