

生乳中 葡萄球菌의 分離頻度와 藥劑感受性

李周弘·李洵善·李国千

慶南家畜衛生試驗所

姜鎬祚

慶尚大 農大 獸醫學科

緒 論

젖소의 체표 및 축사환경 등에 널리 분포되어 있는 *Staphylococcus aureus*는 젖소의 유방염과 사람에서 化膿性疾患 및 食中毒의 원인균으로서 중요시 되고 있다.^{7, 8, 26, 27)}

근년 이들 *Staph. aureus*는 젖소에서 乳房炎의 원인균으로써 높은 分離頻度를 나타내고^{1, 10, 17, 28-30)} 있을 뿐만 아니라 각종 抗菌性物質에 대해서 耐性度가 점차적으로 增加되고 있어 臨床治療面에서나 公衆保健學的으로 대단히 문제시 되고 있다.^{7, 8, 10, 18, 23)}

젖소 乳房炎의 원인균으로서 *Staph. aureus*에 관한 연구는 국내외적으로 많은 연구자들에 의해서 실시되어 왔으나,^{4, 5, 7, 10, 17, 26, 28)} 임상증상이 없는 젖소로부터 착유된 混合生乳를 대상으로 하여 조사된 보고는 많지 않다.

본 조사에서는 경남지방 110개소의 목장에서 착유한 混合生乳로부터 *Staph. aureus*를 분리하여 病原性에 관련된 몇 가지의 生化學的的特性과 藥劑感受性을 조사하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

실험재료로서는 1981년 12월 부터 1982년 5월 까지 경남지방 110개소의 목장에서 채취한 混合生乳 110試料를 사용하였다.

2. *Staphylococcus aureus*의 分離

供試材料 1 ml씩을 각각 *Staphylococcus medium* No. 110 (Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양

한 후 *Staph. aureus*의 定型的인 集落을 試料當 10개씩 鈎菌하여 nutrient agar에 分離培養하고, 形態學的 및 몇가지 生化學的의 性狀을 조사하여 *S-taph. aureus*로 확인된 것을 실험에 사용하였다.

3. 生化學的의 性狀檢査

1) Coagulase 試驗

供試한 각기의 菌株를 brain heart infusion agar (BHIA; Difco)에 접종하여 37°C에서 20시간 배양한 다음 각기의 集落 1 äse를 0.5ml의 家兔血漿(生理食鹽水 10倍 희석액)에 가하여 37°C에서 3시간 배양한후 혈장의 응고 여부를 관찰하였다. 이때 응고하지 않은 것은 다시 24시간후에 관찰하였다.¹³⁾

2) DNase 試驗

Deoxyribonuclease agar (DNA培地; 榮研製)에 신선균을 劃線塗抹接種하여 37°C에서 20시간 배양한 다음 1.5N-HCl 용액을 배지표면에 충분히 注加하여 15분후에 集落 주위에 透明帶를 형성하면 陽性으로 판정하였다.¹⁵⁾

3) Catalase 試驗

유리평판위에 3% H₂O₂ 1滴을 떨어뜨리고 여기에 1 äse의 신선균을 混合하여 氣泡가 발생할 때 catalase 陽性菌으로 판정하였다.¹⁴⁾

4) 7.5% NaCl에 대한 抵抗性

Brom cresol purple (BCP)를 가한 7.5% NaCl mannite agar medium에 신선균을 접종하고, 37°C에서 배양하여 48시간 이내에 黃色帶를 형성하면 食鹽抵抗性菌으로 판정하였다.

5) 藥劑感受性 試驗

약제감수성시험은 Disc法에 의했으며, Disc는 antibiotics No. 1 (Difco)으로써 penicillin (PC), stre-

ptomycin (SM), erythromycin (EM), kanamycin (KM), tetracycline (TC), novobiocin (NB), neomycin (NM) 및 chloramphenicol (CP)의 8 종류이었다.

Coagulase 陽性葡萄球菌 154株을 각기 tryptose bouillon培地 (Difco)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였다. 이 菌浮遊液을 brain heart infusion agar (BHIA, Difco)에 塗抹接種하고 여기에 Disc를 배치하여 37°C에서 24시간 배양한 후 集落 주위의 發育沮止帶의 직경을 측정하였다.⁶⁾

結 果

1. *Staphylococcus aureus*의 分離頻度

生乳中 *Staph. aureus*의 分離率은 Table 1.에서와 같이 110例中 87例에서 분리되어 79%를 나타내었다.

飼育規模別로 보면 10頭以上 飼育群에서는 55例中 84.0% (46例)로써 10頭未滿 飼育群의 74.5% (41例)에 비하여 현저하게 높은 分離頻度を 나타내었다.

Table 1. Numbers of *Staphylococcus* Isolated from Raw Milk

Herd size (Head)	No. of samples	No. of samples isolated	%
Under 10	55	41	74.5
Over 10	55	46	84.0
Total	110	87	79.0

Table 2. Coagulase Activities Shown by Isolated *Staphylococcus aureus*

Herd size (Head)	Nb. of isolates	No. of positive	%
Under 10	199	78	39.5
Over 10	160	78	49.0
Total	359	156	43.5

2. Coagulase 陽性菌의 分離頻度

Table 2.에서와 같이 生乳에서 분리한 *Staph. aureus* 359株中 43.5% (156株)가 coagulase 陽性을 나타내었다.

飼育規模別로 보면 10頭以上 飼育群에서 분리한 것은 160株中 49.0% (78例)가 陽性으로써 10頭未滿의 199株中 39.5% (78例)에 비하여 현저하게 높은

결과를 나타내었다.

3. Coagulase 陽性 *Staphylococcus aureus*의 生化学的 特性

Coagulase 陽性菌 154株에 대하여 *Staph. aureus*의 病原성과 관계가 깊은 몇가지 生化学的 特性을 調査하였던바 Table 3.에서와 같이 catalase生性菌은 96.1% (148株)이었고, DNase生性菌은 95.5% (147株)이었으며, NaCl 抵抗力菌은 92.2% (142株)이었다.

Table 3. Biological properties of Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk

Biological properties	No. of strains	No. of positive	%
Coagulase production	154	154	100.0
DNase production	154	147	95.5
Catalase production	154	148	96.1
7.5% salt resistance	154	142	92.2

4. Coagulase 陽性 *Staph. aureus*의 藥劑感受性

Coagulase 陽性을 나타내는 154株에 대하여 penicillin의 7종류의 抗菌劑에 대한 感受性を 調査한 結果는 Table 4.와 같다.

각종 抗菌劑에 대한 感受性は CP (87.6%), NB와 EM (83.1%), NM (81.1%), KM (76.6%), TC (68.8%) 順으로 나타났으며, PC 및 SM에 대해서는 각각 100% 및 82.5%가 耐性을 가지고 있었다.

PC, SM, TC, KM, NM, NB, EM 및 CP중 어느 한 종류에 대해서 耐性을 가지지 않은 菌은 154株 中에서 하나도 없었으며, 1종류 이상의 抗菌劑에 대해서 耐性을 나타낸 耐性型은 모두 31종류였다. 이들중 가장 빈번하게 나타난 耐性型은 PC. SM型으로써 21.4% (33菌株)이었고, 다음으로 PC. NM. SM. KM型 (8.4%), PC. TC. SM型 (7.8%)이었다.

考 察

포도상구菌은 자연계에 널리 분포되어 있으며 動物物体와 밀접한 관계가 있다. 소의 乳房을 침범하는 *Staph. aureus*의 주된 根源은 他動物의 乳腺에서 絞으로 배출되는 汗으로 생각하고 있으며, 乳房

Table 4. Drug Resistance of 154 Isolates of Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk

Antimicrobial drugs	Disc content	Resistant size or less*	Drug resistant strains (%)
Penicillin (PC)	10 μ g	≤ 20	100.0
Streptomycin (SM)	10 μ g	≤ 15	82.5
Tetracycline (TC)	30 μ g	≤ 15	31.2
Kanamycin (KM)	30 μ g	≤ 15	23.4
Neomycin (NM)	30 μ g	≤ 15	18.9
Novobiocin (NB)	30 μ g	≤ 15	16.9
Erythromycin (EM)	15 μ g	≤ 15	16.9
Chloramphenicol (CP)	30 μ g	≤ 15	12.4

* : Diameter of zone of inhibition (mm)

Table 5. Distribution of Drug Resistance Patterns of 154 Strains of Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milks

Multiple drug Resistant patterns	Strains with this pattern (%)	Total %	Multiple drug Resistant patterns	Strains with this pattern (%)	Total %		
PC. SM. EM. KM. TC. CP	2	7.7	PC. SM. TC	12 (7.8)	23.5		
PC. SM. KM. TC. NB. CP	4		PC. SM. KM	5			
PC. SM. KM. TC. NB. EM	3		PC. SM. NM	2			
PC. SM. KM. TC. NB. NM	3		PC. SM. CP	2			
PC. SM. KM. NM. NB	2	4.5	PC. SM. NB	6		23.5	
PC. SM. TC. NB. EM	1		PC. SM. EM	7			
PC. SM. KM. TC. NM	3		PC. EM. TC	1			
PC. SM. TC. NB. CP	1		PC. NB. CP	1			
PC. SM. TC. NB	5	28.0	PC. SM	33 (21.4)			23.5
PC. SM. KM. NM	13 (8.4)		PC. NB	1			
PC. SM. KM. TC	3		PC. EM	1			
PC. SM. NB. KM	4		PC. CP	1			
PC. SM. TC. CP	6						
PC. SM. TC. NM	2						
PC. SM. EM. TC	7						
PC. EM. TC. CP	1						
PC. SM. EM. CP	1						
PC. TC. NB. CP	1						

表面은 이 菌의 발육증식에 주요한 부위가 된다.^{4,7} 이들 균이 소의 乳房에 감염되면 보통 輕症의 乳房炎 또는 不顯性 乳房炎을 일으키고 극소수의 예에서 착유자의 눈에 뜨일 정도로 重症의 乳房炎을 일으킨다.^{4,9}

본 시험 결과에서 生乳의 79%가 포도상구균으로 汚染되어 있었음을 알 수 있으며, 이는 농가 混合 原乳 47例中 76.6%가 分離되었다고 하는 大塚와 小林³⁰⁾의 성적과 비슷하였다고 볼 수 있겠다. 이와

같은 生乳中 포도상구균의 混入은 착유당시 젖소의 건강상태, 환경 및 착유방법 등에 따라서 크게 다를 것으로 생각되므로써 우유중 포도상구균의 混入은 완전하게 막을 수는 없을지라도 위생적 착유를 통해서 그 수를 줄일수는 있을 것으로 본다.

*Staph. aureus*를 同定하기 위한 방법으로 家兔血漿을 이용한 coagulase시험법이 공인된 방법으로 널리 이용되고 있으나,¹¹⁾ 이 방법으로의 문제점을 보완하기 위하여 Disolvo[®]는 DNase시험법을 고안

하였으며, Rayman 등⁹⁾ Sperber 등¹²⁾은 coagulase 生性反應値에 대해서 凝固塊의 정도에 따른 문제점을 지적하고 있다.

본 실험에서 나타난 Coagulase 陽性株는 43.5%로 서 金 등¹⁰⁾이 生乳에서 분리한 포도상구菌에서의 55%와 朴²²⁾의 젖소 乳房炎 由來 포도상구菌의 53.6%에 비하여 약간 낮게 나타났다.

飼育規模別로 보아 10두 이상의 飼育群이 10두 이하의 飼育群에 비하여 coagulase 陽性菌의 분리가 훨씬 높게 나타난 것은 젖소의 개체위생, 사양 관리 및 착유방법 등에 따라서 크게 영향을 미치고 있는 것으로 보아진다.

Coagulase 陽性株 154株에 대해서 生化學的性狀을 조사한 결과는 DNase 生性株가 95.5%, catalase 生性株가 96.1%, 7.5%食塩 抵抗性株가 92.5%로서, 이는 大塚와 小林³⁰⁾, 金 등¹⁰⁾의 성적과 거의 一致되었다.

이상의 결과에서도 본 바와 같거니와 金 등¹⁰⁾은 coagulase 陰性株의 24.7%가 DNase 陽性株였다고 보고한바 있고, Zierdt 등¹⁶⁾이 지적한바와 같이 DNase를 생성하는 *Staph. epidermidis*가 있다는 점을 고려할 때 *Staph. aureus*의 分離同定에는 coagulase 시험과 DNase 시험을 병행해서 실시하면 보다 정확도가 높을 것으로 思料된다.

한편 coagulase 陽性 포도상구菌의 각종 抗菌劑에 대한 耐性度는 金 등¹⁰⁾이 生乳에서 분리한 포도상구菌의 藥劑耐性度보다 전반적으로 높은 결과를 나타내었으며, 또 1970년 이래 10년간에 乳房炎 由來 포도상구菌에 대해서 보고한 金 등²⁰⁾ 羅와 康²¹⁾ 孫 등²³⁾ 宋 등²⁴⁾ 鄭 등²⁵⁾ 曠 등²⁶⁾ 韓과 鄭 등²⁸⁾의 결과에서 보다 전반적으로 높은 耐性率을 나타내었다. 이들 중 특히 penicillin에 대한 耐性率은 鄭 등(1970)²⁹⁾의 69.9%, 孫 등(1973)²³⁾의 42.3%, 曠 등(1977)²⁶⁾의 38.6%에 대해서 본 시험에서는 100%가 耐性을 나타내고 있어 주목하지 않을 수 없었다. 이와 같은 결과는 약제의 농도, 검사방법 및 조사년도 등에 따라 크게 다를 것으로 생각되나 무엇보다도 抗菌劑의 무분별한 濫用에 따른 耐性獲得이 가장 큰 이유중의 하나일 것으로 추측된다.

또한 공시한 154株中 93.5%가 8종류의 抗菌劑에 대해서 2~6劑씩 복합적인 多劑耐性을 나타내었

으며, 이들중 PC·SM耐性型이 가장 많았다.

이상에서와 같이 *Staph. aureus*의 耐性度는 해가 거듭할수록 增加하였고, 또 多劑耐性化되었음을 인정할 수 있었다. 이와 같은 사실은 가축질병의 예방과 치료 및 축산식품의 생산성을 높이기 위해서 많은 종류의 抗生物質을 누구나 마음대로 어느때나 사용할 수 있다는 점을 감안할 때 심각한 문제라 아니할 수 없다. 따라서 국가적인 차원에서 모든 국민들을 대상으로 한 抗生物質의 사용방법과 耐性問題 등에 대한 지도·계몽이 체계적으로 수행되어야 할 것이며, 또 抗生物質의 流通體制 및 使用規制 등에 대한 対策이 하루빨리 樹立되어야 할 것이다.

結 論

1981년 12월부터 82년 5월까지 경남지방 110개 소의 목장에서 채취한 混合生乳로부터 葡萄狀球菌 359株를 분리하고, coagulase 陽性菌 154株에 대해서 生化學的性狀과 藥劑感受性檢査를 실시하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 混合生乳中 葡萄狀球菌의 分離頻度는 79% (87/110例)이었다.

2. 총 359株의 葡萄狀球菌中 43.5% (156株)가 coagulase 陽性을 나타내었다.

3. Coagulase 陽性 *Staph. aureus*의 藥劑感受性은 chloramphenicol에 87.6%, novobiocin과 erythromycin에 각각 83.1%, neomycin에 81.1%, kanamycin에 76.6%, tetracycline에 68.8%가 感受性이 있는 반면, penicillin에 100%, Streptomycin에 82.5%가 耐性을 나타내고 있었다.

4. PC, SM, TC, KM, NM, NB, EM 및 CP에 대한 耐性型은 31가지였으며, 가장 出現頻度가 높은 것은 PC, SM耐性型 (21.4%)이었고, 다음이 PC, NM, KM, SM (8.4%) 및 PC, TC, SM耐性型 (7.8%)이었다.

(參考文獻)

1. Desami, M. N. and Claydon, T. J.: Preliminary incubation of raw milk samples as an aid in evaluating bacteriological quality, J. Milk Food Tech. 27:333, 1964.
2. Disalvo, J. W.: Deoxyribonuclease and coagulase activity of *Micrococci*, Med. Tech. Bull., 9:191, 1958.

3. Barry, A. L., Lachia, R. V. F. and Atchison, F. W.: Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.* 25;496. 1973.
4. Edwards, S. J. and Smith, G. S.: Epidemiology of mastitis in three dairy herds, *J. Comp. Path.*, 231, 1966.
5. Howell, D., Wilson, C. D. and Vessey, M. P.: A survey of the incidence of mastitis in dairy cow in the reading area, *Am. J. Vet. Res.*, 76;1107, 1964.
6. Lorian, V.: *Antibiotics in laboratory medicine*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA. p.24, 1980.
7. Mc Donald, J. S.: Prevention of intrammary infections by milking time hygiene, *Am. J. Vet. Res.*, 31;33, 1970.
8. Porthous, A., Brown, D. F. J., Smith, R. G. and Rogers, T.; Gentamycin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Lancet*, 3;20, 1976.
9. Rayman, M. K., Park, C. E., Philpott, J. and Todd, C. D.: Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*, *Appl. Microbiol.*, 29;451, 1975.
10. Reid, W. B. and Wilson, J. B.: A study of the *Staphylococci* associated with bovine udder, *Am. J. Vet. Res.*, 20;825, 1957.
11. Satta, G., Varaldo, P. E., Tenca, M. and Radin, L. : The relevance of bacteriolytic activity in the taxonomy of the Micrococceae; Failure of its production by *Micrococcus*, *J. Gen. Microbiol.*, 109;385, 1978.
12. Sperber, W. H. and Tatani, S. R.: Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*, *Appl. Microbiol.*, 29; 502, 1975.
13. Turner, F. J. and Schwartz, B. S.: The use of lyophilized human plasma standardized for blood coagulation factors in the coagulase and fibrinolytic test, *J. Lab. Clin. Med.*, 52;888-894, 1958.
14. Wolf, P. L., Russell, B. and Shimoda, A.: *Practical clinical microbiology and mycology*, John Wiley and Sons, New York, 1975.
15. Zarzour, J. Y. and Belle, E. A.: Evaluation of three test procedures for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical source, *J. Clin. Microbiol.*, 7;133, 1978.
16. Zierdt, C. D. and Golde, D. W.: Deoxyribonuclease positive *Staphylococcus epidermidis* strains, *Appl. Microbiol.*, 20;54, 1970.
17. 金鍾冕, 郭澤勲: 全北地方 젖소의 異常乳發生狀況과 原因菌에 관한 研究. *大韓獸醫學會誌*. 15(2);315, 1975.
18. 金鍾冕, 郭澤勲, 宋熹鍾: 生乳에서 分離된 포도상 球菌의 藥劑耐性. *大韓獸醫師會誌*, 15(3); 143, 1979.
19. 金鍾冕, 宋熹鍾, 鄭玉峯: 病原性 포도球菌의 同定을 위한 Coagulase, Deoxyribonuclease 및 耐熱 Nuclease 生産能의 比較. *大韓獸醫學會誌*. 21(2); 99, 1981.
20. 金烘洙, 洪淳國, 蘇景寶, 韓弘栗: 忠南地方 乳牛乳房炎의 感染率 및 原因菌에 관한 研究. 14;91, 1974.
21. 羅鎮洙, 康炳奎: 全南地域乳牛乳房炎의 疫學的 調查研究. *大韓獸醫學會誌*. 15(1);83, 1973.
22. 朴清圭: 젖소 乳房炎由來 포도球菌에 관한 研究. 1. *Staphylococcus aureus*의 生化學的 特性. *大韓獸醫學會誌*. 22(1);15-22, 1982.
23. 손봉환, 한주용, 김효민, 김수장: 京畿道地域의 乳牛乳房炎에 관한 調査. *大韓獸醫學會誌*. 14(2); 273, 1974.
24. 송기홍, 조중현, 홍종순: 京畿道地域의 乳牛乳房炎에 관한 調査. *大韓獸醫學會誌*. 15(1);109, 1975.
25. 정창국, 한홍율, 정길택: 우리나라 젖소 유방염 原因菌의 疫學的 調査 및 치료에 관한 研究. *大韓獸醫學會誌*. 10(1);39, 1970.
26. 조희택, 이주홍, 마점술: 慶南地方의 젖소乳房炎 感染率 및 原因菌에 관한 試驗. *대한수의학회지(부록)*. 17(2); 89, 1977.
27. 韓國獸醫公衆保健學會, 獸醫公衆保健學, 文運堂, 1981.
28. 한홍율, 정길택: 乳牛乳房炎原因菌인 *Staphylococcus aureus*의 각종 化學療法劑에 대한 感度性試驗. *大韓獸醫學會誌*. 12(1); 85, 1972.
29. 久米常夫: Enterobacteriaceaeによる 牛의 乳房炎 畜産의 研究. 31;15, 1977.
30. 大塚義一, 小林嘉一: ブドウ球菌의 生乳かその 分離頻度と 其의 藥劑耐性. *日獸醫師會誌*. 30;143, 1977.

Isolation of *Staphylococcus* from Raw Milks and Their Antimicrobial Drug Susceptibility

Ju - Hong Lee, Soon - Sun Lee and Kuk - Chun Lee

Gyeongnam Animal Health Station

Ho - Jo Kang

Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

Abstract

A total of 359 cultures of *Staphylococcus* were isolated from 110 raw milk samp-

les in stock farms of Gyeongnam province from December, 1981 to May, 1982. Some biochemical properties and antimicrobial drug susceptibility of the isolates were studied with the following results.

1. Of 110 samples of raw milk tested, *Staphylococcus* was isolated from 79 percent of raw milk samples.
2. Coagulase *Staphylococcus aureus* was isolated from 156 cultures among 359 cultures tested. The rates of isolation of coagulase positive *Staphylococcus aureus* from raw milk samples were 43.5%.
3. The 154 cultures of coagulase positive *Staphylococcus aureus* isolates were sensitive in order of prevalence to chloramphenicol (87.6%), novobiocin (83.1%), erythromycin (83.1%), neomycin (81.1%), kanamycin (76.6%), tetracycline (68.8%) and streptomycin (17.5%) while the majority of them were resistant to penicillin.
4. A total of 31 patterns of multiple drug resistance of 154 cultures of *Staphylococcus aureus* against 8 drugs in general use such as CP, SM, TC, KM, NM, NB, EM, and CP were observed and the most common multiple resistance patterns were PC. SM patterns (21.4%) and PC. SM. KM. NK patterns (8.4%).