

凝固酶陰性葡萄狀球菌之研究

I. 衣魚蟲, 蟑螂及蒼蠅等昆蟲來源葡萄狀球菌之探討

曾金章 吳寬輝 詹湧泉*

昆蟲腸管獲得之葡萄狀球菌其分離率是衣魚蟲 73.2%, 蟑螂 59.2% 及蒼蠅 70.7%。由其保菌率 (67.2%) 來看, 本菌可能是昆蟲腸道之正常菌叢之一, 而且絕大部份是凝固酶陰性株。本菌是衣魚蟲最主要的腸內細菌菌叢之一, 而蟑螂及蒼蠅尚寄生其他革蘭氏陰性桿菌。

衣魚蟲來源株之生物學性狀較為一致, 而蟑螂及蒼蠅來源株則較參差不齊。衣魚蟲來源株 81.7%, 蟑螂來源株 66.7% 及蒼蠅來源株 87.7% 均能產生 orange 或 lemon yellow 色素。去氧核糖核酸酶之產生以蒼蠅來源之 42 株 (36.8%) 最多, 其次是蟑螂來源株之 19 株 (18.1%) 而以衣魚蟲來源之 1 株 (0.9%) 最少。Esculin hydrolysis (衣魚蟲來源株 87.0%, 蟑螂來源株 40.0% 及蒼蠅來源株 67.5%) 及溶菌酶產生 (衣魚蟲來源株 96.5%, 蟑螂來源株 61.0% 及蒼蠅來源株 29.8%) 在一般凝固酶陰性葡萄狀球菌之生物學性狀中是較為特別的性狀。332 株昆蟲來源凝固酶陰性菌株 90.4% 在需氧情況下可以氧化 mannitol, 厭氧條件下 90.7% 亦可發酵 mannitol, 但對 mannitol 之利用較凝固酶陽性株緩慢及微弱。

昆蟲來源株對 penicillin 及 kanamycin 全部呈現感受性, 對 leucomycin 僅蒼蠅來源 4 株發生耐性, 而對其他藥物之耐性百分率如下: (1) 對 chloramphenicol 衣魚蟲來源株 24.3%, 蟑螂來源株 8.5% 及蒼蠅來源株 17.5%; (2) 對 erythromycin 衣魚蟲來源株 1.7%, 蟑螂來源株 12.4% 及蒼蠅來源株 9.6%; (3) 對 streptomycin 衣魚蟲來源株 43.5%, 蟑螂來源株 20.0% 及蒼蠅來源株 13.2% 及 (4) 對 oxytetracycline 衣魚蟲來源株 44.3%, 蟑螂來源株 47.6% 及蒼蠅來源株 21.9%。全部衣魚蟲來源株 64.3%, 蟑螂來源株 50.5% 及蒼蠅來源株 32.5% 對五種抗生素發生耐性, 其中產生單劑及雙劑耐性者各佔 21.3%; 參劑耐性者 4.8%; 肆劑耐性者 0.6% 及伍劑耐性者佔 1.2%。

以去氧核糖核酸酶及 esculin 之分解能力把昆蟲來源葡萄狀球菌分成四羣, 第一羣是去氧核糖核酸酶及 esculin 分解陽性羣, 第二羣是去氧核糖核酸酶陽性而 esculin 分解陰性羣, 第三羣是去氧核糖核酸酶陰性而 esculin 分解陽性羣, 第四羣是去氧核糖核酸酶及 esculin 分解兩者陰性羣, 其中第一羣被試菌株中對小白鼠大都具較高之毒力 (60%~100% 之死亡率), 而其他各羣中除蒼蠅來源株及人類來源株之 H-55, 99 及 126 株顯現強毒力外, 被試菌株似乎是較不具病原性之生物羣其死亡率約在 0%~40% 之間。

在 serum soft medium 之生長情形, 其中第一及第二羣都產生正常的 diffuse colony, 而三及四羣則部份菌株產生針頭樣之菌落。

由它們的生物學性狀, 對抗生素之反應及對小白鼠之毒力等加以分析, 昆蟲來源株與人類來源凝固酶陰性株之間頗為相似。由於這些昆蟲與人類生活環境接觸之頻繁, 由其腸管排泄物而污染於居室四週不無可能, 所以昆蟲保有之葡萄狀球菌可能是人類葡萄狀球菌感染症來源之一。尤其關於腸毒素中毒 (Enterotoxin intoxication) 之可能性現正試驗中。

Key words: *Staphylococci of insect origin, Coagulase-negative staphylococci.*

自抗生素大量應世以來, 葡萄狀球菌在疾病之病原上佔着相當重要的地位。由於它的生物學性狀較複雜故除產生木蜜醇酶 (mannitol fermenting enzyme), 凝固酶 (coagulase), 去氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease; DNase) 及溶菌酶 (lysozyme) 之病原性標準金黃色葡萄狀球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及木蜜醇酶, 凝固酶, 去氧核糖核酸酶及溶菌酶等陰性之非病原性表皮葡萄狀球菌 (*Staph-*

lococcus epidermidis)⁽¹⁾ 以外, 尚存在着羣對木蜜醇酶, 凝固酶, 去氧核糖核酸酶及溶菌酶等等生物學性狀很不一致而具有病原性之菌株, 它們常是引起敗血症⁽²⁾, 小孩感染症⁽³⁾ 及其他慢性炎症的原因菌⁽⁴⁻⁶⁾, 此羣生物學性狀不一致但具有病原性之葡萄狀球菌之特性、來源及如何檢定, 擬加以連續地探討。

以往對葡萄狀球菌之研究, 似乎都取材自人類及動物來源之葡萄狀球菌⁽⁷⁻¹³⁾。作者把

臺北醫學院微生物學科

* 目前住址: 臺北市南港區預防醫學研究所

民國 64 年 8 月 12 日受理

取自與人類生活環境較有密切關係之昆蟲如衣魚蟲(*Lepisma saccharina* L.)，蟑螂(*Blatta orientalis* L.)及蒼蠅(*Lucilia caesar* L. 及 *Musca domestica* L.)等腸管內之葡萄狀球菌，加以分析及探討其生物學性狀，對抗生物質之反應及對小白鼠之毒力等。並與人類來源葡萄狀球菌加以對照比較。

材料及方法

(一)菌種：

昆蟲來源葡萄狀球菌之分離：得自儲藏室廚房內或市場附近之衣魚蟲，蟑螂及蒼蠅先以 acetone 處理後再以 70% 酒精清洗消毒，最後再以 acetone 處理陰乾之。以無菌操作法採取蟲體之腸內容物，直接塗佈於 nutrient agar (Difco) 及 mannitol salt agar media (Difco) 後置於 37°C 恒溫箱培養 24~48 小時後，依其菌落之形態、色澤及 mannitol 發酵之情形等選出不同的可疑菌落，再純化後以 Grams stain 證實之，然後保存於 nutrient agar slant (Difco) 備用。人類來源葡萄狀球菌仍保存於本科室者包括凝固酶陽性 133 株及陰性 56 株。本試驗所使用之試驗菌株仍全部接種於 heart infusion medium (Difco) 之 18 小時新鮮菌株。

(二)生物學性狀：

生物學性狀之檢查包括凝固酶(試管法)⁽¹⁴⁾ 木蜜醇酶^(13,15)；去氧核糖核酸酶(DNase)⁽¹⁶⁾；溶菌酶⁽¹⁷⁾； α 及 β 溶血素 (α - & β -hemolysins)⁽¹⁸⁾；明膠液化酶 (gelatinase)⁽¹⁴⁾；酚酞磷酸酯酶 (phenolphthalein-phosphatase)⁽¹⁸⁾；蛋白分解酶 (protease)⁽¹³⁾；亞磷酸酯酶 (lecithinase)⁽¹⁴⁾；解脂酶 (lipase)⁽¹³⁾；及纖維蛋白分解酶 (fibrinolysin)⁽¹³⁾ 等細胞外產物，及石蕊牛乳 (litmus milk) 之消化⁽¹⁶⁾；硝酸鹽還元 (nitrate reduction)⁽¹⁴⁾ 及色素產生 (pigmentation)^(13,19) 等生物學性狀。並測定對澱粉 (potato starch)⁽¹³⁾；Voges-Proskauer⁽¹⁴⁾；精氨酸 (arginine)⁽¹⁹⁾ 及 esculin⁽²⁰⁾ 等之加水分解。

(三)藥劑感受性試驗：

以平板稀釋法 (plate dilution method) 行之。已加倍稀釋之不同濃度之抗生素定量加入于已滅菌而保持 45°C 之定量 heart infusion agar (Difco) 之中，混合均勻後做成平板，經 24 小時培養後觀察其生長情形。結果以最小發育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration) 之 ug/ml 或 u/ml 表示之。使用之抗生素是 penicilline (PC)；dihydrost-

reptomycin (SM)；chloramphenicol (CM)；oxytetracycline (TC)；erythromycin (EM)；kanamycin (KM) 及 leucomycin (LM) 等。

(四) Serum soft medium 之應用⁽²¹⁾：

25%(V/V) 的健康家兔血清加入於 0.5% agar (Difco) 的 heart infusion broth (Difco)，然後觀察葡萄狀球菌在此培養基產生菌落之形態。

(五)對小白鼠毒性之分析：

試驗菌株仍任意在各生物羣 (Group I 是 DNase 及 esculin 陽性者，II 是 DNase 陽性但 esculin 陰性者，III 是 DNase 陰性但 esculin 陽性及 IV 是 DNase 及 esculin 兩者陰性羣) 選擇之，然後接種於 heart infusion agar (Difco) 經 37°C 培養後，以生理食鹽水清洗遠心沉澱後以 2% 之 mucin solution (Difco) 做成約 12×10^8 /ml (MacFanland nephelometer standard No. 4)^(22,23) 之細菌懸濁液，各取 0.5ml 注射於體重約 20 克之小白鼠腹腔內，每一被試菌株注射 5 隻小白鼠經 2 星期之觀察。死亡之小白鼠加以剖檢並由心血培養證明是否是由於被試菌株所引起之敗血症而死亡。

結 果

昆蟲葡萄狀球菌之分離 (如表 1)：衣魚蟲 123 隻，蟑螂 130 隻及蒼蠅 82 隻各別之陽性分離數是 90 隻 (73.2%)，77 隻 (59.2%) 及 58 隻 (70.7%)。由昆蟲腸管獲得之檢體直接塗佈於 nutrient agar 及 mannitol salt agar media 後，衣魚蟲之腸內容物培養於 nutrient agar medium 者幾乎都是純粹的葡萄狀球菌但蟑螂及蒼蠅則尚保有其他革蘭氏陰性桿菌。

表 1 昆蟲腸管之葡萄狀球菌之保菌情形
Table 1. Isolation of Staphylococci from Insect Intestine

Insect	No. tested	No. of positive* (%)	No. of isolated strains
Silverfishes	123	90 (73.2)	115
Cockroaches	130	77 (59.2)	105
Flies	82	58 (70.7)	114
Total numbers	335	225 (67.2)	334

*: Number of insect from which staphylococci have been isolated.

生物學性狀(如表2):衣魚蟲來源之生物學性狀較為一致,蟑螂及蒼蠅來源株則較參差不齊,昆蟲來源之二株凝固酶陽性株和人類來源之凝固酶陽性株一樣,對DNase, lysozyme, fibrinolysin, lecithinase 及 α -hemolysin 等細胞外產物都呈現陽性反應。昆蟲來源之凝固酶陰性株對 lysozyme (衣魚蟲來源株 96.5%, 蟑螂來源株 61.0%及蒼蠅來源株 29.8%); phenolphthalein-phosphatase(衣魚蟲來源株 95.7%, 蟑螂來源株 73.3%及蒼蠅來源株 64.0%); mannitol fermenting enz-

yme(衣魚蟲來源株 98.3%, 蟑螂來源株 84.8%及蒼蠅來源株 96.5%); esculin hydrolysis (衣魚蟲來源株 87.0%, 蟑螂來源株 40.0%及蒼蠅來源株 67.5%); lipase (衣魚蟲來源株 61.7%, 蟑螂來源株 29.5%及蒼蠅來源株 12.3%)及 nitrate reduction (衣魚蟲來源株 91.4%, 蟑螂來源株 68.6%及蒼蠅來源株 71.1%)等生物學性狀都呈現較高之陽性率。在 skim milk 及 neopeptone agar media 上大部份之菌株產生 orange 或 lemon yellow 的色素(衣魚蟲來源株 81.7%, 蟑螂來源株 66.7%

表2 葡萄狀球菌之一般生物學性狀
Table 2. Biological Characteristics of Staphylococci

Sources Biological characteristics	Number of positive strains			
	Silverfishes (%)	Cockroaches (%)	Flies (%)	Human origin* (%)
Coagulase	0(0.0)	1(1.0)	1(0.9)	0(0.0)
DNase	1(0.9)	19(18.1)	42(36.8)	10(17.9)
Egg-yolk precipitation	0(0.0)	1(1.0)	1(0.9)	0(0.0)
Lysozyme	111(96.5)	64(61.0)	34(29.8)	14(25.0)
Phenolphthalein-phosphatase	110(95.7)	77(73.3)	73(64.0)	12(21.4)
Fibrinolysin	0(0.0)	1(1.0)	1(0.9)	0(0.0)
Mannitol salt agar	113(98.3)	89(84.8)	110(96.5)	45(80.4)
Protease	0(0.0)	29(27.6)	63(55.3)	25(44.6)
Lipase	71(61.7)	31(29.5)	14(12.3)	11(19.6)
Alpha-hemolysin	8(6.9)	16(15.2)	11(9.6)	10(17.9)
Beta-hemolysin	3(2.6)	6(5.7)	6(5.3)	8(14.3)
Nitrate reduction	105(91.4)	72(68.6)	81(71.1)	48(85.7)
Hydrolysis:				
Starch (potato)	0(0.0)	3(2.9)	3(2.7)	2(3.6)
Esculin	100(87.0)	42(40.0)	77(67.5)	11(19.6)
Arginine	4(3.5)	16(15.2)	5(4.4)	21(37.5)
Gelatine	1(0.9)	22(21.0)	63(55.3)	12(21.4)
V. P.	1(0.9)	19(18.1)	17(14.9)	26(46.4)
Pigmentation:				
Yellow	94(81.7)	70(66.7)	100(87.7)	16(28.6)
White	21(18.3)	35(33.3)	14(12.3)	40(71.4)
Litmus milk:				
Acid production	106(92.2)	48(45.7)	36(31.6)	20(35.7)
Acid clot	4(3.5)	30(28.6)	33(28.9)	7(12.5)
Peptonization	0(0.0)	12(11.4)	25(21.9)	9(16.1)
Alkaline production	5(4.3)	15(14.3)	20(17.6)	20(35.7)
No. of strains tested	115	105	114	56

*: Coagulase-negative staphylococci.

及蒼蠅來源株 87.7%)。DNase 之產生以蒼蠅來源株之 42 株 (36.8%) 最高，其次是蟑螂來源之 19 株 (18.1%) 而以衣魚蟲來源之一株 (0.9%) 最少，而人類來源凝固酶陰性株計得 10 株 (17.9%)。對 litmus milk 絕大部份菌株會產生酸 (衣魚蟲來源株 92.2%，蟑螂來源株 45.7% 及蒼蠅來源株 31.6%)，而且部份菌株會酸凝固 (衣魚蟲來源株 3.5%，蟑螂來源株 28.6% 及蒼蠅來源株 28.9%) 及液化 (蟑螂來源株 11.4% 及蒼蠅來源株 21.9%) 等現象。

由生物學性狀來看，人類來源凝固酶陰性株和昆蟲來源株並沒有什麼顯著的差異。

對 mannitol 的利用 (如表 3)：不論是昆蟲來源株或人類來源凝固酶陰性株在需氧或厭氧之條件下都可以利用 mannitol，如需氧情況下在 24 小時 (51.2%) 至 48 小時 (39.2%) 以內都可以氧化 mannitol，而厭氧之條件下絕大部份菌株須時 48 小時以上甚至 14 天才能發酵，故一般看來較凝固酶陽性株對 mannitol 之利用為緩慢及微弱。

表 3 葡萄狀球菌在需氧或厭氧情況下對 Mannitol 的利用情形
Table 3. Mannitol Utilization by Staphylococci

Sources	No. of strains tested	Utilization path-way	Incubation period (day)						Total no. (%)
			1 (%)	2 (%)	4 (%)	8 (%)	10 (%)	14 (%)	
Silverfishes	115	Oxidation	2(1.7)	107(93.0)	0	0	0	0	109(94.8)
		Fermentation	0	2(1.7)	23(20.0)	63(54.8)	16(13.9)	4(3.5)	108(93.9)
Cockroaches	105	Oxidation	77(73.2)	14(13.2)	0	0	0	0	91(86.7)
		Fermentation	7(6.7)	65(61.9)	14(13.2)	8(7.6)	1(1.0)	0	95(90.5)
Flies	114	Oxidation	92(80.7)	10(8.8)	0	0	0	0	102(89.5)
		Fermentation	10(8.8)	36(31.6)	27(23.7)	26(22.8)	1(0.9)	0	100(87.8)
Total no.	334	Oxidation	171(51.2)	131(39.2)	0	0	0	0	302(90.4)
		Fermentation	17(5.1)	103(30.8)	64(19.2)	97(29.0)	18(5.3)	4(1.2)	303(90.7)
Human origin*	56	Oxidation	42(75.0)	3(5.4)	1(1.8)	0	0	0	46(82.1)
		Fermentation	5(8.9)	17(30.4)	19(33.9)	0	0	0	41(73.2)

*: Coagulase-negative staphylococci.

對抗生物質之反應 (如表 4)：三種昆蟲來源株對抗生物質之反應都相類似僅是量的差異。抗生物質反應之判定以 12.5 ug/ml (或 u/ml) 為基準，低者是謂感受性株而高於此基準是謂耐性菌株。昆蟲來源株對 CM, EM, SM 及 TC 等抗生素之耐性株較多，LM 僅蒼蠅來源之四株 (3.5%) 產生耐性而 PC 及 KM 則全部是感受性株。其中對 CM 產生耐性者計衣魚蟲來源 28 株 (24.3%)，蟑螂來源 9 株 (8.5%) 及蒼蠅來源 20 株 (17.5%)；對 EM 產生耐性者計衣魚蟲來源株 2 株 (1.7%)，蟑螂來源 13 株 (12.4%) 及蒼蠅來源 11 株 (9.6%)；對 SM 產生耐性者計衣魚蟲來源 50 株 (43.5%)，蟑螂來源 21 株 (20.0%) 及蒼蠅來源 15 株 (13.2%) 及對 TC 產生耐性者計衣魚蟲來源 51 株 (44.3%)，蟑螂來源之 50 株 (47.6%) 及蒼蠅來源之 25 株 (21.9%)。昆蟲來源株裏若對 TC 產生耐性者

都具有很高的耐性力價 (100ug/ml)，否則都低於 0.8ug/ml 以下相差達 100 倍以上，其中除蟑螂來源之 3 株是 50ug/ml 耐性外並沒有其他中間耐性株之出現。人類來源凝固酶陰性株對被試之各種抗生素都有耐性株之出現，對 TC 之耐性型態却和昆蟲來源株類似。昆蟲來源株各菌株間對 EM, CM, SM, TC, LM, PC 及 KM 等抗生素之耐性計有 16 種之不同藥物耐性，而人類來源凝固酶陰性株却出現 25 種之藥物耐性型態。昆蟲來源株不但是對單一抗生素產生耐性而已而且常具多劑耐性 (如表 5)，對藥物產生耐性以衣魚蟲來源之 64.3% 高居首位，蟑螂來源之 50.5% 次之，而以蒼蠅來源之 32.5% 最低。昆蟲來源株之單劑及雙劑耐性各佔 21.3%，參劑耐性者 4.8%，肆劑及伍劑耐性者各佔 0.6% 及 1.2%。人類來源凝固酶陰性株之藥物耐性則高於昆蟲來源株計 67.9%，

表4 葡萄狀球菌對抗生物質之反應

Table 4. Antibiotics Sensitivity of Staphylococci

Anti-biotics	Sources	No. of strains tested	Minimal inhibitory concentration*							
			>100	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6	<0.8
PC	Silverfishes	115								115(100.0)***
	Cockroaches	105								105(100.0)
	Flies	114								114(100.0)
	Human origin**	56	9(16.1)	6(10.7)	2(3.6)	4(7.1)	1(1.8)	1(1.8)	2(3.6)	31(55.4)
KM	Silverfishes	115						2(1.7)		115(98.3)
	Cockroaches	105								105(100.0)
	Flies	114								114(100.0)
	Human origin	56	2(3.6)	5(8.9)		1(1.8)	1(1.8)	2(3.6)	2(3.6)	43(76.8)
LM	Silverfishes	115					3(2.6)	101(87.8)	11(9.6)	
	Cockroaches	105					24(22.9)	53(50.5)	23(21.9)	5(4.8)
	Flies	114				4(3.5)	10(8.8)	38(33.3)	49(43.0)	13(11.4)
	Human origin	56	6(10.7)			1(1.8)	6(10.7)	18(32.1)	22(39.3)	3(5.4)
CM	Silverfishes	115		6(5.2)	21(18.3)	1(0.9)		7(4.4)	82(71.3)	
	Cockroaches	105	1(0.9)	8(7.6)			22(21.0)	66(62.9)	8(7.6)	
	Flies	114		6(5.3)	14(12.3)		5(4.4)	56(49.1)	33(28.9)	
	Human origin	56	2(3.6)	16(28.6)	3(5.4)	1(1.8)	12(21.4)	19(33.9)	2(3.6)	1(1.8)
EM	Silverfishes	115	2(1.7)				34(29.6)		51(44.3)	28(24.4)
	Cockroaches	105			10(9.5)	3(2.9)	10(9.5)	10(9.5)	3(2.9)	69(65.7)
	Flies	114			9(7.9)	2(1.8)	2(1.8)			101(88.6)
	Human origin	56	13(23.2)						2(3.6)	41(73.2)
SM	Silverfishes	115	18(15.7)	18(15.6)	7(6.1)	7(6.1)	1(0.9)		1(0.9)	63(54.8)
	Cockroaches	105	8(7.6)	3(2.9)	7(6.7)	3(2.9)	3(2.9)	1(1.0)	3(2.9)	77(73.3)
	Flies	114	5(4.4)	2(1.8)	7(6.1)	1(0.9)	2(1.8)	1(0.9)	9(7.9)	87(76.3)
	Human origin	56	17(30.4)	2(3.6)	1(1.8)	1(1.8)	1(1.8)	5(8.9)	24(42.9)	5(8.9)
TC	Silverfishes	115	51(44.3)							64(55.7)
	Cockroaches	105	47(44.8)	3(2.9)						55(52.4)
	Flies	114	25(21.9)							89(78.1)
	Human origin	56	24(42.9)				1(1.8)			31(55.4)

*PC: u/ml, others ug/ml.

**: coagulase-negative staphylococci.

***: percentage

而且發現具7種以上之多劑耐性株。

DNase 是凝固酶陰性病原性葡萄狀球菌較重要的細胞外產物，而昆蟲來源株之esculin hydrolysis 之陽性率相當高是本菌較特別的生物學性狀，故為了方便昆蟲來源株之分析，以 DNase 之產生與 esculin 之分解能力等加以分類（如表6），其中 Group I 是 DNase

及 esculin 兩者陽性羣佔全部之17.2%，II是 DNase 陽性而 esculin 陰性羣佔1.2%，III是 DNase 陰性而 esculin 陽性羣佔49.1%及IV是 DNase 及 esculin 兩者陰性羣佔32.5%。

Serum soft medium 之應用（如表7）：Group I 及 II 都產生正常的 diffuse colony

表5 葡萄狀球菌對抗生物質之耐性型態

Table 5. The Drug Resistance Patterns of Staphylococci

Sources	No. of strains tested	Resistance patterns to drugs							Total numbers (%)
		Single (%) 1*	Double (%) 2*	Triple (%) 3*	Quadruple (%) 4*	5-drug resistance (%) 5*	6-drug resistance (%) 6*	7-drug resistance (%) 7*	
Silverfishes	115	29(25.2)	36(31.3)	8(7.0)	1(0.9)	0	0	0	74(64.3)
Cockroaches	105	27(25.7)	22(21.0)	4(3.8)	0	0	0	0	53(50.5)
Flies	114	15(13.2)	13(11.4)	4(3.5)	1(0.9)	4(3.5)	0	0	37(32.5)
Total no.	334	71(21.3)	71(21.3)	16(4.8)	2(0.6)	4(1.2)	0	0	164(49.1)
Human origin**	56	10(17.9)	9(16.1)	2(3.6)	11(19.6)	1(1.8)	1(1.8)	4(7.1)	38(67.9)

*: 1. TC (12.9%), SM (3.3%), CM (3.0%), EM (2.1%).

2. LM, SM (0.3%); TC, EM (1.8%); TC, SM (10.5%); TC, CM (3.0%); SM, CM (4.2%); CM, EM (0.9%) and SM, EM (0.6%)

3. LM, SM, CM (0.3%); TC, SM, CM (3.9%) and TC, SM, EM (0.6%).

4. TC, SM, CM, EM (0.6%). 5. LM, TC, SM, CM, EM (1.2%).

The data include the results from staphylococci of insect origin only.

**: Coagulase-negative staphylococci.

表6 凝固酶陰性葡萄狀球菌依據去氧核糖核酸酶及 Esculin 分解等之分類

Table 6. Concurrence of the DNase Production and Esculin Hydrolysis in Coagulase-negative Staphylococci

Group	Biological characters		Number of positive strains				
	DNase	Esculin	Silverfishes (%)	Cockroaches (%)	Flies (%)	Total numbers (%)	Human origin (%)
I	+	+	1(0.9)	15(14.4)	41(36.3)	57(17.2)	6(10.7)
II	+	—	0	3(2.8)	1(0.9)	4(1.2)	4(7.1)
III	—	+	100(87.0)	29(27.9)	34(30.1)	163(49.1)	5(8.9)
IV	—	—	14(12.2)	57(54.8)	37(32.7)	108(32.5)	41(73.2)
No. of strains tested			115	104	113	332	56

表7 凝固酶陰性葡萄狀球菌在 Serum soft medium 之菌落生長情形

Table 7. Occurrence of Small Compact Colonies of Coagulase-negative Staphylococci on the Serum Soft Medium with Normal Rabbit Serum.

Group	Silverfishes		Cockroaches		Flies		Total numbers		Human origin	
	No. of strains tested	No. of positive strains (%)	No. of strains tested	No. of positive strains (%)	No. of strains tested	No. of positive strains (%)	No. of strains tested	No. of positive strains (%)	No. of strains tested	No. of positive strains (%)
I	1	0	15	0	41	0	57	0	6	0
II	0	0	3	0	1	0	4	0	4	0
III	100	8(8.0)	29	2(6.9)	34	2(5.9)	163	12(7.4)	5	1(20.0)
IV	14	2(14.3)	57	24(42.1)	37	4(10.8)	108	30(27.8)	41	10(24.4)
No. of strains tested	115	10(8.7)	104	26(25.0)	113	6(5.3)	332	42(12.4)	56	11(19.6)

，而 Group III 及 IV 之衣魚蟲來源之 10 株 (8.7%) 蟑螂來源之 26 株 (25.0%)，蒼蠅來源之 6 株 (5.3%) 及人類來源凝固酶陰性株 11 株 (19.6%) 產生針頭樣的 compact colony。雖經數日之培養亦無 diffuse colony 之出現，此種現象可能受家兔血清之抗菌物質 δ -因子的抑制⁽²⁴⁾而和 compacting factor 無關⁽²¹⁾。

對小白鼠毒力之分析 (如表 8)：小白鼠注射後呈現倦怠，虛弱及安靜集於一隅，具毒性之菌株在 24~48 小時以內會使小白鼠致死，剖檢雖未見病變但可由心血培養再獲得相同之

菌株，若能渡過 48 小時雖經 2 星期之觀察亦未見死亡及病變發生。以臨床分離之人類來源金黃色葡萄狀球菌作對照時，結果若添加 mucin 者對小白鼠具 100% 的致死力，未添加者僅有 60% 的死亡率。另以 2% 之 mucin 做對照時未見小白鼠之死亡。被試之菌株中以 Group I 對小白鼠似乎是具較高毒性之菌株羣均具 60%~100% 之死亡率，而 II、III 及 IV 細菌羣除蒼蠅來源株及人類來源凝固酶陰性株之 H-52, 99 及 126 株外，其他被試菌株似乎是較不具毒性之菌株羣其死亡率約在 0%~40% 之間。

表 8 凝固酶陰性葡萄狀球菌對小白鼠腹腔注射之毒性

Table 8. Virulence of Coagulase-negative Staphylococci to Mice.

Group	Biological characters		Silverfishes		Cockroaches		Flies		Human origin	
	DNase	Esculin	Strains	Per-centage* of mortality	Strains	Per-centage of mortality	Strains	Per-centage of mortality	Strains	Per-centage of mortality
I	+	+	L-74	60.0	C-14	80.0	F-22 F-59 F-109	100.0 100.0 100.0	H-44	80.0
					C-25	100.0			H-103	60.0
					C-40	60.0				
					C-56	60.0				
II	+	-	0	0	C-37	0.0	F-71	100.0	H-61	40.0
					C-51	20.0			H-99	80.0
					C-60	0.0			H-111	20.0
									H-113	40.0
III	-	+	L-13 L-23	40.0 20.0	C-2	0.0	F-29	80.0	H-4 H-102 H-126	20.0 40.0 100.0
					C-52	20.0	F-39	0.0		
					C-62	0.0	F-40	100.0		
							F-50	80.0		
							F-95	80.0		
IV	-	-	L-18	20.0	C-54 C-97	0.0 40.0	F-16	60.0	H-26	0.0
			L-38	40.0			F-19	80.0	H-39	40.0
			L-63	0.0			F-84	80.0	H-52	100.0
			L-92	0.0			F-89	80.0	H-90	20.0
									H-95	0.0

*: 5 mice were used for each strain. And the bacteria were injected intraperitoneally.

討 論

在昆蟲來源葡萄狀球菌之中除蟑螂及蒼蠅來源各獲得一株凝固酶陽性株外都是凝固酶陰性株，所以昆蟲腸道保有之葡萄狀球菌以凝固酶陰性株為主，由其腸道分離率 (67.2%) 來看它們並不是一羣暫時性的生物羣而是一羣腸道

的正常菌叢。並由它們的生物學性狀等之表現，葡萄狀球菌在昆蟲間之傳遞可能是循着同種昆蟲間的傳遞方式進行而各自獨立成羣。

昆蟲來源葡萄狀球菌之 esculin hydrolysis 是一種很特別的生物學性狀，而且它們的陽性株多於動物來源株⁽¹⁸⁾。由人類來源之 133 株凝固酶陽性及 56 株陰性株對 esculin hy-

drolysis 的能力看，凝固酶陽性株全部是陰性結果而陰性株中 11 株 (19.6%) 却可以分解 esculin，所以這些 esculin 陽性株是否來自昆蟲之污染不無可疑。Esculin hydrolysis 曾被應用於腸內桿菌屬 (Enterobacteriaceae) 之 *Aerobacter*-*Serratia*-*Klebsiella* 羣的鑑定⁽²⁵⁾，故 esculin 分解能力似可做為昆蟲來源葡萄狀球菌鑑定的參考。

凝固酶是病原性葡萄狀球菌很重要的細胞外產物，亦是病原性菌之鑑定因子⁽²⁶⁾。去氧核糖核酸酶和凝固酶之間具有非常密切的關係⁽²⁷⁻³³⁾，凝固酶陽性常是去氧核糖核酸酶陽性株，所以去氧核糖核酸酶在細菌之分類學及病原性鑑定上亦佔有相當重要的地位^(27, 34, 35)。岩田氏⁽²⁶⁾曾以凝固酶陰性而去氧核糖核酸酶陽性株 (寺島株)，行小白鼠之腹腔感染而呈現強力致死作用的報告。故有凝固酶陰性而去氧核糖核酸酶陽性株是具病原性菌株之認定。但由本試驗之小白鼠腹腔注射所呈現之毒力加以分析 (如表 8)，在凝固酶陰性而產生去氧核糖核酸酶之菌株羣間仍有不同之毒力表現，雖然絕大部份是毒力菌株但仍有不具毒性者，而去氧核糖核酸酶陰性菌株羣中亦具有高毒性者如蒼蠅之 F-16, 19, 29, 40, 50, 84, 89 及 95 等株及人類來源之 H-52, 及 126 等株，並不因其生物學性狀之不同或不能產生去氧核糖核酸酶而呈現不同之毒力。雖然凝固酶及去氧核糖核酸酶是葡萄狀球菌病原性鑑定時很重要的細胞外產物，但不能因為菌株不能產生凝固酶或去氧核糖核酸酶就認為它們是沒有病原性之菌株。

Bergey's Manual⁽¹⁾ 以凝固酶及 mannitol 發酵來分類葡萄狀球菌。凝固酶陽性株在需氧或厭氧情況下都可以利用 mannitol 而陰性株則否^(37, 38)。但兩者間並不完全一致，凝固酶陽性株約 1% 不能發酵 mannitol，而 8% 之 mannitol 陽性株是凝固酶陰性⁽³⁹⁾。但由昆蟲來源株及人類來源凝固酶陰性株對 mannitol 之利用看，不論是需氧或厭氧的情況下大部份菌株都是陽性反應，祇是在厭氧情況下較為緩慢及微弱而已。由此觀之，以 mannitol 之分解能力應用於本菌病原性輔助鑑定時其利用之速度及強度是很重要的。

清水氏⁽⁴⁰⁾報告動物來源葡萄狀球菌較人類來源株之藥物耐性株低，如動物來源株之 PC 僅具 18~52% 之耐性率而人類來源株則高達 90%，TC 及 SM 之耐性株亦較人類來源株低，EM 及 KM 則大部份是感受性。森實氏⁽¹³⁾由 Rat 分離之菌株以 PC 及 SM 之耐性株較多，而 TC, CM, OL 及 EM 等抗生素全部是感受性株。昆蟲來源株和動物來源株則呈

現稍微不同之藥物耐性，如 PC, KM 及 LM 等除蒼蠅來源之 4 株是 LM 耐性外全部是感受性株，但 CM, EM, SM 及 TC 則呈現多數之耐性菌株，昆蟲來源株對藥物之耐性株不但多而且常具多劑耐性，所以昆蟲來源葡萄狀球菌在公共衛生上及化學療法上是一個應該注意的問題。一般微生物對藥物之耐性反應均循着 streptomycin-resistance pattern 或 penicillin-resistance pattern^(41, 42)。Streptomycin-resistance pattern 仍是一種 one step mutants 如鏈黴素耐性變異株及噬菌體耐性變異株等。以鏈黴素或噬菌體處理 wild strains 時可同時獲得各種不同程度的鏈黴素或噬菌體之耐性變異株，且僅須一次的接觸即可獲得相當高力價的耐性變異株。但 penicillin-resistance pattern 則是一種 step by step 慢慢提高的方式，此種 penicillin-resistance pattern 之藥物除 penicillin 外尚有 aureomycin, chloramphenicol, neomycin 及 terramycin 等。由它們而引起的藥物耐性不能僅由於一次的藥物接觸而獲得各種不同程度或高力價之藥物耐性變異株，而必須一步一步慢慢地提高。故昆蟲來源株之 TC 反應若是由於受到 TC 之污染而引起之藥物耐性變異株時，由於它們和藥物接觸之劑量及頻度並不可能一樣，故應有各種不同低力價的藥物變異株，但由實驗結果來看，被試菌株若是感受性者則全部低於 0.8ug/ml，耐性者則大都高於 100ug/ml 以上，而沒有中間耐性株之出現。故我們推測 TC 之耐性株可能是一種自然耐性，而並不是完全由於藥物之接觸而獲得之耐性。人類來源凝固酶陰性株與昆蟲來源株都具類似的 TC 反應，除 1 株是 6.3ug/ml 之耐性外，0.8ug/ml 以下之感受性株 (衣魚蟲來源株 55.7%，蟑螂來源株 52.4%，蒼蠅來源株 78.1% 及人類來源株 55.4%) 及 100ug/ml 以上之耐性株 (衣魚蟲來源株 44.3%，蟑螂來源株 47.7%，蒼蠅來源株 21.9% 及人類來源株 42.9%) 之比例和昆蟲來源株非常相似。故我們懷疑它們是否來自相同的來源，而人類來源株之藥物耐性及多劑耐性株之高於昆蟲來源株可能由於人類大量濫用抗生素或由於耐性菌株間之耐性因子之轉移所致⁽⁴³⁻⁴⁵⁾。

參 考 文 獻

- (1) BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. and SMITH, N.R.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edition, Baltimore, Williams & Wilkins Company. pp. 464-466, 1957.

- (2) WILSON, T.S., and STUART, R.D.: *Canad. Med. Ass. J.*, **93**; 8-16, 1965.
- (3) DONALD, C., and GRAHAM, M.D.: *Canad. Med. Ass. J.* **93**; 38-39, 1965.
- (4) SMITH, I. M.: *Arch. Int. Med.* **102**; 375-388, 1958.
- (5) 三方一澤及西尾泰生: *綜合醫學*, **13**; 1043-1054, 1950.
- (6) MURAKAMI, M.: *Japan J. Bacteriol.*, **25**; 591-597, 1970.
- (7) ABRAMSON, C., and FRIEDMAN, H.: *J. Infect. Dis.*, **117**; 242-248, 1967.
- (8) NAKAGAWA, M.: *Japan J. Vet. Res.*, **8**; 279-284, 1960.
- (9) NAKAGAWA, M.: *Japan J. Vet. Res.*, **8**; 331-342, 1960.
- (10) OCHI, Y., and SHIMIZU, T.: *Japan J. Bacteriol.*, **15**; 1113-1119, 1960.
- (11) OCHI, Y., and SHIMIZU, T.: *Japan J. Bacteriol.*, **15**; 1215-1221, 1960.
- (12) PLOMMET, M.G., and WILSON, J.B.: *J. Comp. Path.*, **79**; 425-433, 1969.
- (13) MORI, M.: *Japan J. Bacteriol.*, **25**; 390-397, 1970.
- (14) COLLINES, C.H.: *Microbiological Methods*, London, Butterworth & Co. Ltd. pp. 235, 135, 137-138, 139, 1967.
- (15) Difco Laboratory, *Difco Manual*, ninth edition, Michigan. pp. 150, 192-193, 1953.
- (16) JEFFRIES, C.D., HOLTMAN, D.F., and GUSE, D.G.: *J. Bacteriol.*, **73**; 590-591, 1957.
- (17) JAY, J.M.: *J. Bacteriol.*, **91**; 1804-1810, 1966.
- (18) EIKEN MANUAL: Eiken Chemicals, Tokyo, Japan. p. 60-1 & 2, 1962.
- (19) TSENG, C.C.: *J. Formosan Med. Assoc.*, **73**; 692-698, 1974.
- (20) BAILEY, W.R., and SCOTT, E.G.: *Diagnostic Microbiology*, third edition, Cu Mosby, Saint Louis, p. 331, 1970.
- (21) FINKELSTIN, R.A., and SULKIN, S.E.: *J. Bacteriol.*, **75**; 339-344, 1958.
- (22) JACKS, T.M., and GLANTZ, P.L.: *J. Bacteriol.*, **93**; 991-995, 1967.
- (23) BAILEY, W.R., and SCOTT, E.G.: *Diagnostic Microbiology*, third edition Cu Mosby, Louis, p. 368, 1970.
- (24) CYBULSKA, J., and JELIASZEWICZ, J.: *J. Bacteriol.*, **91**; 953-962, 1966.
- (25) WASILAUSKAS, B.L.: *Appl. Microbiol.*, **21**; 162-163, 1971.
- (26) COWAN, S.T., and STELL, K.J.: *J. Bacteriol.*, **88**; 804-805, 1964.
- (27) WECKMAN, B.G., and CATLIN, B.W.: *J. Bacteriol.*, **73**; 747-753, 1957.
- (28) JACOBS, S.L., WILLIS, A.T., and GOODBURN, G.M.: *Nature*, **200**; 709-710, 1963.
- (29) JACOBS, S.L., WILLIS, A.T., and GOODBURN, G.M.: *J. Path. Bact.*, **87**; 151-156, 1964.
- (30) ELSTON, H.R., and FITCH, D.M.: *Am. Clin. Path.*, **42**; 346-348, 1964.
- (31) DISALVE, J.W.: *Med. Tech. Bull.*, **9**; 191-196, 1958.
- (32) KIMLER, A.: *Am. J. Clin. Path.*, **37**; 593-596, 1962.
- (33) IWATA, K., EDA, T., KIMURA, S., and AOYAMA, I.: *Japan J. Bacteriol.*, **22**; 577-582, 1967.
- (34) VALU, J.A.: *J. Bacteriol.*, **91**; 467-468, 1966.
- (35) ROTHBERG, N.W., and SWARTZ, M.N.: *J. Bacteriol.*, **90**; 294-295, 1965.
- (36) IWATA, K., and EDA, T.: *Japan J. Bacteriol.*, **23**; 165-171, 1968.
- (37) EVANS, J.B., and NIVEN, C.F.: *J. Bacteriol.*, **59**; 545-550, 1950.
- (38) DOROTHY, J., DEIBEL, R.H., and NIVEN, C.F.: *J. Bacteriol.*, **85**; 62-67, 1963.
- (39) KIMLER, A.: *J. Bacteriol.*, **83**; 207-208, 1962.
- (40) 清水健及柴田重孝: *日本細菌學雜誌* **22**; 256-259, 1967.
- (41) DEMEREC, M.: *J. Bacteriol.*, **56**; 63-74, 1948.
- (42) SZYBALSKI, W., and BRYSON, V.: *J. Bacteriol.*, **66**; 468-469, 1953.
- (43) DOWELL, C.E., and ROSENBLUM, E.D.: *J. Bacteriol.*, **84**; 1071-1075, 1962.
- (44) MORSE, M.L., and LA BELLE, J.W.: *J. Bacteriol.*, **83**; 775-780, 1962.
- (45) KORMAN, R.Z., and BERMAN, D.T.: *J. Bacteriol.*, **84**; 228-236, 1962.

STUDIES ON COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI

I. Staphylococci Isolated from Silverfishes, Cockroaches and Flies

CHENG-CHUANG TSENG, KUAN-HUEI WU and YUN-CHUAN TSAN*

The isolation rates of staphylococci from the intestines of insects, silverfishes (*Lepisma saccharina* L.), cockroaches (*Blatta orientalis* L.) and flies (*Lucilia caesar* L. and *Musca domestica* L.) were 73.2%, 59.2% and 70.7% respectively, which indicated that staphylococcus was possibly one of the normal flora in the insect intestines. Except one each of coagulase-positive strain from cockroaches and flies, all the staphylococci isolated were coagulase-negative strains. Staphylococci were the main normal flora in the intestinal tract of silverfishes, while other Gram-negative bacilli were also prevailing in cockroaches and flies.

All the strains of silverfish origin had almost the same biological characters, but strains of cockroach and fly origin showed more diversity in this respect. Among their biological characteristics, lysozyme production, phenolphthalein-phosphatase production, mannitol fermentation, lipase production, esculin hydrolysis and nitrate reduction were predominant, especially lysozyme production, which was 96.5% in silverfish strains, 61.0% in cockroach strains and 29.8% in fly strains and esculin hydrolysis, which was 87.0% in silverfish origin, 40.0% in cockroach strains and 67.5% in fly strains were the most predominant biological characteristics. Eighty-one point seven percent of silverfish origin, 66.7% of cockroach origin and 87.7% of fly origin were orange- or lemon-yellow pigment producing strains. The number of strains which produced deoxyribonuclease totaled 42 (36.8%) of fly origin, 19 (18.1

%) of cockroach origin and only one (0.9%) of silverfish origin.

Ninety point four percent of coagulase-negative strains oxidized mannitol under aerobic condition and 90.7% fermented mannitol under anaerobic condition but more slowly and weaker than coagulase-positive strains.

Strains of insect origin were all sensitive to penicillin and kanamycin. To leucomycin, only 4 strains of fly origin were resistant. A number of strains were found to be resistant to other antibiotics such as chloramphenicol (silverfish origin 24.3%, cockroach origin 8.5% and fly origin 17.5%); Erythromycin (silverfish origin 1.7%, cockroach origin 12.4% and fly origin 9.6%); Streptomycin (silverfish origin 43.5%, cockroach origin 20.0% and fly origin 13.2%) and to oxy-tetracycline (silverfish origin 44.3%, cockroach origin 47.6% and fly origin 21.9%). The number of drug-resistant strains totaled 64.3% of silverfish origin, 50.5% of cockroach origin and 32.5% of fly origin; 21.3% of insect origin were resistant both to single drug and two drugs, 4.8% to three drugs, 0.6% to 4 drugs and 1.2% to 5 drugs.

With respect to deoxyribonuclease production and esculin hydrolysis, all the tested strains were divided into the following four groups: Group I both DNase and esculin positive, 63 strains (16.2%); Group II DNase-positive and esculin-negative, 8 strains (2.1%); Group III DNase-negative and esculin-positive, 168 strains (43.3%); and Group IV both negative, 149 strains (38.4%). Group I was most virulent to mice (death rate

Department of Microbiology, Taipei Medical College, Taipei.

* Present address: National Institute of Preventive Medicine, Nan-Kang Taipei.

Received for publication, August 12, 1975

60-100%). Groups II, III and IV were, except those from fly origin, less virulent or non-virulent (0-40%).

When grown on the serum soft medium with 25% (V/V) normal rabbit serum, all the strains of Groups I and II produced normal diffuse colonies, but some of Groups III (7.2%) and IV (20.1%) produced small compact colonies.

As for their virulence to mice, strains isolated from silverfish had the smallest number of virulent strains and their virulence was weaker; strains from cockroach were, with exception of Group I, all weak or non-virulent; while strains from fly showed, except one

strain F-39, strong virulence to mice.

There were so many similarities between the coagulase-negative staphylococci of insect origin and those of human origin with respect to their biological characteristics, drug susceptibility and virulence to mice, that we suspect the pathogenic coagulase-negative Staphylococci of human origin might most likely come from the insect. And staphylococci of insect origin may probably play an important role in the human coagulase-negative staphylococci infections (especially for enterotoxin intoxication).