

建立從生乳中快速偵測 B 群鏈球菌的最適當方法

葉卜碩¹，蔡岳廷^{2,3}，蔡文城^{2,4*}

¹國立中央大學生命科技系，桃園市；²台美檢驗科技有限公司，新北市，

³台美醫事檢驗所，新北市；⁴國立陽明大學微免科所，台北市，台灣

摘要

B 群鏈球菌 (GBS, Group B *Streptococcus*, *Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, 乙型鏈球菌) 除了引發人類敗血症外, 還會使乳牛感染乳房炎。過去, 乳牛乳房炎的微生物檢測大多將生乳檢體直接塗抹在 BAP 及/或 CNA 平板上, 若長出疑似 GBS, 則進一步操作傳統鑑定試驗, 然而, 此鑑定方法的過程耗時又耗力。吾等參考懷孕婦女產前 GBS 的檢測方法, 將約 100 mL 含 GBS 的模擬生乳檢體經離心後, 先以沉澱物接種本研究室的創新設計 GBS carrot broth, 增菌後再接種兩種選擇/區分性平板培養基 (GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar)。利用添加純 GBS 菌與混菌 (GBS+其它菌) 的模擬檢體, 以過夜增菌及不經增菌接種法的效能進行比較。結果指出, 純 GBS 模擬檢體接種於 GBS carrot broth 培養 18、24 及 48 小時後, 若呈現胡蘿蔔色 (即 GBS 陽性) 的最低菌量 (偵測極限) 分別為 10^2 、 10 及 1 CFU; 而混菌模擬檢體者, 則為 $10^3\sim 10^6$ 、 $10\sim 10^4$ 及 $1\sim 10^2$ CFU/mL。至於純 GBS 模擬檢體使用過夜增菌及不經增菌的方法同時接種於 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar 二種平板培養基, 其等的偵測極限均為 10 CFU; 而接種混菌模擬檢體, 結果發現過夜增菌法的偵測 GBS 效能比不經增菌者佳 (降低 $10^1\sim 10^6$ 倍)。根據以上的發現, 吾等建議檢驗室可將約 100 mL 生乳檢體離心後, 將沉澱物回溶並移入 GBS carrot broth 中, 增菌約 20 至 24 小時後直接判讀, 陰性者再接種 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar (或配成分隔培養基), 將可快速且正確地偵測出生乳中的 GBS。

關鍵字: B 群鏈球菌、乳牛乳房炎、GBS carrot broth、GBS carrot agar、 β/γ GBS detection agar、偵測極限

前言

B 群鏈球菌 (GBS, Group B *Streptococcus*, *Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, 乙型鏈球菌), 不僅能引起人類敗血症、肺炎, 以及新生兒的腦膜炎^[1]。亦可對其它生物體引發疾病, 例如: 乳牛的乳房炎及魚類的鏈球菌感染症等^[2]。

乳房炎為乳牛中常見的疾病之一^[2-7], 其

致病菌可分為二類: 一為環境性乳房炎, 係由乳牛活動環境中的病原菌所導致的感染; 另一為傳染性乳房炎, 由乳牛擠乳時, 乳房接觸受病原菌污染的器具, 使得病原菌進入乳房的乳室及乳腺的導管系統引發感染及發炎症狀, 進而破壞乳房組織, 最後導致牛乳產量下降或終身無乳。GBS 為傳染性乳房炎常見的感染病原^[5]。當乳牛受到 GBS 感染時, 受感染之乳房便會釋放大量的 GBS 至乳汁中, 若人類飲用受污染的牛乳將可引發疾病。

乳房炎的確認需先經過一系列的方法檢測, 例如: 物理性檢查、加州乳房炎試驗

* 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

(California mastitis test)、體細胞數^[3]、電導度測定與生乳中的微生物檢測等^[4]。傳統上，生乳 GBS 檢測檢體會先接種至兩種培養基：滋養性培養基（如：BAP）及選擇性培養基（如：含有 thallos sulphate 與 aesculin 的 Edwards medium），之後培養於 35°C 培養箱，再依據生長菌落的特徵、革蘭氏染色抹片觀察、觸酶試驗（catalase test）、CAMP 試驗或馬尿酸水解（hippurate hydrolysis）試驗鑑別分離菌。若分離菌結果呈現革蘭氏陽性球菌，觸酶陰性以及 CAMP 試驗或馬尿酸水解陽性，便可確認為 GBS^[4]，但仍有 3~5% GBS 的 γ 溶血型株^[8-9]，此將無法從 BAP 及 Edwards medium 偵測出。

為了讓檢驗室快速診斷生乳中是否含有 GBS，本研究改良懷孕婦女產前 GBS 的檢查方法，分別以純 GBS 及混菌（GBS 與其他常見乳房炎的致病菌）製備成模擬生乳檢體，再分別以不經增菌與經 GBS carrot broth 增菌的方式接種至本研究室創新設計的 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar（以 BAP 及 CNA 為對照組），根據分離效能，分析不同檢驗流程（是否經增菌及不同類別分離培養基的移種）的準確性，期能建立生乳快速且正確的 GBS 檢測方法。

材料與方法

試驗菌種來源

本研究使用的 GBS（ β -溶血型株, ATCC 12386，與 γ -溶血型株 ATCC 13813）及牛乳房炎常見的五種致病菌^[10] [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)、*Streptococcus uberis* (ATCC 19436)、*Escherichia coli* (ATCC 25922)、*Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) 及 *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048)]，均購自 ATCC 授權的 MircoBio-Logicals 公司（MBL，加拿大）。各菌種/株保存於 GermBank 的菌種保存管（啟新生物

科技有限公司，新北市，台灣），然後儲藏於 -70°C 冰箱中。

試驗菌種之移種

進行試驗前，從 Germbank 裝置分別取出菌株移種於 blood agar plate (BAP)，然後於 35°C 的 5% CO₂ 培養箱培養 18~24 小時後，再以四區劃線法移種至 BAP 以獲得單一菌落，共移種 3 次。

培養基及稀釋液

本研究比較的培養基包括(i)分離培養基：包括測試培養基 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar 以及對照培養基 BAP 與 CNA；(ii)增菌培養基：GBS carrot broth (5 mL) (圖 1)。模擬檢體稀釋液為 0.1% peptone water (蛋白胨水)。所有培養基與稀釋液皆購自啟新生物科技有限公司（新北市，台灣），而生乳檢體則購自便利超商。

含純 GBS 模擬檢體的製備與處理

將新鮮生長的 GBS β -與 γ -溶血型株，分別以 0.1% peptone water 調製相當於 McFarland No. 0.5 (約含 1.5×10^8 CFU/mL) 之懸浮菌液，再進行 10 倍連續稀釋，使得每一菌株分別獲得 8 個不同濃度的稀釋液。接著將各稀釋液分別取 1 mL 加入約 100 mL 的生乳中，此為含純 GBS 模擬檢體，所含的菌量分別約為 1.5×10^8 CFU~ 1.5×10^1 CFU。檢體處理時，將約 100 mL 生乳檢體分裝於 2 個 50 mL 離心管中，以 $3,000 \times g$ 離心 30 分鐘後，移除上清液與上層油脂，再用 1 mL 的 0.1% peptone water 回溶沉澱物，最後將兩管之回溶液混合均勻，即為純 GBS 模擬檢體的回溶液。

含純 GBS 模擬檢體的偵測極限測定

不經增菌的直接接種法：從上述回溶液取 0.1 mL 接種於 GBS carrot agar 與 β/γ GBS

detection agar(測試組)以及 BAP 與 CNA(對照組)，然後分別利用三角玻棒以無菌技術塗抹均勻。此時每平板外加的純菌量約為 $0.1\sim 10^6$ CFU。最後將兩種平板置於 35°C 的 5% CO_2 培養箱，培養 18~24 小時後，觀察菌落生長狀況。

經 GBS carrot broth 增菌(隔夜增菌)的接種法：取 0.1 mL GBS β -及 γ -溶血型株的純菌模擬檢體回溶液滴入棉棒中。再將棉棒插入 GBS carrot broth 置於 35°C 的 CO_2 培養箱培養 18~24 小時後，觀察 GBS carrot broth 之顯色情況，另外亦從 GBS carrot broth 取出 0.1 mL，以上述的方式接種測試培養基 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar 以及對照培養基 BAP 與 CNA 平板，塗抹後，進行培養及觀察。

含混菌模擬檢體的製備與處理

利用 GBS β 溶血型，依前述方法將菌量調至 $0.1\sim 10^6$ CFU/mL，再分別與五種牛乳房炎常見的一種致病菌 *S. aureus*、*S. uberis*、*E. coli*、*K. pneumoniae* 或 *E. aerogenes* 混合〔菌量分別為 10^5 CFU/mL(高菌量)或 10^3 CFU/mL(低菌量)〕。之後將混菌溶液分別加入至約 100 mL 生乳內作為混菌之模擬檢體，然後依上述設計的檢驗流程操作，首先將模擬檢體在 $3,000\times g$ 離心 30 分鐘後，移除上清液與上層油脂，接著利用 1 mL 的 0.1% peptone water 回溶，此即為混菌檢體的回溶液。

含混菌模擬檢體的偵測效能

不經增菌的直接接種法：取出混菌檢體的回溶液，以四區劃線法分別劃種於 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar(測試組)以及 BAP 與 CNA(對照組)。另於 GBS carrot agar 中的第一、二區穿刺 4-5 次，最後將兩種平板置於 35°C 的 5% CO_2 培養箱。

經培養 18~24 小時後，觀察菌落生長狀況。

GBS carrot broth 增菌(隔夜增菌)的接種法：利用棉棒吸取混菌之回溶液，再種入 GBS carrot broth 增菌培養基，於 35°C 的 5% CO_2 培養箱培育 18~24 小時後，觀察 GBS carrot broth 的呈色狀況。若 GBS carrot broth 出現胡蘿蔔色，即為 GBS；若無顯色，則將 GBS carrot broth 培養液分別以上述的方式接種至測試培養基 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar 以及對照培養基 BAP 與 CNA 平板。四區劃線、穿刺、培養及觀察如同上述的直接接種法。

偵測極限的定義

接種含純 GBS 或混菌模擬生乳檢體後，不論經或不經增菌，以 β/γ GBS detection agar、BAP 及 CNA 呈 β 溶血型或 GBS carrot broth 及 GBS carrot agar 呈現胡蘿蔔色的最低稀釋濃度作為該培養基偵測極限的依據。

結 果

含純 GBS 模擬生乳在 GBS carrot broth 增菌培養不同時間點的偵測極限

含純 GBS β -及 γ -溶血型株的回溶液經 GBS carrot broth 增菌不同時間後，觀察 GBS carrot broth 的顯色情況。結果顯示 GBS β 溶血型株於增菌 18、24 及 48 小時，GBS carrot broth 呈胡蘿蔔色的偵測極限菌量分別為 10^2 、 10 及 1 CFU。另一方面，GBS γ 溶血型均不呈色(表 1)。

含純 GBS 模擬生乳檢體利用不經增菌方法測得各種培養基的偵測極限

將含純 GBS β -或 γ -溶血株的回溶液，分別接種 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar 兩種測試培養基以及 BAP 與 CNA 兩種對照培養基，經 18~24 小時培養，以 β/γ GBS detection agar、BAP 與 CNA 呈 β 溶血型，以

及 GBS carrot agar 生長菌落呈現胡蘿蔔色為依據，結果發現 GBS β -溶血株在四種培養基的偵測極限均為 10 CFU (表 2)。 γ 溶血型株僅在 β/γ GBS detection agar 呈 β 溶血型，偵測極限為 0.1 CFU；而在 BAP 與 CNA 仍呈 γ 溶血型，在 GBS carrot agar 的生長菌落也無呈色，三者均無法偵測 GBS γ -溶血株。

含純 GBS 模擬生乳檢體利用隔夜增菌的方法測得各種培養基的偵測極限

將含純 GBS β -或 γ -溶血株的回溶液經 GBS carrot broth 隔夜增菌培養後，以上述不經增菌的方式分別移種及判讀四種培養基，結果發現 GBS β -溶血株在 GBS carrot agar 與 CNA 的偵測極限均為 10 CFU (表 3)，而在 β/γ GBS detection agar 及 BAP 則為 1 CFU。至於 γ 溶血型在 β/γ GBS detection agar 的偵測極限為 0.1 CFU，而無法從 GBS carrot agar、BAP 或 CNA 偵測出。

含混菌模擬生乳檢體在 GBS carrot broth 增菌不同時間點的偵測極限

將調製七個稀釋倍數濃度的 GBS β -溶血型菌株 (濃度約 $1\sim 10^6$ CFU/mL) 再分別加入一種乳房炎病原菌 (調製兩個濃度約 10^5 CFU/mL 與 10^3 CFU/mL) 混合均勻，共 5 種病原菌。然後分別以上述的方式製備混菌的回溶液，接種 GBS carrot broth，經 18、24 及 48 小時培養後，結果顯示在增菌 24 小時的偵測極限為 $10\sim 10^4$ CFU/mL，而 48 小時為 $1\sim 10^2$ CFU/mL，至於增菌 18 小時則為 $10^3\sim 10^6$ CFU/mL (表 4)。

含混菌模擬生乳檢體利用不經增菌或隔夜增菌方法測得培養基的偵測極限

將調製八個稀釋倍數濃度的 GBS β -溶血型菌株 (濃度約 $0.1\sim 10^6$ CFU/mL)，再分別加入一種乳房炎病原菌 (調製二個濃度約 10^5

CFU/mL 與 10^3 CFU/mL) 混合均勻，然後依上述方式測試分離/鑑別培養基對 GBS 的偵測效能。結果顯示於加入 10^5 CFU/mL 乳房炎病原菌經隔夜增菌後所接種的 GBS carrot agar 及 β/γ GBS detection agar 比不經增菌者的偵測極限分別下降 $1\sim 10^5$ 倍與 $1\sim 10^6$ 倍；於加入 10^3 CFU/mL 乳房炎病原菌，隔夜增菌比不經增菌的偵測極限分別下降 $10\sim 10^3$ 倍與 $10\sim 10^5$ 倍 (表 5)。

討 論

乳房炎是乳牛最普遍的疾病之一，過去，國外對瓶裝生乳進行調查，發現有 31% 含有 GBS^[8]，而國內調查結果，則發現有 49% 含有鏈球菌相關菌種^[11,12]，而感染 GBS 可能造成母乳終身無乳，故若能夠提早發現病菌，即可提早治療，將可防止傳染健康的乳牛。目前乳房炎的治療最常使用抗生素，包括鏈黴素(streptomycin)、羧四環黴素(oxytetracycline)、盤尼西林(penicillin)、氯噁唑西林(cloxacillin)與雙氯噁唑西林(dicloxacillin)等^[6]。

用於偵測生乳中 B 型鏈球菌的選擇性培養基，包括(1)Edwards modified medium，(2)添加 colistin sulfate (5 mg/L)和 oxolinic acid (2.5 mg/L)的 Edwards modified medium，(3)Streptococcus selective medium，(4)Streptosel agar 及(5) thallium-crystal violet-toxin-ferric citrate medium^[13]，這些培養基的偵測靈敏度(sensitivity)與特异性(specificity)分別為：(1)100%與 70.6%；(2)100%與 100%；(3)100 與 47.1%；(4)57.1%與 76.5%及(5)100%與 76.5%^[11]。上述培養基的生長菌落若懷疑為 GBS，需再操作後續的鑑定(如 CAMP 試驗)。本研究所使用的移種培養基中，GBS carrot agar 可即時鑑定 GBS β -溶血型株，其靈敏度為 98.3%，特异性為 100%^[14]；而 β/γ GBS detection agar 可偵測 γ -溶血型株，但須

表 1. GBS 不同溶血株於生乳中在 GBS carrot broth 培養不同時間後的顯色（胡蘿蔔色）狀況

菌量(CFU)		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
GBS β -溶血株	18±1 小時	+ ^a	+	+	+	+	-	-
	24±1 小時	+	+	+	+	+	+	-
	48±1 小時	+ ^a	+	+	+	+	+	+
GBS γ -溶血株		-	-	-	-	-	-	-

^a +, 呈胡蘿蔔色; -, 不呈色。

表 2. 含純 GBS 模擬生乳檢體利用不經增菌方法測得各種培養基的偵測極限

培養基		β -溶血型株的菌量							
		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	1	0.1
GBS carrot agar	菌落數 ^a	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	呈色情況	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	-	-
β/γ GBS detection agar	菌落數	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	溶血情況	β	β	β	β	β	β	-	-
BAP	菌落數	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	溶血情況	β	β	β	β	β	β	-	-
CNA	菌落數	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	溶血情況	β	β	β	β	β	β	-	-
培養基		γ -溶血型株的菌量							
		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	1	0.1
GBS carrot agar	菌落數	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+
	呈色情況	不呈色	不呈色	不呈色	不呈色	不呈色	不呈色	不呈色	不呈色
β/γ GBS detection agar	菌落數	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	+
	溶血情況	β	β	β	β	β	β	β	β
BAP	菌落數	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	+
	溶血情況	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ
CNA	菌落數	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	+
	溶血情況	γ	γ	γ	γ	γ	γ	-	γ

^a GBS 生長菌落數: +++++, 代表菌落數 > 300; +++, 代表菌落數於 101-300; ++, 代表菌落數於 11-100; +, 代表菌落數 ≤ 10; -, 代表無菌落。

^b β 溶血型為完全溶血型, 在菌落周圍有透明圈環; γ 溶血型為不溶血型, 菌落周圍無圈環。

後續的鑑定^[15]。因此偵測生乳中 GBS 時, 同時接種 GBS carrot agar 及 β/γ GBS detection agar, 將可快速且正確地鑑定 GBS 的 β 溶血型株以及 γ -溶血型株, 而達到互補的優點。

含混菌模擬生乳檢體不經增菌時, 同時接種 GBS carrot agar 及 β/γ GBS detection

agar 的偵測極限為 10² ~ 10⁶ CFU/mL; 但經 GBS carrot broth 增菌, 則偵測極限可降至 0.1~10³, 兩者的差距高達 1~10⁶ 倍 (表 5)。GBS carrot broth 的顯色亦可協助或驗證 GBS carrot agar 的呈色結果, 其增菌 24 小時比增菌 18 小時的偵測極限佳 (表 4)。雖然增菌

表 3. 含純 GBS 模擬生乳檢體利用隔夜增菌的方法測得各種培養基的偵測極限

培養基	β -溶血型株的菌量								
		10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1	0.1
GBS carrot agar	菌落數 ^a	++++	++++	++++	+++	+++	++	-	-
	呈色情況	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	胡蘿蔔色	-	-
β/γ GBS detection agar	菌落數	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-
	溶血情況	β	-						
BAP	菌落數	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-
	溶血情況	β	-						
CNA	菌落數	++++	++++	++++	+++	+++	++	-	-
	溶血情況	β	β	β	β	β	β	-	-
培養基	γ -溶血型株的菌量								
		10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1	0.1
GBS carrot agar	菌落數	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++
	呈色情況	不呈色							
β/γ GBS detection agar	菌落數	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	+
	溶血情況	β							
BAP	菌落數	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++
	溶血情況	γ							
CNA	菌落數	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++
	溶血情況	γ							

^a GBS 生長菌落數：++++，代表菌落數 > 300；+++，代表菌落數於 101-300；++，代表菌落數於 11-100；+，代表菌落數 ≤ 10；-，代表無菌落。

^b β 溶血型為完全溶血型，在菌落周圍有透明光環； γ 溶血型為不溶血型。

表 4. 含混菌模擬生乳檢體在 GBS carrot broth 增菌不同時間點的偵測極限

外加菌種及菌量 (CFU/ml)	GBS β -溶血型株的的偵測極限(CFU/mL)			
		增菌 24±1 小時	增菌 48±1 小時	增菌 18±1 小時
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10^5	10^2	10	10^5
	10^3	10	10	10^4
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10^5	10^4	10	10^4
	10^3	10^2	10	10^4
<i>E. coil</i> ATCC 25922	10^5	10^2	10^2	10^4
	10^3	10^2	10	10^3
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	10^5	10^2	1	10^6
	10^3	10^2	10^2	10^5
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	10^5	10^2	10	10^4
	10^3	10^2	10	10^4

表 5. 各種菌量的 GBS β -溶血型株分別加入濃度 10^4 CFU/mL 或 10^3 CFU/mL 的五種乳房炎病原菌 (共 5 種) 利用經或不經增菌後的方法移種至 GBS carrot agar 與 β/γ GBS detection agar 的偵測效能

菌種及混入菌量 (CFU/mL)	培養基	GBS β -溶血型株的的偵測極限(CFU/mL)			
		不經增菌直接接種	經 GBS Carrot broth 增菌 (隔夜增菌) 後接種	增菌 vs. 不增菌的 偵測極限差異倍數	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10^4	β/γ GBS detection agar	10^4	0.1	10^4
		GBS carrot agar	10^3	10	10^3
	10^3	β/γ GBS detection agar	10^4	1	10^4
		GBS carrot agar	10^3	10	10
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10^4	β/γ GBS detection agar	10^3	10^3	1
		GBS carrot agar	10^3	10^3	1
	10^3	β/γ GBS detection agar	10^3	10^3	10
		GBS carrot agar	10^3	10^3	10
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10^4	β/γ GBS detection agar	10^3	10^3	10
		GBS carrot agar	10^3	10^3	10
	10^3	β/γ GBS detection agar	10^3	10^3	10
		GBS carrot agar	10^4	10^3	10^3
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	10^4	β/γ GBS detection agar	10^4	10^3	10^3
		GBS carrot agar	10^3	10^3	10
	10^3	β/γ GBS detection agar	10^3	10^3	10
		GBS carrot agar	10^3	10^3	10
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	10^4	β/γ GBS detection agar	10^3	10	10^3
		GBS carrot agar	10^3	10	10^4
	10^3	β/γ GBS detection agar	10^4	10	10^3
		GBS carrot agar	10^4	10	10^3

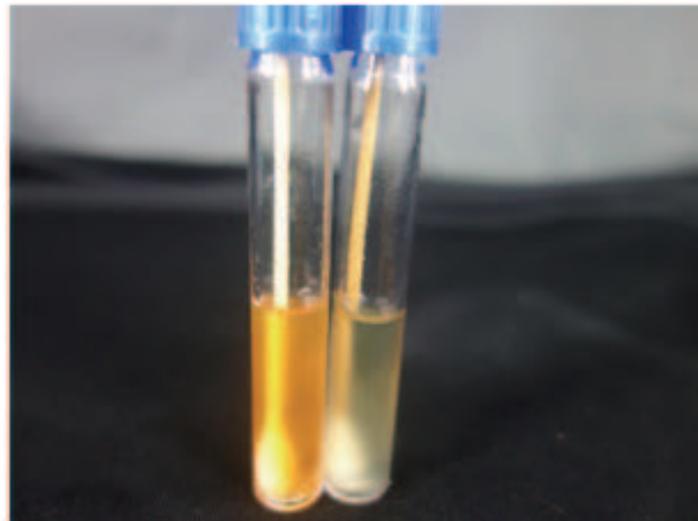


圖 1. GBS carrot broth 接種 B 群鏈球菌 β -溶血株的呈色情況，GBS 呈胡蘿蔔色 (左)，非 GBS 則不呈色 (右)。

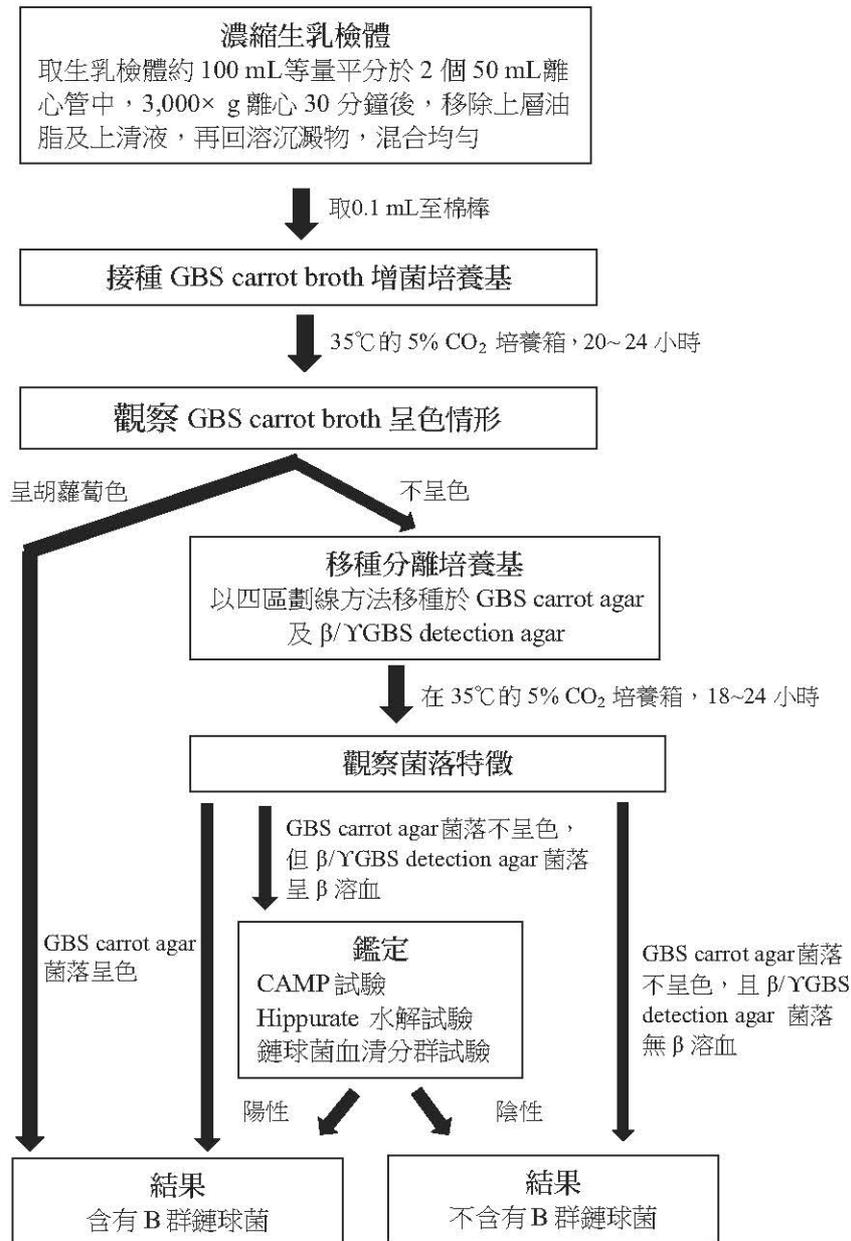


圖 2. 建議從生乳檢體偵測 GBS 的方法。

48 小時有更好的效果，但影響報告時間。

目前市面上已有 **StrepB carrot broth** 及 **GBS Detect™ agar** (Hardy Diagnostics, USA) 用於臨床懷孕婦女產前 GBS 檢查，但尚未有應用於生乳中 GBS 的檢測報告。另外，**StrepB carrot broth** 在接種檢體時，需同時加入「加

強顯色紙條」^[16]，增加檢驗室成本與人力，而 **GBS Detect™ agar** 有高偽陽性(58%)的缺點^[17]。

基於上述結果，吾等提出檢測生乳中 GBS 的建議流程(圖 2)，即將約 100 mL 生乳檢體進行離心後，將沉澱回溶液接種 GBS

carrot broth，經隔夜（約 24 小時）增菌後，若 broth 呈胡蘿蔔色則直接報告為 GBS 陽性；若不呈色，則同時接種 β/γ GBS detection agar 及 GBS carrot agar（或配製成 biplate），隔夜培養後判讀，可達到快速且正確地偵測出生乳中 GBS β -及 γ -溶血型株。

參考文獻

1. Yu HW, Lin HC, Yang PH *et al.* Group B streptococcal infection in Taiwan: maternal colonization and neonatal infection. *Pediatr Neonatol* 2011; 52:190-5
2. 行政院農業委員會家畜衛生試驗所 動物疾病資料庫網站 <http://disease.nvri.gov.tw/diseshow.aspx?p=1158>
3. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJ *et al.* Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci* 1998; 81:411-9.
4. 莊士德。行政院農業委員會家畜衛生試驗所 獸醫科技資訊網 參考手冊 <http://vettech.nvri.gov.tw/Articles/handbook/1773.html>
5. Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 1995; 78:2366-74.
6. 杜先覺，郭鴻志，莊士德，周濟眾，費昌勇，張紹光。台灣中南部地區生乳中潛在細菌種類與藥物感受性之調查。台灣獸醫誌 2010; 36:296-304。
7. Waage S, Mork T, Roros A *et al.* Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci* 1999; 82:712-9.
8. Jennifer V, Lesley M, Stephanie S. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1-32.
9. Anthony BF, Okada DM, Hobel CJ. Epidemiology of Group B *Streptococcus*: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* 1978; 137:524-30.
10. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. 1994:327-44. Wolfe, Spain.
11. Zadoks RN, González RN, Boor KJ, Schukken, YH. Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. *J Food Protection* 2004; 7:2644-50.
12. 趙瑞龍，楊忠亮，董好德，張登欽。台灣省中部地區乳牛潛在性乳房炎的調查。中華獸醫誌 1997; 23:261-5。
13. Sawant AA, Pillai SR, Jayarao BM. Evaluation of five selective media for isolation of catalase-negative gram-positive cocci from bulk tank milk. *J Dairy Sci* 2002; 85:1127-32.
14. 鄭仕文，陳柔，沈慧珊，歐予祥，蔡文城。評估 GBS Carrot Agar 鑑別 GBS 的效能。檢驗及品保雜誌 2014; 3:85-95。
15. 蔡文城，葉卜碩，蔡偉勳，洪晟峯，王彥博，蔡岳廷，呂旭峰。CMP™ β/γ GBS Detection Agar：一種偵測 GBS γ 溶血型菌株的創新培養基。檢驗及品保雜誌 2015; 4:16-2。
16. Church DL, Heather B, Tracie L *et al.* Evaluation of StrepB carrot broth versus Lim broth for detection of group B streptococcus colonization status of near-term pregnant women. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2730-2.
17. 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. http://www.hardydiagnostics.com/pdf/sc_posters/gbs_detect_poster_c135.pdf

Establishing an Optimal Diagnostic Method for the Isolation of Group B *Streptococcus* from Raw Milk

Pu-Shuo Yeh¹, Yuen-Ting Tsai^{2,3}, Wen-cherng Tsai^{2,4*}

¹Department of Life Sciences, National Central University, Taoyuan City ; ²Super Laboratory Co. Ltd., New Taipei City ; ³Timing Medical Laboratory, New Taipei City ; ⁴Immunology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) can cause not only septicemia in humans, but also bovine mastitis. In the past, the microbiological diagnosis of bovine mastitis was conducted by inoculating raw milk from the cow being tested directly onto a blood agar plate (BAP) or Columbia CNA agar. If the colonies thus grown were suspected of being GBS, the traditional identification scheme was then used for GBS detection. However, this approach not only yields a low GBS isolation rate, but is also laborious and time-consuming. We therefore modified the diagnostic method used for isolating GBS from pregnant women so that it could be used in the isolation of GBS from raw milk. Two types of simulated raw milk specimens were prepared, one containing pure GBS and another containing mixed culture (more specifically, GBS and one of the other five mastitis-causing pathogens). In testing a given specimen, about 100 mL of the simulated raw milk specimen was collected and centrifuged, after which the precipitate thus obtained was then re-dissolved and used to inoculate a tube of enrichment medium, GBS carrot broth. After enrichment for different periods of time (18, 24 and 48 hours), the broths were then sub-cultured to two kinds of selective/differential plated media, GBS carrot agar and β/γ GBS detection agar. The efficiencies of GBS carrot broth, GBS carrot agar and β/γ GBS detection agar were evaluated with either direct inoculation or after enrichment overnight. For the specimens containing the pure GBS culture,

the results indicated that for the GBS carrot broth inoculated after the enrichment of individual specimens for 18, 24 and 48 hours individually, the detection limits (defined as the lowest GBS concentration that resulted in the carrot-pigmented formation in the test tube, i.e. GBS positive) were 10^2 , 10, and 1 CFU, respectively, whereas for the specimens inoculated with mixed culture, the detection limits were $10^3\sim 10^6$, $10\sim 10^4$, and $1\sim 10^2$ CFU. When GBS carrot agar and β/γ GBS detection agar were directly inoculated or inoculated after overnight enrichment, their detection limits were the same, 10 CFU. As regards the inoculation with mixed bacteria, the detection limits were better after the overnight enrichment rather than with direct inoculation (the detection limits were reduced by about $10\sim 10^6$ times). Based on the above findings, we propose that a laboratory can use about 100 ml of raw milk as a specimen for centrifugation, after which the precipitate obtained can then be re-dissolved and used to inoculate a tube of GBS carrot broth. After 20-24 hours of enrichment, direct interpretation of the GBS carrot broth can be made and, if necessary, the broth could be further subcultured onto GBS carrot agar and β/γ GBS detection agar, which can be produced with a bi-plate. This approach will yield rapid and effective detection of GBS from raw milk.

Keywords: Group B *Streptococcus*, raw milk, GBS carrot broth, optimal diagnostic method