

CAMP 試驗鑑定乙型鏈球菌的影響因素

黃軒旻¹，蔡偉勳²，蔡文城^{2,3*}

¹慈濟大學醫學檢驗技術學系，花蓮市；²台美檢驗科技有限公司，新北市；³國立陽明大學微免科所，台北市，台灣

摘要

乙型鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*, B群鏈球菌, GBS)可引起新生兒敗血症、腦膜炎與肺炎，也可引起產婦肺炎及敗血症，因此產前檢查GBS將有助於預防新生兒及產婦感染。GBS的鑑定方法中以CAMP試驗最常操作，但其試驗結果常受到各種因素影響，若稍不小心即容易發生偽陽性。本研究模擬CAMP試驗的各種可能影響因素進行評估，結果指出CAMP試驗最理想的操作方法為(i)測試菌與產生 β -lysin的*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, 金黃色葡萄球菌) 接種距離以5~7 mm左右為最佳；(ii)測試的BAP(血平板)培養基厚度為3~4 mm以及不能太乾或濕度太高；(iii)測試BAP的培養環境，若在一般培養箱，其判讀時間為18~24小時，但若在5% CO₂培養箱則需在5~6小時判讀，若呈陰性則在一般培養箱繼續培養18~24小時；(iv)接種後的BAP置放室溫過久再培養於35°C，將會因冷熱交替而促進溶血反應，可能導致偽陽性以及(v)必須包括化膿性鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*, GAS)標準株作為陰性對照，因其為最容易產生偽陽性的菌種。基於上述發現，吾等認為利用CAMP試驗鑑定GBS時，檢驗人員必須熟悉GAS及GBS菌落特徵的差異以及配合其它必要的鑑定試驗(如bacitracin及/或SXT感受性、PYR試驗等)，以免發生錯誤。

關鍵字：B群鏈球菌、乙型鏈球菌、CAMP試驗、各種影響因素

前言

乙型鏈球菌(Group B *Streptococcus*; GBS; 學名*Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, B群鏈球菌)為革蘭氏陽性球菌，可在腸胃道、生殖泌尿道及口咽中發現，是嬰兒出生前後感染及死亡的重要原因^[1-3]。1970年代，新生兒感染乙型鏈球菌的致死率高達50%^[4-5]，引起全球醫界的關注。國際上採取的對策是對孕婦全面進行乙型鏈球菌培養篩檢，並予檢驗陽性者預防性抗生素治療^[6]。根據美國疾病管制局(CDC)^[7,8]及台灣國健署^[9]的

建議，懷孕35-37週的婦女應做全面性的篩檢，可有效降低新生兒感染率。公告檢測方法為以棉拭在陰道及/或直腸末端約2~3 cm深度採檢後，接種於Lim broth或carrot broth中培養，18~24小時後將Lim broth或沒顯色的carrot broth再接種到BAP (blood agar plate, 血平板) 或其它適當平板培養基，隨後置於35°C CO₂培養箱培養，18~24小時後觀察生長菌落之形態。若發現疑似GBS菌落則操作CAMP試驗、hippurate水解試驗或鏈球菌血清分型乳膠凝集試驗，並發出最終報告。

在臨床微生物檢驗室，GBS的鑑定方法中以CAMP試驗最常操作，此係因為操作簡易、成本低、所需使用的培養基BAP與 β -lysin產生菌(*Staphylococcus aureus*)容易取

*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: wct sai@superlab.com.tw

得以及陽性結果呈現弓箭型加強溶血而容易觀察的緣故；但 CAMP 試驗也容易受到各種試驗條件的影響而造成偽陽性或偽陰性的結果，為了解 CAMP 的試驗過程中可能遇到的情況，本研究設計不同厚度、乾溼度的測試培養基、不同培養環境及不同劃線距離對 CAMP 試驗所造成的影響。

材料及方法

試驗菌株

本研究自台美醫事檢驗所(新北市，台灣)隨機選取兩株臨床產前檢查分離的GBS做為測試菌株。另外，*Streptococcus pyogenes* (化膿鏈球菌，ATCC 19615)、*Staphylococcus aureus* (金黃色葡萄球菌，ATCC 25923)與*Streptococcus agalactiae* (乙型鏈球菌，ATCC 12386)標準菌株皆是購自美國菌種保存中心(ATCC)的授權公司MicroBioLogicals公司(MBL，加拿大)。菌種皆保存於-70°C冷凍中的GermBank菌種保存裝置(啟新，台灣)，試驗前移種BAP三次確保其活性及純菌。

CAMP 試驗^[10-12]

CAMP 試驗的操作以含有綿羊血的BAP作為接種培養基。在進試驗前，將BAP先回溫至35°C，並保持BAP表面的乾燥；待測菌株係培養18~24小時後新鮮分離的鏈球菌純菌株。試驗方式為在BAP平板的正中央上先劃種一條*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)的生長菌，然後垂直接種兩個臨床試驗菌株，長度約3~4 cm；兩菌的直角交界處不可直接碰觸到*S. aureus*的劃線處；一個平板的接種至多可同時接種4個待測株，中央線左右各兩株；然後將接種後的BAP置於35°C一般培養箱培養18~24小時；測試的同時，亦接種陽性(*S. agalactiae*，ATCC 12386)及陰性(*S. pyogenes*，ATCC 19615)對照組。測試試驗採雙重覆。

CAMP 試驗結果的各種影響因素評估

兩菌間的不同距離：與*S. aureus*垂直接種的試驗株兩者間距離包括2~3 mm、5~7 mm與10~12 mm。

不同菌株：包括兩株臨床GBS菌株及一株標準菌株(*S. agalactiae*，ATCC 12386)。

培養基狀況

不同厚度：接種的BAP厚度分別為2.0 mm、3~4 mm與5.0 mm。

不同乾濕度：包括接種的BAP預先在無菌操作台上半開、倒置吹乾兩小時以及與不經處理的BAP。

冷熱處理：一組測試的BAP接種後放在室溫5~6小時，然後放入35°C一般培養箱。

不同培養環境：接種的BAP分別培養在35°C的一般培養箱、CO₂培養箱與厭氧培養箱，另外亦將一組BAP接種後置於室溫5~6小時，判讀後再置入35°C一般培養箱。

結果

利用不同的測試條件：不同菌株、接種距離、接種培養基的厚度、乾溼度、培養環境及測試培養基培養前的溫度處理分別操作CAMP試驗，然後與標準操作方法^[10-12]比較，結果顯示兩株臨床菌株間的加強溶血圈大小在某些培養狀況下會因菌株而異；與*S. aureus*垂直接種的距離在2~3 mm時，測試菌所呈現的箭頭狀溶血會和*S. aureus*的溶血圈交會；當兩菌的垂直距離在10~12 mm時，測試菌的溶血圈較小，陰性對照菌(*S. pyogenes*)也不會出現溶血圈；但兩菌垂直距離5~7 mm時所顯示的GBS測試菌加強溶血圈大小最為適中，且容易區分陽性及陰性對照菌的溶血圈。

在不同厚度的BAP中，厚度2.0 mm的BAP平板較為透明，厚度5.0 mm的BAP顏色較深，雖然均不影響CAMP試驗判讀的準確性，但以3~4 mm厚度的BAP判讀效果最

佳。將接種完成的BAP置於厭氧箱培養18~24小時，所生成的測試菌落其溶血圈相當明顯，但陰性對照亦出現加強溶血圈；反之，在一般培養箱培養18~24小時後其中一臨床株產生的溶血圈與陰性對照者相同大小（圖1B）。本研究發現將BAP置於室溫5~6小時再置入35°C的培養箱，測試的GBS呈現箭頭型加強溶血現象（圖1A）；當測試的BAP較乾燥時，陽性對照菌(*S. agalactiae*)的加強溶血圈會變小，但同樣地陰性對照菌的溶血圈也變小，顯示些微的乾燥並不影響CAMP試驗結果的判讀。若接種後的BAP沒有立即置於35°C一般培養箱而放在室溫5~6小時再行定溫培養，則測試菌、陰性與陽性對照的加強溶血圈大小皆會增大。

總之，CAMP試驗以3~4 mm厚度且乾濕度適當的BAP，臨床試驗株與*S. aureus*之垂直接種距離為5~7 mm為最佳，先將BAP

培養在35°C 5% CO₂培養箱5~6小時後進行判讀，若測試菌呈陰性，再置放於35°C一般培養箱，18~24小時後再判讀的方式最適合臨床檢驗室使用。

討 論

CAMP試驗最早在1944年由Christie, Atkins, and Munch-Peterson等人發現可用於鑑定GBS，根據其等的建議，試驗的進行只能在含有綿羊血或牛血（而非含人血、馬血或兔血）的BAP^[13]。在進行實驗前，接種的BAP必須先回溫至35°C，以免溫度的冷熱變化而加強溶血的產生，且必須保持BAP表面的乾燥，若太潮濕則接種的生長菌可能在BAP的平板上擴散^[14]；另外，待測菌株需要為培養18~24小時後新鮮分離的鏈球菌純菌株^[15]。試驗方式為在BAP平板的正中央上先劃種一條*S. aureus* (ATCC 25923)的生長菌，

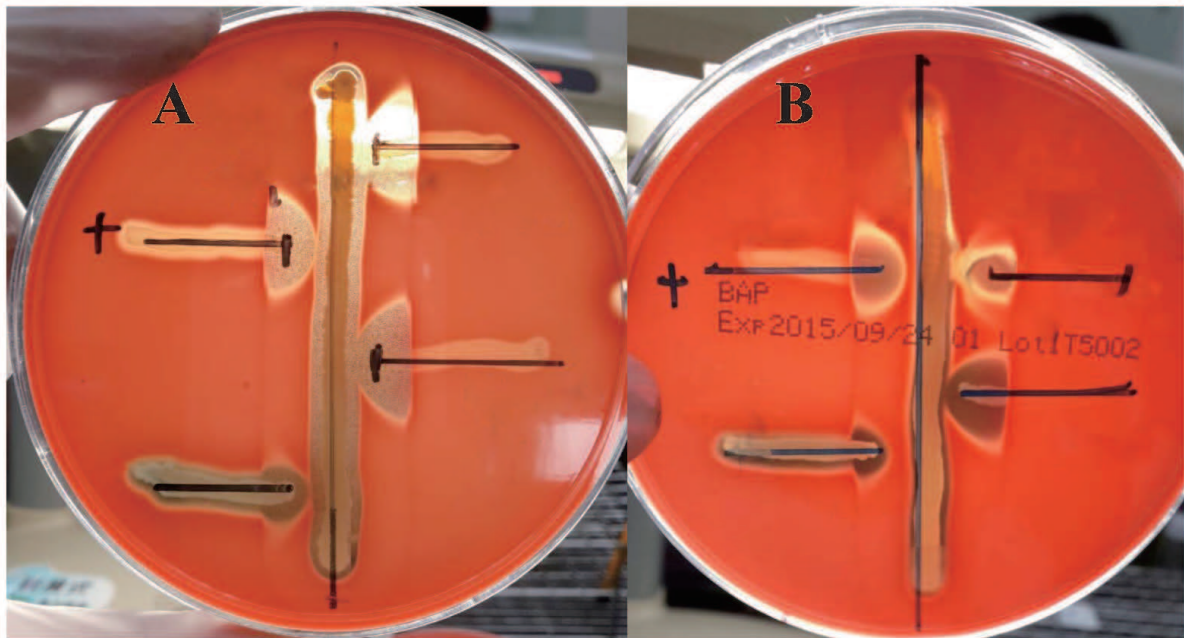


圖 1. CAMP 試驗結果與 BAP 平板培養環境的相關性。若先放在室溫環境5~6小時，再培養於一般培養箱18小時，兩株 GBS 臨床株皆顯示清楚的陽性，陰性對照也因冷熱溶血而出現小型加強溶血（圖 A 的左下接種菌）；而培養於35°C一般培養箱的一個臨床株（圖 B 的右上接種菌）所呈現的陽性溶血圈大小顯示與陰性對照者相近（圖 B 的左下品管菌）。

然後垂直接種兩種試驗菌株，兩菌的直角交界處不可直接碰觸到 *S. aureus* 的劃線處；一個平板的接種至多可同時接種 4 個待測株，方式為中央線左右各兩株。若欲提早觀察結果，則可將 BAP 置於 35°C CO₂ 培養箱中培養，5~6 小時後觀察是否有箭頭型加強溶血現象，若有加強溶血則表示為陽性，若無，則移至一般培養箱持續培養 18 小時，然後觀察結果^[14, 15]。為確保實驗的正確性，測試的同時，需操作陽性 (*S. agalactiae*, ATCC 12386) 及陰性 (*S. pyogenes*, ATCC 19615) 對照組。

CAMP 試驗的結果出現加強溶血現象係因為β溶血型鏈球菌具有產生 CAMP 因子 (factor) 的能力，該因子會與 *S. aureus* 產生的β溶血素 (β-hemolysin, β-lysin) 發生加強溶血現象而呈火箭頭型或圓型^[16]。除了 *S. aureus* 外，*Staphylococcus pseudintermedius* 亦會產生的β溶血素而可用於 CAMP 試驗^[17]。

過去有關鑑定 GBS 的 CAMP 試驗的影響因素雖然有許多研究報告^[13, 14, 18, 19]，然而垂直接種的試驗菌與β-lysin 產生菌 (*S. aureus*) 直角接種交界處的距離皆無涉及，本研究發現兩菌的垂直距離以 5~7 mm 為最佳。另外，接種測試菌後 BAP 的培養環境也有不同的建議方法，檢驗室最常應用的培養環境為將接種後的 BAP 過夜 (18~24 小時) 培養在 35°C 的一般培養箱^[10-12]；另一方法為先培養在 35°C 的蠟燭缸或 CO₂ 培養箱 5~6 小時，若出現加強溶血圈則為 CAMP 陽性，可立即提出 GBS 陽性報告；若呈陰性則繼續培養 18 小時後觀察^[14]。本實驗證實後者的方法可提早發出 GBS 的陽性報告。

一般檢驗室常操作 CAMP 試驗後將 BAP 放在室溫一陣子再置入一般 35°C 培養箱培養，本研究發現此方式會因冷熱交替而加強 BAP 內綿羊血所含紅血球的溶血反應，陰性對照菌亦是如此，因此 BAP 置於溫室過久可

能干擾 CAMP 試驗的判讀。

雖然 CAMP 試驗最被推薦的方式為將接種後的 BAP 置於一般培養箱中培養 18~24 小時^[12-14]，但本實驗發現採用一般培養箱培養，其中一株臨床株的溶血圈不易與陰性對照區分，因測試菌數目過少，無法判斷其是否為最佳方式。

在操作 CAMP 試驗時發現所有的陰性對照組 (*S. pyogenes*) 也出現小型加強溶血圈的現象，此係因為 *S. pyogenes* 會產生 streptolysin O，與 *S. aureus* 所產生的β-lysin 發生加強溶血之故，導致偽陽性的產生^[16]，惟與 *S. aureus* 垂直距離 10~12 mm 時，因距離較遠而沒有出現加強溶血圈。

Darling 的研究^[14]指出，進行 CAMP 試驗時，接種 GBS 後的 BAP 培養於蠟燭缸或厭氧環境，5~6 小時後的 GBS 即能出現加強溶血圈，而培養於一般培養箱 18 小時後 GBS 也有同樣的發現；其中培養於厭氧環境，GBS 的溶血圈為 GAS 的兩倍大，但根據本實驗觀察，GAS 不論在有氧或厭氧環境皆會產生加強溶血現象，但溶血圈比 GBS 小，因此 CAMP 試驗必須以 GAS 作為陰性對照。本實驗結果指出若陰性對照出現小型溶血圈，則測試菌的溶血圈必須大於陰性對照菌者才能判斷為 CAMP 陽性。

GBS 雖然有許多鑑定方法，然而 CAMP 試驗被認為是操作最簡易、最快能得到結果的試驗之一，但其特異性僅為 77.5% (31/40)^[20]，若發現測試的結果不明確，必須加做馬尿酸水解 (hippurate hydrolysis) 或血清分型試驗，通常 CAMP 試驗不需與馬尿酸水解試驗同時操作 (選擇其中之一即可)^[21]。CAMP 試驗、馬尿酸水解試驗及鏈球菌血清分群試驗鑑定 GBS 各有其優缺點，最近上市的 GBS-ID carrot broth (啟新，新北市) 可做為正確且快速篩選 GBS 的工具 (特異性 100%，敏感性 98.3%)，其效能優於 CAMP 及馬尿酸

水解試驗，且成本低於血清分群試驗^[20]。

有鑑於少數 GAS 會呈現 CAMP 試驗偽陽性，且 GBS 的一些 γ -溶血株不會在 CAMP 試驗時呈現加強溶血反應^[22,23]，因此單獨操作試驗菌的 CAMP 試驗僅能當作 GBS 的假設性鑑定，故操作 CAMP 試驗時，必須同時操作 bacitracin 感受性鑑定試驗將更能將 GBS 與其 GAS 或其它鏈球菌區分^[18]。另外，也要配合菌落形態及其它試驗如 PYR 等，方能確保檢測的正確性。

參考文獻

1. 衛生福利部國民健康署孕婦乙型鏈球菌篩檢 <http://www.hpa.gov.tw/BHPNet/Web/HealthTopic/Topic.aspx?id=201207050001>
2. Paoletti LC, Kasper DL. Glycoconjugate vaccines to prevent group B streptococcal infections. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3:975-84.
3. Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A. Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults: a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* 2008; 36:100-11.
4. 衛生福利部國民健康署 孕婦關懷網站 <http://mammy.hpa.gov.tw/kbcontent.asp?f=atmk&cid=504>
5. Schuchat A. Group B *Streptococcus*. *Lancet* 1999; 353: 51-6.
6. Chen VL, Kasper DL. Interactions between the intestinal microbiota and innate lymphoid cells. *Gut Microbes* 2014; 5:129-40.
7. CDC website: www.cdc.gov/groupbstrep/lab
8. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1-36.
9. 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。
10. Forbes BA, Sahm DF, Welssfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed., 2002:265. Mosby, St Louis, Missouri.
11. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed., 2015:383-402. ASM press, Washington DC, USA
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM *et al.* *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed., 2006: 1468. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
13. Christie K, Atkins NE, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1944; 22:197-200.
14. Darling CL. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. *J Clin Microbiol*. 1975; 1:171-4.
15. MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. 2000:35-56. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
16. Tapsall JW, Phillips EA. *Streptococcus pyogenes* streptolysin O as a cause of false-positive CAMP reactions. *J Clin Microbiol* 1984; 19:534-7.
17. Savini V, Paparella A, Serio A, Marrollo R, Carretto E, Fazii P. *Staphylococcus pseudintermedius* for CAMP-test. *Internat J Clin Experi Pathol* 2014; 7:1733-4.
18. Gubash SM. Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin-producing *Clostridium perfringens* and streptococcal grouping. *J Clin Microbiol* 1978; 8:480-8.
19. Wilsono HW. CAMP-disk test for presumptive identification of group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 1977; 6:42-5.
20. 陳柔、鄭仕雯、蔡文城。比較 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解與 CAMP 試驗鑑定 B 群鏈球菌的效能。檢驗及品保雜誌 2014; 3:147~52。
21. Nsagha DS, Bello CS, Kandakai-Olukemi YT. Hippurate hydrolysis and Christie, Atkins, Munch-Peterson tests as epidemiological diagnostic tools for *Streptococcus agalactiae* carriage in pregnancy. *East Afr Med J* 2000; 77:34-6.
22. Butter MNW, DeMoor CE. *Streptococcus agalactiae* as a cause of meningitis in the newborn, and of bacteraemia in adults. Differentiation of human and animal varieties. *Antonie van Leeuwenhoek* 1967; 33:439-50.
23. Romero R, Wilkinson HW. Identification of group B streptococci by immunofluorescence staining. *Appl Microbiol* 1974; 28:199-204.

An Examination of Factors Affecting CAMP Tests Used for the Identification of *Streptococcus agalactiae*

Huang Hsuan Min¹, Wei-Shiun Tsai², Wen-cherng Tsai^{2,3*}

¹Department of Medical Technology, Tzu Chi University, Hualien ; ²Super Laboratory Co. Ltd., New Taipei City ;

³Institute of Microbiology and Immunology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

Streptococcus agalactiae, Group B *Streptococcus* (GBS), can cause septicemia, meningitis, and pneumonia in newborns as well as pneumonia and septicemia in new mothers in the postpartum period. Therefore, testing pregnant women for GBS could prevent related infections both during pregnancy and following delivery. The Christie, Atkins, and Munch-Peterson (CAMP) test is one of the most common methods used for GBS identification; however, the results can be influenced by various factors. This study will simulate these factors and evaluate their potential for interfering with the test results. The results of the study indicated that the optimal procedure for the CAMP test involves (i) an inoculation distance between the test organism and β -lysin-producing *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) of around 5-7 mm; (ii) a thickness of 3~4 mm blood agar plate (BAP) in which is neither too dry nor too wet; and (iii) an adequate incubation environment for the BAP with an ambient incubator, the interpretation time is fixed at 18~24 h after incubation. However, if test results

are negative after 5-6 h in a 5% CO₂ incubator, the BAP should be further incubated for 18-24 h. Furthermore, (iv) if the inoculated BAP is left at room temperature for too long before it is incubated at 35°C, hemolysis may be enhanced, creating a false-positive reaction due to the hot-cold lysis. Lastly, (v) the test must include *Streptococcus pyogenes*, Group A *Streptococcus* (GAS), as a negative control, as it commonly causes a false-positive CAMP reaction. Based on the above findings, we believe it is important to understand the differences in colony morphology between GAS and GBS and to utilize the combined results of other necessary test methods (e.g. bacitracin susceptibility, sulfamethoxazole-trimethoprim susceptibility, and the pyrrolidonyl arylamidase test) to avoid the misidentification of GBS.

Keywords: Optimal procedure for the CAMP test, Group B *Streptococcus* (GBS) identification, Adequate incubation environment.