

凝固酶陰性葡萄狀球菌之研究

(Ⅲ) 雞來源株之生物學性狀及藥物耐性

曾 金 章
陳 美 玉

台北醫學院微生物學科

摘 要

雞來源株得兩種不同菌落形態之葡萄狀球菌，即光滑型及粗糙變異株。101隻雞之肛門拭子得99隻（98.0%）之陽性分離株，其中粗糙變異株之陽性分離隻數（65.3%）相當高。粗糙變異株在固體培養基產生粗糙菌落及繼發性生長之特性。在液體培養基之表面產生菌膜，易做均勻之懸濁液。

雞來源株全部是凝固酶陰性，光滑型株與其他來源之凝固酶陰性株之生物學性狀頗相類似。粗糙變異株之細胞外產物之產生能力頗為一致，陽性者全部陽性，但根據色素之產生可分成黃、白色兩大群，其中白色株具硝酸鹽還元能力，而黃色株則否，但黃色株之 *esculin* 分解能力強於白色株。

不論是光滑型或粗糙變異株對抗生素之反應都相類似。它們對TC、SM及CM等藥物，多數菌株具較高濃度之藥物耐性，但EM及PC之耐性株較少。全部菌株對五種抗生素（PC，EM，SM，CM及TC）之一種或以上產生耐性，其中單劑耐性1株（0.5%），雙劑耐性15株（7.5%），三劑耐性86株（43.0%），四劑耐性87株（43.5%）及五劑耐性11株（5.5%）。

光滑型之酪蛋白分解活性屬於第I群者20株（18.3%），第II群23株（21.1%），第III群22株（20.2%），第IV群10株（9.2%）及第V群34株（31.2%）。粗糙變異株全部產生渾濁沈澱環之第II群（100.0%）。

以DNase（56.9%）及酪蛋白分解活性之第I，II及III群（59.6%）等加以衡量，其中半數之菌株可能具病原性，而且全部對五種抗生素之一種或以上產生耐性，故雞來源株在公共衛生上及化學療法上將增加其嚴重性。假如使用 *nitrovin* 及 *quindoxin* 等合成之生長促進劑，或可減少很多問題。

緒 論

蓋本省之養雞事業素來發達，尤其是大規模飼養時，為了經濟價值及飼料之有效利用，常添加抗生素樣之生長促進劑⁽¹⁾，如青黴素（penicillin），氯四環素（chlortetracycline），氧四環素（oxy-tetracycline），紅絲黴素（erythromycin），崔西桿菌素（Bacitracin），鏈黴素（Streptomycin），歐黴素（oleandomycin），斯比黴素（Streptomycin）及泰樂黴素（Tylosin）等⁽²⁾。由於它們能抑制有害及無益微生物之生長而改善宿主動物之代謝作用，減少養分之浪費及疾病之控制等。但它們引起之細菌藥物耐性，尤其是革蘭氏陰性桿菌⁽³⁾，却是不可忽視的副作用，使對抗生素，磺胺劑及類固醇濫用之人類，更增加了化學療法上之困擾及嚴重性。故無副作用之 *nitrovin* 及 *quindoxin* 等^(4,5)合成生長促進劑，曾被研究使用，如此或可緩和對抗生素耐性株之出現。

由雞來源得二種不同形態之葡萄狀球菌，即正常之光滑型及粗糙變異株。擬就其生物學性狀及對藥物耐性等加以探討，供瞭解關於生長促進劑之不當使用，可能對抗生療法之損害及對微生物之影響。

Received May 1 and accepted May 24 1977

材料及方法

菌種：本次使用之菌種得自飼養約2個半月之肉雞，每隻重約2~2.5 kg，以高熱能肉雞飼料飼養（中日飼料工業股份有限公司）。雛雞曾經使用氣喘威靈，每 kg 含 erythromycin 500mg, streptomycin 1000mg 及 tetracycline 5000mg 等，平時以 OTCV-antigerm (Lian Hwa製藥) 添加於飼料中做疾病之預防及生長促進劑，它每 kg 含 oxytetracycline HCl 55 gm, Benzethonium chloride 55/gm, thiamin HCl 3000 mg, riboflavin 5000 mg, Vitamin - A 三百萬 IU, Vitamin-D₃一百萬 IU 及 Vitamin-B₁₂ 1000mcg。

分離方法：先以滅菌棉花抹子在生理食鹽水濕潤之，然後插入雞或其他動物之肛門，採集其殘留之腸內容物後，置於7.5% NaCl 之 heart-infusion (HI) broth (Difco) ，經24小時之增殖後，以 mannitol salt agar (Difco) 分離之，依菌落形態及發酵等檢出可疑菌落，並經純化後，以革蘭氏染色法染色後鏡檢之。結果得109株之光滑型菌落及91株粗糙型菌落之變異株。

生物學性狀之測定：依照一般之方法加以鑑定⁽⁶⁾。

藥劑感受性試驗：以平板稀釋法行之。結果以最小發育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 之 mcg/ml 或 u/ml 來表示之。使用之抗生素包括 penicillin (PC, 萬有製藥)，streptomycin (SM, 明治製藥)，chloramphenicol (CM, 中國化學)，oxytetracycline (TC, 輝瑞製藥) 及 erythromycin (EM, 普強製藥) 等。

結 果

雞來源株之分離（表一）：由101隻肉雞之肛門拭子中99隻（98%）獲得葡萄狀球菌之高陽性分離率。其中33隻（32.7%）僅發現光滑型株之寄生，66隻（65.3%）伴有粗糙型菌落之變異株，此變異株中包括黃色株12隻（11.9%），白色株36隻（35.6%）及黃白色株同時存在者12隻（11.9%）。另6隻（6.0%）僅發現粗糙變異株。

粗糙變異株在固體培養基不但產生粗糙表面之菌落，而且具繼發性生長的特性。在液體培養基產生菌膜 (pellicle) 生長於培養基之表面。無粘稠之性質，容易做成均勻之懸濁液。

Table 1. Isolation Rate of Staphylococci from the Contents of Chicken Intestines, in term of Their Colony Shape and Pigment Production.

Characters*	No. of positive** (%)	No. of isolated strains
S	33 (32.7)	34
S + R (W)	36 (35.6)	S: 45, R: 38.
S + R (Y)	12 (11.9)	S: 14, R: 16.
R (W)	4 (4.0)	6
R (Y)	1 (1.0)	2
S + R (W) + R (Y)	12 (11.9)	S: 16, R(W): 12, R(Y): 15.
R (W) + R (Y)	1 (1.0)	R: 1, R (Y): 1.
Total numbers	99 (98.0)	200

*S=Smooth colony, R=Rough colony with secondary growth.

W=White pigment, Y=Yellow pigment.

**Number of Chicken from which Staphylococci have been isolated..

生物學性狀(表二): 200株之雞來源株全部是凝固酶試驗陰性株,光滑型株之細胞外產物之活性和一般凝固酶陰性株之生物學特性並無明顯之差異。其中白色株(79.8%)多於黃色株(20.2%)。對 mannitol 之氧化(85.3%), protease 之產生(70.6%), esculin 之分解(59.3%), phenolphthalein-phosphatase (PP; 56.0%)及 gelatinase 之產生(55.0%)等具較高之陽性率,尤其是具病原性指標之 62 株(56.9%)去氧核糖核酸酶(DNase)陽性株。大部份菌株會分解(37.6%)或固化(37.6%)石蕊牛乳。粗糙變異株間之生物學性狀相當一致,除硝酸鹽還元外其他細胞外產物若產生時則全部都是陽性反應,如 DNase, P.P., mannitol fermenting enzyme, protease, esculin hydrolysis 及 gelatinase 等,而陰性者全部陰性如 coagulase, egg-yolk factor, lysozyme, lipase 及 starch hydrolysis 等。粗糙變異株中大部份對石蕊牛乳具酸固化之能力(96.7%)。根據色素之產生又可細分成二大群,白色株 57 株(62.6%)全部具硝酸鹽還元(nitrate reduction)之能力,而黃色株則否,但白色株對 esculin 之分解能力却弱於黃色株。

Table 2. Biological Characteristics of Staphylococci

Biological Characteristics	Number of positive strains	
	Smooth colony (%)	Rough colony (%)
Coagulase	0	0
DNase	62 (56.9)	91 (100.0)*
Egg-yolk factor	0	0
Lysozyme	9 (8.3)	0
Phenolphthalein-phosphatase	61 (56.0)	91 (100.0)
Mannitol salt agar	93 (85.3)	91 (100.0)
Protease	77 (70.6)	91 (100.0)
Lipase	48 (44.0)	0
Nitrate reduction	0	57 (62.6)
Hydrolysis:		
Starch (potato)	0	0
Esculin	65 (59.3)	91 (100.0)
Gelatine	60 (55.0)	91 (100.0)
V.P.	0	0
Pigmentation		
Yellow	22 (20.2)	34 (37.4)
White	87 (79.8)	57 (62.6)
Litmus milk:		
Acid production	41 (37.6)	0
Acid clot	41 (37.6)	88 (96.7)
peptonization	18 (16.5)	3 (3.3)
Alkaline production	9 (8.3)	0
No of strains tested	109	91

*Very weakly reaction.

對抗生物質之反應（表三）：不論是光滑型或粗糙變異株對抗生素之反應都相類似，其中對TC，SM及CM等藥物之反應，多數菌株都具較高濃度之藥物耐性，但EM及PC之耐性株較少。以藥劑耐性型態加以觀察（表四），全部菌株對五種抗生素之一種或以上都產生藥物耐性。其中單劑耐性者僅光滑型株1株（0.9%）；雙劑耐性者15株（7.5%），其中光滑型7株（6.4%）及粗糙型8株（8.8%）；三劑耐性者86株（43.0%），其中光滑型31株（28.4%）及粗糙型55株（60.4%）；四劑耐性87株（43.5%），其中光滑型59株（54.1%）及粗糙型28株（30.8%）及五劑耐性者僅光滑型11株（10.1%）。

Table 3. Antibiotics Sensitivity of Staphylococci

Anti-biotics	Strains	No. of strains tested	Minimal inhibitory concentration (%)*						
			100 $\geq$	50	25	12.5	6.3	3.1	≤ 1.6
TC	S**	109	105 (96.3)		1 (0.9)	2 (1.8)	1 (0.9)		
	R	91	84 (92.3)		1 (1.1)	6 (6.6)			
SM	S	109	82 (75.2)	9 (8.1)	4 (3.6)	3 (2.7)	1 (0.9)		10 (9.2)
	R	91	80 (87.9)	2 (2.2)			4 (4.4)		5 (5.5)
CM	S	109	109 (100)						
	R	91	91 (100)						
EM	S	109	50 (55.1)		2 (1.8)	2 (1.8)	2 (1.8)		53 (48.6)
	R	91	14 (15.4)						77 (84.6)
PC	S	109	21 (19.3)	3 (1.8)	1 (0.9)	5 (4.6)	1 (0.9)	2 (1.8)	76 (69.7)
	R	91	15 (16.5)				1 (1.1)	16 (17.6)	59 (64.8)

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

** S: Smooth colony, R: Rough colony.

Table 4. The Drug Resistance Patterns of Staphylococci

Type	No. of strains tested	Single (%) 1*	Double (%) 2*	Triple (%) 3*	Quadruple (%) 4*	5-drug resistance (%)*	Total numbers(%)
Smooth	109	1 (0.9)	7 (6.4)	31 (28.4)	59 (54.1)	11 (10.1)	109 (100.0)
Rough	91	0	8 (8.8)	55 (60.4)	28 (30.8)	0	91 (100.0)
Total	200	1 (0.5)	15 (7.5)	86 (43.0)	87 (43.5)	11 (5.5)	200 (100.0)

- *1. CM: 1 strain (0.5%)
- 2. TC, CM: 15 strains (7.5%)
- 3. SM, TC, CM: 82 strains (41.0%); TC, CM, EM: 4 strains (2.0%)
- 4. PC, SM, TC, CM: 34 strains (17.0%); SM, TC, CM, EM: 53 strains (26.5%)
- 5. PC, SM, TC, CM, EM: 11 strains (5.5%)

酪蛋白分解活性與菌株病原性具連帶的關係^(7,8)，雞來源株以酪蛋白分解活性加以分類（表五），其中光滑型株屬於第Ⅰ群者 20 株（18.3%），第Ⅱ群 23 株（21.1%），第Ⅲ群 22 株（20.2%），第Ⅳ群 10 株（9.2%）及第Ⅴ群 34 株（31.2%）。粗糙變異株之酪蛋白分解活性之產生能力非常一致，全部屬於產生渾濁沈澱環之第Ⅱ群。根據前報之結果^(7,8)，得悉第Ⅰ，Ⅱ及Ⅲ群是較具病原性的菌株群，故雞來源株中之光滑型 65 株（59.6%）及粗糙變異株 91 株（100.0%），似乎都具病原性之菌株，其分離率亦相當高。

Table 5. Incidence of the Isolated Strains with Caseinolytic Activity on 2% Skim Milk HI Agar.

Type	Smooth strains (%)	Rough strains (%)
I	20 (18.3)	0
II	23 (21.1)	91 (100.0)
III	22 (20.2)	0
IV	10 (9.2)	0
V	34 (31.2)	0
Total	109	91

討 論

粗糙變異株在雞來源株之分離中，其分離率（65.3 %）是相當高的，而且它們在增殖後檢體之總菌數中亦佔多數，其致僅發現粗糙變異株者（6.0 %）。此種粗糙變異株之發生是否由於動物種類或其他因素之影響，如飼料及生長促進劑等尚未明瞭。但和其他動物來源分離之粗糙變異株之分離率加以比較，似乎和動物之種類及飼養條件等具有連帶的關係（表六），除雞外其他動物之粗糙變異株之陽性分離隻數較少，如家兔 32 隻中 7 隻（21.9 %），鴿子 26 隻中 1 隻（3.8 %）及 Rat (Long evan strain) 44 隻中 1 隻（2.3 %）獲得粗糙變異株之分離。但它們之陽性隻數不但少而且粗糙變異株在總菌數中亦較雞來源者少得甚多。以草食為主之山羊（14 隻）及馬（28 隻）則沒有粗糙變異株之發現。

Table 6. The positive rates of Rough Mutants in the Strains Isolated from the Contents of Intestines of Various Animals.

Animals	Chick	Rabbit	Pigeon	Rat	Goat	Horse
Tested numbers	101	32	26	44	14	28
Rough colony isolated No. (%)	66 (65.3)	7 (21.9)	1 (3.8)	1 (2.3)	0	0

葡萄狀球菌之病原性，除凝固酶之產生外，以 DNase 之產生是較重要之病原性指標⁽⁹⁻¹²⁾，而酪蛋白分解活性之分類；亦被視為觀察病原性強弱之方法^(7,8)。由雞來源株中，粗糙變異株 91 株（100.0 %）全部產生微弱之 DNA 分解活性，對 casein 亦會分解成渾濁沈澱環之第 II 群。光滑型之 109 株中 62 株（56.9 %）產生 DNase，65 株（59.6 %）分屬於第 I 群 20 株（18.3 %），第 II 群 23 株（21.1 %）及第 III 群 22 株（20.2 %）。故以 DNase 及酪蛋白分解活性等加以衡量，其中半數之菌株可能具有病原性。

雞來源株之光滑型及粗糙變異株間對藥物耐性並無顯明的差別，但除 PC 外較人類來源及昆蟲來源株則高出甚多⁽⁶⁾。雞來源 200 株中對 penicillin 產生耐性者 45 株（22.5 %），而人類來源 56 株中 21 株（37.5 %）；EM，雞來源之耐性株計 68 株（34.0 %），人類來源 13 株（23.2 %）；CM，雞來源 200 株（100.0 %），人類來源 22 株（39.4 %）；SM，雞來源 180 株（90.0 %），人類來源 21 株（37.6 %）及 TC，雞來源 199 株（99.5 %），人類來源 24 株（42.9 %）。由其耐性型態與人類來源株加以比較，亦可窺視其藥物耐性之嚴重性。雞來源株無論是光滑型或粗糙變異株之全部分離株對五種藥物（PC, EM, CM, CM 及 TC）之一種或以上產生耐性，其中單劑耐性 1 株（0.5 %），雙劑耐性者 15 株（7.5 %），三劑耐性者 86 株（43.0 %），四劑耐性者 87 株（43.5 %）及五劑耐性者 11 株（10.1 %）。而人類來源株 56 株中 38 株（67.9 %）對 PC, KM, LM, CM, EM, SM 及 TC 等七種藥物產生藥物耐性，其耐藥性型態如下：單劑 10 株（17.9 %），雙劑 9 株（16.1 %），三劑 2 株（3.6 %），四劑 11 株（19.6 %）及五劑 4 株（1.2 %）。

此種高頻率之藥物耐性株及病原性株之出現，對公共衛生上及化學療法上將發生很大的困擾。尤其台灣之養雞事業之發達，而且每每使用廣效性抗生素之生長促進劑，不但使動物之正常菌叢直接獲得藥物之耐性，而且污染於四週使其他人畜吸入而導致細菌之藥物耐性等副作用⁽³⁾。此等耐性尚可經由生物間之藥物耐性因子之轉移，故愈增加其嚴重性。若以 nitrovin 或 quindoxin 等代替一般廣效性抗生物質之生長促進劑⁽³⁾，或可減少很多問題。

謝 辭

本文承行政院衛生署預防醫學研究所所長詹湧泉教授之指導及改正始得完成，著者特表萬分謝意

參考文獻

1. Moore, P.R., Evenson, H., Luckey, T.D., McCoy, E., Elvehjem, C.A., and Hart, E.B.: Use of sulphasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.* 165, 437, 1946.
2. 黃日輝, 抗生物質, 大夫出版社, 高雄市三民區, P 116-118, 1972
3. Linton, A.H., Katherine Howe and Osborne, A.D.: The effects of feeding tetracycline, nitrovin and quindoxin on the drug-resistance of coliaerogenes bacteria from calves and pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, 38; 255, 1975.
4. Smith, H.W.: The antibacterial activity of nitrovin in vitro: the effect of this and other agents against *Clostridium welchii* in the alimentary tract of chickens. *Vet. Rec.* 90; 310, 1972.
5. Hennessey, T.D. and Edwards, J.R.: Antibacterial properties of quindoxin: a new growth-promoting agent. *Vet. Rec.* 90; 187, 1972.
6. Tseng, C.C., Wu, K.H. and Tsan, Y.C.: Studies on Coagulase-negative staphylococci. (I). Staphylococci isolated from Silverfishes, Cockroaches and Flies. *J. Formosan Med. Assoc.* 74; 568, 1975.
7. Tseng, C.C., and Hsu Lily: Studies on coagulase - negative staphylococci (II). Caseinolytic Activity on skim milk heart-infusion agar and its relation to the pathogenicity to mice. *J. Formosan Med. Assoc.* 76; 258-271, 1977.
8. Tseng, C.C. and Hsu Lily: Pathogenicity of coagulase-positive strains to mice in term of their caseinolytic activity. *J. Formosan Med. Assoc.* 76; (in press).
9. Weckman, B.G., and Catlin, B.W.: Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bacteriol.*, 73; 747, 1957.
10. Rothberg, N.W., and Swartz, M.N.: Extracellular deoxyribonuclease in members of the family Enterobacteriaceae, *J. Bacteriol.*, 90; 294, 1965.
11. Iwata, K., and Eda, T.: Studies on unique staphylococcal strains exhibiting high virulence for mice by intraperitoneal inoculation (I). Morphological and biological properties of the strains. (III). Experimental analysis on virulence. *Japan J. Bacteriol.*, 23; 165, 392, 1968.
12. Value, J.A.: Use of the deoxyribonuclease test as an aid in the differentiation of paracolobacterium (*Hafnia*) from *Serratia*. *J. Bacteriol.*, 91; 467, 1966.

Studies on Coagulase-Negative Staphylococci

(III) Biological Characteristics and Drug Susceptibility of The Chicken Origin Strains.

Cheng-Chuang Tseng and Mei-Yi Chen

Department of Microbiology
Taipei Medical College

Staphylococci strains isolated from rectal swabs from chickens grew into colonies of two different types: strains of ordinary smooth type colonies and mutant strains of rough type colonies. Out of 101 chickens examined, 99 (98.3%) were positive, of which 66 (65.3%) contained rough type mutants, a considerably high prevalence. On solid media the rough type mutants grew rough and *Bacillus subtilis*-like colonies and showed characteristic of secondary growth. When cultivated in liquid media they produced pellicles on surfaces of the media, the cultures were not sticky and easily made into homogenous suspensions.

All the 200 strains of chicken origin were coagulase-negative. The smooth type strains showed biochemical properties similar to those of the coagulase-negative strains of other origin, but they were more active in mannitol oxidation, protease, phenol phthalein-phosphatase (pp), gelatinase and esculin hydrolysis, especially in DNase production (56.9%). The rough type mutants were all positive in DNase, pp, mannitol fermenting enzyme, protease, esculin hydrolysis and gelatinase. Some of them produced yellow pigment and others white, the former were negative in nitrate reduction and had stronger esculin hydrolytic activity, while the latter were positive in nitrate reduction and showed weaker esculin hydrolysis.

Both the smooth and rough type strains showed the similar susceptibility to antibiotics. Many strains were resistant to higher drug concentration of oxytetracycline (TC), streptomycin (SM), and chloramphenicol (CM), but only a few were resistant to erythromycin (EM) and penicillin (PC). All the strains showed resistance to one or more of the five antibiotics (PC, EM, SM, CM and TC): 6 (3.0%) strains were single-drug-resistant, 15 (7.5%) were double-drug-resistant, 86 (43.0%) were triple-drug-resistant, 87 (43.5%) were quadruple-drug-resistant and 11 (5.5%) were resistant to all the 5 drugs.

According to the author's classification in term of their caseinolytic activity (J. Formosan Med. Assoc. 76; 258-271, 1977) the smooth type strains were classified as follows: Group I 20 strains (18.3%), Group II 23 strains (21.1%), Group III 22 strains (20.2%),

Received July 1 and accepted October 2 1977

Group IV 10 strains (9.2%), and Group V 34 strains (31.2%). All the rough type strains belonged to Group II.

From their DNase- and caseinolytic activity we may suspect that more than half of them might be pathogenic, and even worse, they were all resistant to major antibiotics. This will cause great troubles to the epidemiology and chemotherapy, and the excessive use of antibiotics, sulfonamides and steroids by man will make the matter more serious. If synthetic nitrovin or quindoxin are used as growth promoting agents for domestic animals, conditions will be very much improved.