

Bioluminescence 반응에 의한 ATP측정을 이용한 젖소 유방염 치료에 관한 연구

김태종 · 김종배 · 이승배 · 전용수
건국대학교 축산대학
(1989. 3. 2 접수)

Treatment test for bovine mastitis by the determination of ATP based on firefly bioluminescence

Tae-jong Kim, Jong-bae Kim, Seong-bae Lee, Young-soo Jeon
College of Animal Husbandry, Kun Kuk University.
(Received Mar 2, 1989)

Abstract: This study was carried out to treatment test for bovine mastitis by the determination of adenosine triphosphate (ATP) based on firefly bioluminescence. The results obtained are followed;

1. In the susceptibility test, cephalothin which looks the most effective were sensitive to *Staphylococcus* sp. (72.3%), *Micrococcus* sp. (84.2%), *Streptococcus* sp. (72.7%) and Gram positive bacilli (72.7%), Gram negative bacilli were sensitive to gentamicin (92.3%) and Yeast-like-fungi was the most sensitive to clotrimazole, and nystatin in order.

2. When the number of bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis* isolated from the mastitis milk were counted by conventional agar plating technique, and compared with the concentration of bacterial ATP, it gave a good linear relationship. The content of ATP per *Staphylococcus aureus*, cell was 3.1fM and *Candida tropicalis* showed the high level of ATP (90fM).

3. The ATP assay was applied to the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of various antibiotics. When *Staphylococcus aureus* was incubated in the presence of different concentration of tetracycline, erythromycin, kanamycin and streptomycin sulfate and the growth was monitored by the conventional agar plating technique and ATP assay, both methods shown the same results that they were 1mcg/ml, 2mcg/ml, 6.25mcg/ml and 8mcg/ml, respectively.

4. For the determination of susceptibility of sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated for the milk with mastitis to tetracycline, erythromycin kanamycin and streptomycin sulfate, the minimum time required for the test was determined by the assay of ATP every 30 minutes during incubation of 3 hours at 37°C. ATP concentration time curve calculated on both resistant and sensitive strains incubated 3 hours as the optimum time for the determination of susceptibilities of various antibiotics exemed. The ATP concentration of each test broth (antibiotic containing), expressed as a percentage of its own control brith (antibiotic-free) indicated values of 30% to be indicative of each antibiotic sensitivity. Single time point

이 논문은 한국과학재단의 1986년, 1987년도 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

ATP assay carried out on the various sensitive and resistant of *Staphylococcus aureus* to antibiotics examined after 3 hours at 37°C correlated exactly with disc diffusion and MIC.

5. In the cure of intramammary treatment of bovine mastitis in lactating quarters, the cure rate of Staphylococcal mastitis showed to cephalixin (80%), cloxacillin and gentamicin (70%), ampicillin and oxytetracycline (60%), and Streptococcal mastitis showed to cephalixin (85%), penicillin (80%), cloxacillin and oxytetracycline (75%), and ampicillin (70%), but intramammary antimycotic drug (clotrimazol) were only a little effect about fungal mastitis.

Key words: bovine mastitis, ATP, firefly bioluminescence.

서 론

젖소의 유방염은 우유생산에 있어서 유질저하와 개체별 산유량의 감소를 가져와 낙농가들에게 큰 경제적 손실을 주고 있다. 따라서 먼저 해결해야 할 근본적인 과제로는 젖소의 고질적인 질병인 유방염의 치료를 들 수 있다. 그런데 젖소의 유방염을 치료하기 위하여 많은 약제를 남용하고 있기 때문에 원인균들의 약제에 대한 감수성이 점점 낮아지고 있다. 유방염 치료시에 정확한 약제 선택이 이루어질 경우 약제 남용을 막고 효과적인 치료와 예방이 행하여지리라 생각된다.

Thore et al,^{1,2} Hojer et al³은 firefly bioluminescence 방법으로 세균내 ATP를 측정함으로써 이 방법이 기존의 disc diffusion method나 minimum inhibitory concentration (MIC) test보다 신속히 약제 감수성을 측정할 수 있다고 보고하였다.

McWater¹³은 *Staphylococcus aureus*에 대한 methicillin 약제감수성 검사를 bioluminescence 방법으로 3 시간 이내 측정할 수 있다고 보고하였고, Beckers et al.⁴은 *Escherichia coli*에 대한 ampicillin의 MIC를 측정하는데 최소한 6시간이면 측정할 수 있다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 bioluminescence 반응에 의해 우유속에 존재하는 세균의 ATP를 간접적으로 측정함으로써 유방염 치료시에 기초적 자료를 제공해 주고자 시도하였다.

재료 및 방법

유방염 원인균에 대한 약제 감수성 시험

Disc diffusion 법에 의한 약제 감수성 시험 : Sensitivity discs (BBL, U.S.A)를 이용한 디스크 확산법으로 공시균의 약제 감수성을 시험하였다. 사용한 디스크의 종류 및 함량은 Table 1에서 표시된 바와 같다. 균 접종액(99.5ml의 0.36N H₂SO₄에 0.5ml의 0.04M BaCl₂를 혼합하여 screw cap tube에 밀봉한 것)과 같은 농도로 맞춘 중균 배양액을 사용하였으며 감수성

유무 판정은 Bauer et al⁵의 방법에 준하였다.

동정된 진균은 멸균 생리적 식염수에 MacFarland scale No.2의 농도로 희석한 후 이 진균액을 chloramphenicol이 함유되지 않은 sabouraud's dextrose agar 평판에 각 0.1ml씩 균등 도말한 다음 anti-mycotic paper disc (Mast Laboratory Liverpool, England)를 표면에 완전히 밀착시켜 30분 이내에 37°C 부란기에서 24시간 배양한 후 투명 플라스틱자를 사용하여 Saubolle과 Hoeprieh의 방법⁶에 준하여 발육억제를 측정하고 감수성 유무를 판정하였다. 여기에 사용된 disc는 nystatin (50 unit), flucytosin (1 μ g), griseofulvin (10 μ g), clotrimazole (10 μ g)의 4종이다.

세균내의 ATP 농도에 의한 항생제 감수성 측정방법
Minimum inhibitory concentration(MIC) 농도 측정 : Nutrient broth에 접종한 균주를 37°C에서 overnight 배양한 후 Müller-Hinton agar (BBL, U.S.A)에 미리 streptomycin sulfate 2, 4, 8, 16, 32 μ g/ml, tetracyclin을 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ml, kanamycin을 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 μ g/ml, erythromycin을 0.5, 1, 2, 4, 8 μ g/ml를 넣은 후 ml당 균주가 10⁵으로 희석된 것을 점종하여 37°C에서 overnight 배양한 후 MIC 농도를 결정하였다.

항생제 희석 : Brain heart infusion broth에 streptomycin sulfate을 2, 4, 8, 16, 32 μ g/ml, tetracycline 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ml, chloramphenicol을 3.15, 6.25, 12.5, 50 μ g/ml, kanamycin 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 μ g/ml, erythromycin 0.5, 1, 2, 4, 8 μ g/ml의 농도가 되게 membrane filter (pore size 0.2 μ m)를 넣은 후 vortex mixer로 잘 혼합시켰으며 항생제를 넣지 않은 brain heart infusion broth(BHIB)를 대조구로 사용하였다.

균주 접종 : 분리된 *Staphylococcus aureus* (*St aureus*)를 BHIB에 넣어 37°C에서 24시간 배양시킨 후 세균 수를 McFarland No.1로 조정된 후 항생제를 희석한 test tube와 대조구로 사용한 tube에 0.1ml씩 접종한 후 37°C에서 배양하였다.

세균 ATP 농도에 의한 항생제 감수성 측정 :
Nutrient broth에 접종한 균주가 37°C에서 overnight 배양한 후 McFarland No.1이 되도록 희석하여 BHIB 1.9ml에 미리 streptomycin sulfate(8 μ g/ml), tetracyclin (4 μ g/ml), chloramphenicol (12.5 μ g/ml), kanamycin (6.25 μ g/ml), erythromycin (2 μ g/ml)을 넣은 곳에 균을 0.1ml 점적시켜 37°C에서 3시간 배양하였다. 그리고 이 시료 50 μ l를 취해 cuvette에 넣은 후 Luminometer를 이용하여 10초간 적분화시켜 RLU를 측정하고 즉시 ATP standard 10 μ l를 넣은 후 시료의 ATP 농도를 계산하였다. 대조균의 ATP 값을 기준으로 시험균의 ATP 값을 %로 나타냈을 때 30% 이하를 항생제 감수성이 있는 것으로 판정하였다.

약제 치료 시험 : 세균에 감염된 젖소의 유방염을 치료하기 위하여 사용된 약제는 ampicillin(종근당) 100mg, cephalixin(유유산업) 250mg, chloramphenicol(국제약품) 250mg, cloxacillin(영진약품) 250mg, erythromycin(종근당) 300mg, gentamicin(국제약품) 300mg, penicillin(한독약품) 100,000IU, streptomycin(한독약품) 1g, oxytetracyclin (pfizer) 500mg이며 이들을 각각 종류수 100ml와 잘 혼합하여 1일 2회 3일간 젖소의 유방속에 주입하여 치료를 하였다.

진균에 감염된 젖소 유방염을 치료하기 위하여 시중에 사람의 피부병에 사용되는 연고제인 nystatin (nystatin cream 5g 국제약품) 500,000 IU와 clotrimazole (canesten cream 20g, 한국바이엘약품) 200mg을 1일 2회 3일간 젖소의 유방속에 주입하여 치료하였고, 치료가 안되는 분방은 7일간 더 연고를 주입하여 치료를 계속하였다.

결과 및 고찰

Disc diffusion method에 의한 약제 감수성 시험 : 젖소 유방염의 주요 원인균에 대한 약제 감수성 검사를 disc diffusion method에 의해서 실시하여 나타난 성적은 Table 1에서와 같으며 *Staphylococcus* sp.는 cephalothin이 72.3%로 가장 높았고 gentamicin이 65.5%, neomycin이 60.1%의 순이었으며 *Micrococcus* sp.는 cephalothin이 84.2%, gentamicin이 68.4%, neomycin이 62.4%로 *Staphylococcus* sp.보다 높은 감수성을 나타냈다. 또한 *Streptococcus* sp.에서는 cephalothin이 70.2%, chloramphenicol이 70.2%, novobiocin이 65.3%의 감수성을 보였으며 Gram positive sp.에서는 cephalothin이 72.7%, penicillin과 ampicillin이 63.6%의 감수성을 나타냈으며, Gram negative sp.에서는 gentamicin이 92.3%, neomycin

이 53.8%의 감수성을 나타냈다.

박동⁷은 '83~'84년도에 항생제 감수성검사에서 cephalothin은 98.5%로 아주 잘 듣게 나타났지만, 김과 박⁸이 조사한 항생물질 감수성 시험에서 cephalothin이 78.0%, gentamicin이 57.2%, novobiocin, chloramphenicol 및 neomycin은 각각 50%의 감수성을 나타내어 전에 조사한 보고보다 전체적으로 감수성이 낮아지는 경향을 보이고 있다. 이는 목장에서 치료되지 않던 무절제하게 여러 종류의 항생제를 남용한 결과 유방염을 일으키는 미생물이 약제에 대한 내성을 얻었기 때문이라고 생각된다.

젖소 유방염 감염 우유에서 분리된 13주의 *Candida* 속 진균을 가지고 약제 감수성 시험을 한 결과는 Table 2에서 나타났으며, 진균류에 따라 약간의 차이는 있으나 대체적으로 clotrimazole과 nystatin에는 감수성이 있었고 5-fluorocytosin과 griseofulvin에는 감수성이 거의 없었다.

장과 김⁹은 젖소의 유방염에서 분리된 진균에 대한 약제의 감수성을 실시한 결과 5-fluorocytosin과 nystatin이 가장 감수성이 높다고 보고하였으며 김과 장¹⁰은 유방염 유즙에서 분리한 *Candida tropicalis*와 *Candida pseudotropicalis*에 대한 약제 감수성 시험을 보고한 결과 nystatin이 가장 감수성이 높은 것으로 보고하였지만 김과 장¹⁰은 유방염을 일으킨 진균류의 대다수는 clotrimazole이 가장 감수성이 높다고 보고하였다.

McDonald et al.¹¹은 *Candida tropicalis*를 젖소의 유방염 유즙에서 분리하여 약제 감수성 시험을 해 본결과 nystatin에 대하여 97%의 감수성이 있다고 보고하였고 Bodenhof¹⁴은 clotrimazole이 *Candida tropicalis*에 대하여 감수성이 적다고 보고하였다.

이와같이 여러 연구자들과의 약제 감수성의 차이는 *Candida*속 진균의 약제에 대한 감수성이 지역별 및 종류별로 다르기 때문이고 또 본 연구에서는 *Candida*속의 진균이 겨우 13주만 분리되어서 이것만 가지고 약제 감수성 시험을 했기 때문이라고 생각되며 앞으로 좀 더 많은 균주를 이용하여 실험하는 것이 바람직하다고 생각된다.

유방염 유즙에서 분리한 *St aureus*와 *Candida tropicalis*의 균수와 이 균들의 ATP 농도와 의 상관관계 : Fig 1에서 보는 바와 같이 *St aureus*에서 추출한 ATP 농도와 세균 수 사이에는 약간의 차이는 나타나지만 거의 비례함을 알 수 있다. 이것은 Thore et al¹이 보고한 세균 1마리당 ATP량 2.8fM과 거의 일치하는 소견이다. 또한 젖소 유방염에서 분리한 *Candida tropicalis*의 ATP 함량은 90fM으로써 세균보다

Table 1. Susceptibility to antibiotics of microorganisms isolated from bovine mastitis milk

Antibiotics	Microorganisms Concentration	Suceptibility rate (%)				
		<i>Staphylococcus</i> spp (n=429)	<i>Micrococcus</i> spp(n=133)	<i>Streptococcus</i> spp(n=121)	Gram positive bacillus spp (n=11)	Gram nega- tive bacillus spp(n=13)
Ampicillin	10mcg	63(14.7)	27(20.3)	52(43.0)	7(63.6)	4(30.8)
Cephalothin	30mcg	310(72.3)	112(84.2)	86(71.2)	8(72.7)	5(38.5)
Chloramphenicol	30mcg	217(50.6)	69(51.9)	85(70.2)	4(36.4)	4(30.8)
Cloxacillin	5mcg	106(24.7)	34(25.6)	30(24.8)	3(27.3)	1(7.7)
Erythromycin	15mcg	139(32.4)	42(31.6)	44(36.4)	3(27.3)	3(23.1)
Gentamicin	10mcg	281(65.5)	91(68.4)	55(45.5)	8(72.7)	12(92.3)
Neomycin	30mcg	258(60.1)	83(62.4)	73(60.3)	3(27.3)	7(53.8)
Noboviocin	30mcg	221(51.5)	72(54.1)	79(65.3)	6(54.5)	3(23.1)
Penicillin	10units	23(5.4)	9(6.8)	46(38.0)	7(63.6)	0(0)
Streptomycin	10mcg	22(4.9)	8(6.0)	5(4.1)	1(9.1)	1(7.7)
Tetracycline	30mcg	178(41.5)	57(42.9)	55(45.5)	4(36.4)	3(23.1)

n: Number of strains

Table 2. Antimycotic drug sensitivity of *Candida* sp isolated from milk of mastitis

Antimycotics	Concentration	<i>Candida krusei</i> (n=5)	<i>Candida tropicalis</i> (n=4)	<i>Candida pseudotropicalis</i> (n=2)	<i>Candida albicans</i> (n=2)
Clostrimazole	10mcg	4	3	2	2
5-Fluorocytosin	10mcg	2	1	0	1
Griseofulvin	10mcg	3	1	0	1
Nystatin	50units	4	3	2	1

n: Number of strains

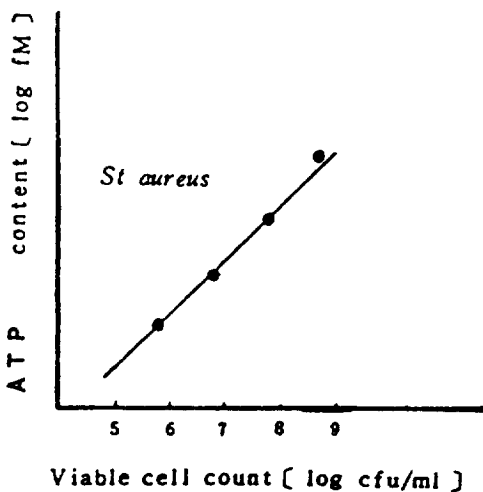


Fig 1. Relationship between ATP contents and viable cell count of *St aureus*.

상당히 많은 ATP를 함유한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Thore et al¹이 *Candida albicans*의 경우 32fM이로 보고한 것과 일치되며, 효모는 세균보다 형태가 크기 때문에 세포 대사를 조절하는 에너지인 ATP가 대체로 더 많이 존재하기 때문이라고 생각된다.

*St aureus*에 대한 각종 항생제의 MIC 결정시 세균내 ATP 측정방법의 이용

Tetracycline의 영향: brain heart infusion broth에 tetracycline을 1, 2, 4, 8 및 16 μ g/ml을 넣고, *St aureus*를 McFarland No.1로 조정하여 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하면서 세균수의 변화와 세균내 ATP의 변화를 조사하였던 바, Fig 2, 3과 같은 결과를 얻었다.

나타난 결과와 같이 대조구에서는 세균 수와 세균내 ATP 농도가 비슷하게 증가한 반면 tetracycline을 1 μ g/ml 이상 함유하고 있는 시험구에서는 세균수가 감소하는 경향을 보이고, 세균내 ATP 농도는 억제되는 형태를 보여 주었다. 이 결과로 볼때 *St aureus*에

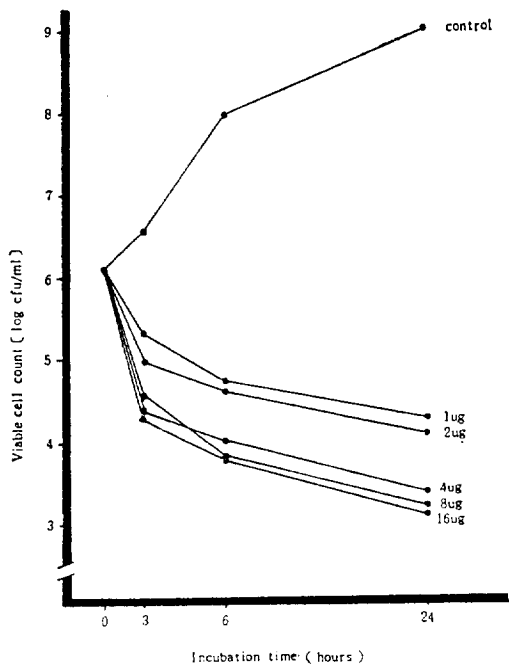


Fig 2. Determination of viable cell count of *St aureus* in cultures containing different concentrations of tetracycline.

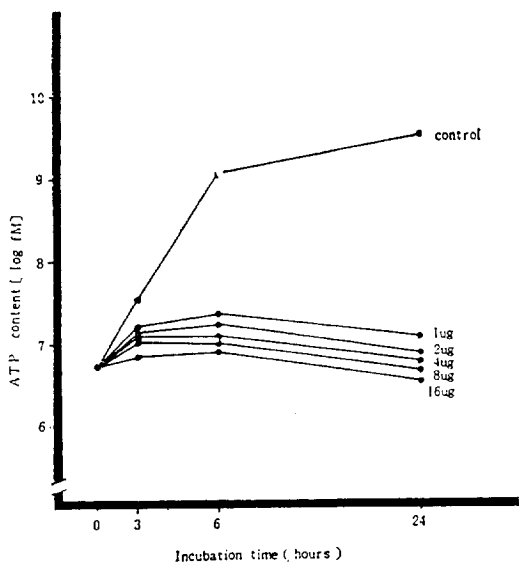


Fig 3. Determination of intracellular ATP of *St aureus* in cultures containing different concentration of tetracycline.

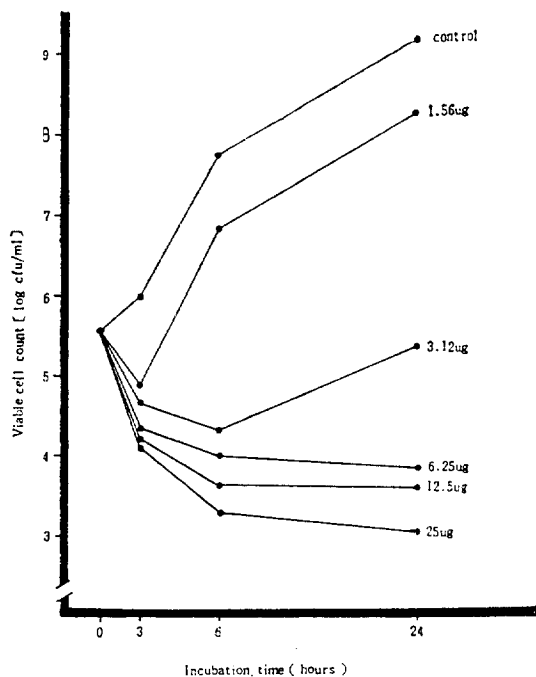


Fig 4 Determination of viable cell count of *St aureus* in cultures containing different concentrations of kanamycin.

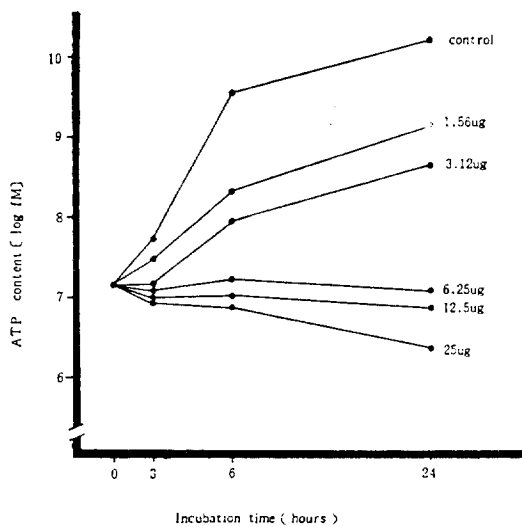


Fig 5 Determination of intracellular ATP of *St aureus* in cultures containing different concentration of kanamycin.

대한 tetracycline의 MIC는 세균 수 측정과 세균내 ATP 측정에서 모두 $1\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 본 실험에 사용된 균주에서 나타낸 $1\mu\text{g/ml}$ 수준의 MIC 농도는 *St aureus*에 대한 기준 MIC 농도인 $4\mu\text{g/ml}$ 보다 적은 양

이므로 *St aureus* (ATCC 196E)는 tetracycline에 민감한 균주라고 생각되며 *St aureus*에 대한 tetracycline의 MIC 농도 결정에 소요되는 시간은 6시간 정도로 상법인 plate count 보다 최소한 24~48시간 빨리 결과를 알 수 있다고 사료된다.

Kanamycin의 영향 : brain heart infusion broth가 들어있는 tube에 kanamycin을 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 및 25 μ g/ml를 넣은 후 *St aureus*를 McFarland No.1로 조정하여 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양하면서 세균 수의 변화와 세균 내의 ATP 변화를 조사한 결과, Fig 4,5에서 보는 바와 같이 kanamycin의 농도가 1.56 μ g/ml일 때 세균 수와 세균 내 ATP 모두 항생제의 영향을 거의 받지 않고 대조구와 거의 비슷한 형태로 증가되었으나, kanamycin의 농도가 3.12 μ g/ml일 때 세균수는 배양 3시간까지 다소 감소하다가 3시간 후부터 24시간까지는 계속 증가되었다. 또한 세균 내 ATP 농도는 3시간까지는 억제되다가 3시간 이후부터는 세균 수 증식과 비슷한 경향으로 증가되는 것으로 나타난 반면 kanamycin의 농도가 6.25 μ g/ml 이상이 들어있는 시험구에서는 세균 수와 세균 ATP 농도 모두가 감소하는 형태를 보여주었다. 따라서 본 실험에 사용된 균주인 *St aureus* (ATCC 196E)에 대한 kanamycin의 MIC 농도는 6.25 μ g/ml로 세균 수 측정과 세균 내 ATP 측정 모두 일치하는 것으로 나타났다. *St aureus*에 대한 kanamycin의 MIC 농도 결정 시간에 있어서 세균내 ATP 측정방법의 경우 배양 6시간 이후 24시간 사이에 ATP 농도 변화가 거의 없기 때문에 6시간 후 바로 ATP 측정이 가능한 반면 상법의 경우 최소한 24시간 배양을 하고 다시 24~48시간 배양을 해야 하므로 신속한 결과를 얻는데 있어서 ATP 측정법이 훨씬 유리하다고 사료된다.

Erythromycin의 영향 : 0.5, 1, 2, 4 및 8 μ g/ml의 erythromycin을 brain heart infusion broth가 함유된 tube에 넣은 후 *St aureus*를 McFarland No.1로 조정하여 접종한 다음, 37°C에서 24시간 배양하면서 세균 수의 변화와 세균내 ATP 변화를 조사하였다.

Fig 6,7에서 나타난 결과와 같이 erythromycin이 1 μ g/ml 이하의 시험구에서는 세균수와 세균 내 ATP는 항생제의 영향을 받지 않고 대조구와 비슷한 형태로 증가하는 경향을 나타냈으나, erythromycin이 2 μ g/ml 이상인 시험구는 세균수가 배양 초기부터 억제되는 경향을 나타낸 반면 세균 내 ATP 농도는 6시간까지 다소 증가를 보이다가 6시간 이후부터 24시간까지 감소되는 경향을 보였다. 이와 같은 현상은 ampicillin을 갖고 실험한 Becker et al.⁴도 비슷한 결과를 보고한

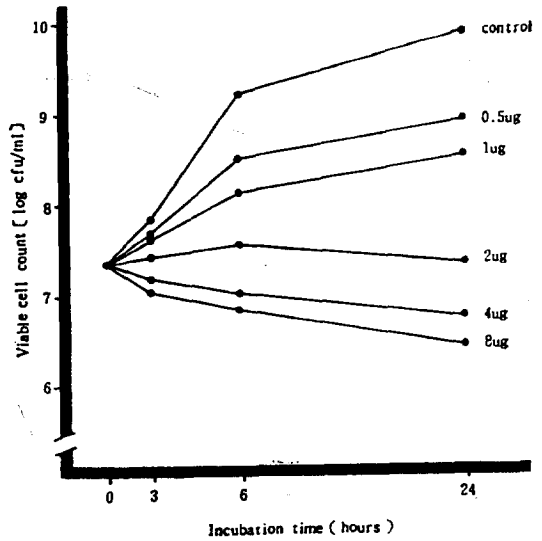


Fig 6 Determination of viable cell count of *St aureus* in cultures containing different concentrations of erythromycin.

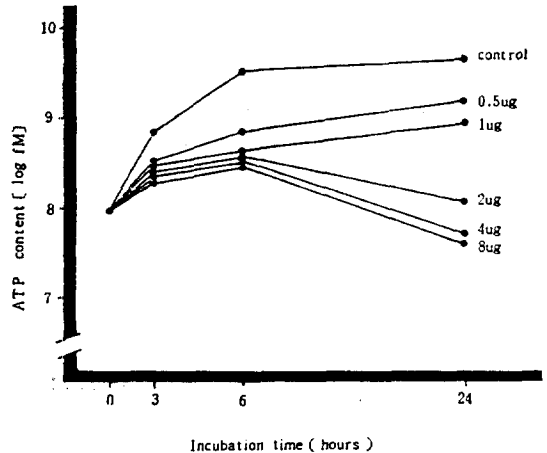


Fig 7 Determination of intracellular ATP of *St aureus* in cultures containing different concentration of erythromycin.

바 있다. 이상의 결과로 비추어 볼 때 *St aureus* (ATCC 196E)의 경우 erythromycin에 대한 MIC 농도는 세균 수 측정과 세균 내 ATP 농도 측정에서 모두 2 μ g/ml로 일치하였으나, 세균내 ATP 농도 측정방법에 의해 erythromycin에 대한 *St aureus* (ATCC196E)의 MIC 농도 결정 최소 배양시간은 6시간 이상 걸리므로 kanamycin (Fig 5)과는 반대현상을 보였다. 그러나 ATP 측정법은 상법과는 달리 colony 형태가 나타나는 24~48시간의 배양시간이 필요없으므로 최종 결과를 얻는데 소요되는 배양시간을 단축시킬 수 있으므로 더

효과적인 측정법이 된다고 사료된다.

Streptomycin sulfate : 각각 농도가 다른 streptomycin sulfate 2, 4, 8, 16, 32 μ g/ml를 brain heart infusion broth가 함유된 tube에 넣은 후 *St aureus*를 상기한 tetracyclin, kanamycin 및 erythromycin과 동일한 방법으로 streptomycin sulfate의 MIC를 조사한 결과는 Fig 8,9에 나타난 바와 같이 streptomycin sulfate 농도가 2 μ g/ml와 4 μ g/ml이 함유된 시험구에서 세균수와 세균 내 ATP 농도는 대조구와 유사한 형태로 배양초부터 24시간까지 증가하는 경향을 나타낸 반면 8 μ g/ml이 함유된 시험구는 6시간까지 세균수와 세균내 ATP 농도 모두 증가를 보이다가 6시간 이후부터 24시간까지는 감소하는 형태로 나타났으며, 16 μ g/ml 이상의 시험구에서는 세균수와 세균내 ATP 모두 배양 초기부터 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 *St aureus* (ATCC 196E)에 대한 streptomycin sulfate의 MIC 농도는 세균수 측정과 세균 ATP 측정 모두 16 μ g/ml로 일치하였으며, streptomycin sulfate에 대한 *St aureus* (ATCC196E)의 MIC 농도 결정을 위해서는 3시간의 배양만으로도 충분한 것으로 사료된다.

각종 항생제에 대한 *St aureus*의 감수성 조사시 ATP 측정방법의 이용 : 유방염에 걸린 젖소의 우유에서 분리동정된 *St aureus*를 disc diffusion method와 MIC test의 결과에 따라 각종 항생제에 대한 민감성 균주와 저항성 균주를 선택하여 각종 항생제가 함유된 brain heart infusion broth에 접종한 후 37°C에서 3.5시간 배양하면서 30분 간격으로 두 균주의 ATP 함량의 변화를 조사하여 감수성 최소 배양시간을 결정하고, 아울러 결정된 최소배양 시간을 적용하여 *St aureus*의 감수성을 조사하였다.

Tetracycline에 대한 감수성 조사 : Fig 10에 나타난 바와 같이 3시간 배양 후, tetracycline 민감성 균주인 경우 대조구 배양액과 시험구 배양액 사이에 세균 ATP 농도 차이는 100fM으로 나타난 반면, tetracycline 저항성 균주인 경우 대조구 배양액과 시험구 배양액에 있어 세균 ATP 농도가 거의 유사한 수준을 유지하였다.

ATP 측정법에 의하여 methicillin에 대한 *St aureus*의 감수성 조사를 실시한 McWater¹³는 항생제를 첨가한 시험구의 ATP량이 항생제를 첨가하지 않은 대조구 ATP량의 30% 이하의 값으로 나타내는데 소요되는 시간을 감수성 조사를 위한 최소한의 배양시간으로 간주하였다. 이에 따르면 tetracycline의 경우 3시간으로 사료된다.

상기 결과에 의거, 상법인 disc diffusion method와

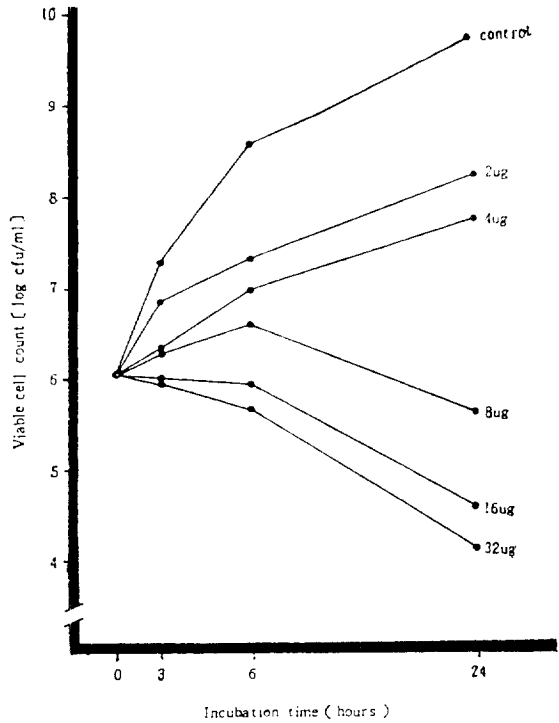


Fig 8 Determination of viable cell count of *St aureus* in cultures containing different concentrations of streptomycin sulfate.

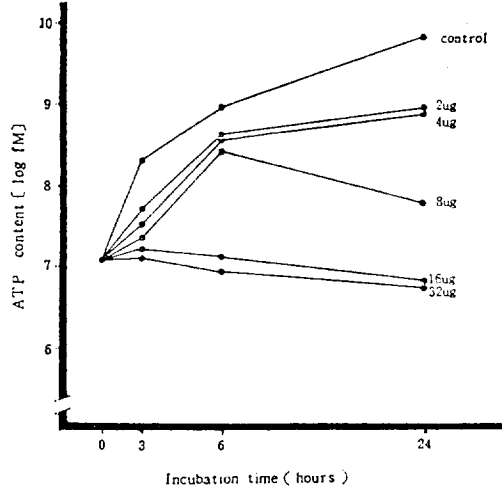


Fig 9 Determination of intracellular ATP of *St aureus* in cultures containing different concentration of streptomycin sulfate.

MIC test에 의해 결정된 민감성 균주 7개와 저항성 균주 7개를 4 μ g/ml의 tetracycline 존재하에서 3시간 배양 후 ATP 농도를 측정하여 대조구의 ATP 함량에

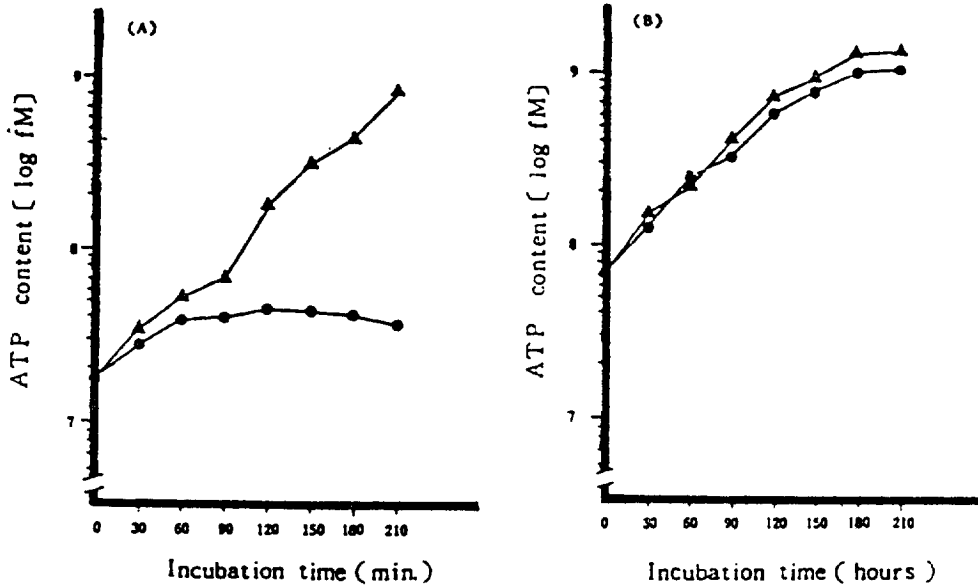


Fig 10. The effect of tetracycline on the ATP level in culture of sensitive (A) and resistant (B) *St aureus*. Cultures were incubated at 37°C in the absence of tetracyclin [▲] and in the presence of 4µg/ml tetracycline [●].

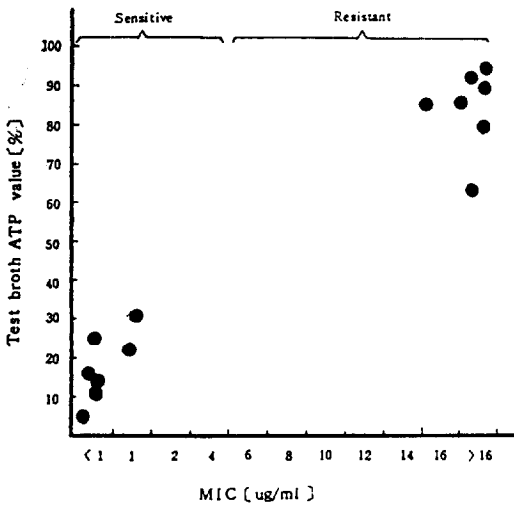


Fig 11. Relationship between MIC levels to tetracycline and test broth ATP values after 3 hours incubation at 37°C in the presence of 4µg/ml tetracycline. Test broth ATP values is expressed as a percentage of antibiotic free control. Values of <30% ATP was indicative of sensitivity of 4µg/ml tetracycline.

대한 백분율(%)로 나타냈을 때 Fig 11과 같은 결과를 얻었다.

나타난 결과와 같이 저항성 균주 7개 모두 평균 80% 이상을 나타내어 감수성을 보이지 않았으나 민감성 균주 7개는 모두 30% 이하로서 감수성을 현저하게 나타내므로써 상법에서 얻은 결과와 일치함을 보여주었다.

Kanamycin, erythromycin 및 streptomycin sulfate에 대한 감수성 조사: tetracycline에 대한 감수성 조사와 동일한 방법으로 kanamycin, erythromycin 및 streptomycin sulfate에 대한 감수성 조사를 ATP 측정법으로 실시하였을 때 Fig 12, 13, 14와 같은 결과를 얻었다.

나타난 바와 같이 모두 대조구에 비해 민감성 균주에서는 ATP의 양이 감소하는 현상을 보였고, 저항성 균주에서는 ATP량에 변화가 거의 없었다. 또한 tetracycline과 같이 3시간 배양 후 민감성 균주의 ATP량이 대조구에 비해 30% 이하의 값을 나타냈었으므로, 세 항생제 모두 ATP 측정방법을 사용한 경우 3시간 배양으로 *St aureus*의 감수성 조사를 할 수 있다고 사료된다. 또한 ATP 측정에 의한 감수성 조사를 직접 적용하기 위하여 상법인 disc diffusion 방법과 MIC 방법으로 감수성이 결정된 *St aureus*를 일정한 양의 항

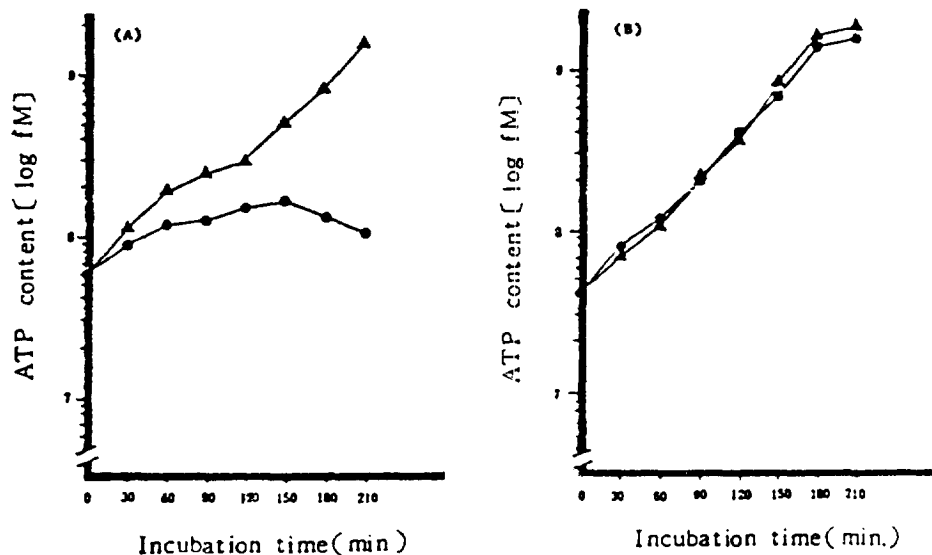


Fig 12. The effect of kanamycin on the ATP level in culture of sensitive (A) and resistant (B) *St aureus*. Cultures were incubated at 37°C in the absence of kanamycin [\blacktriangle] and in the presence of 6.25 μ g/ml kanamycin [\bullet].

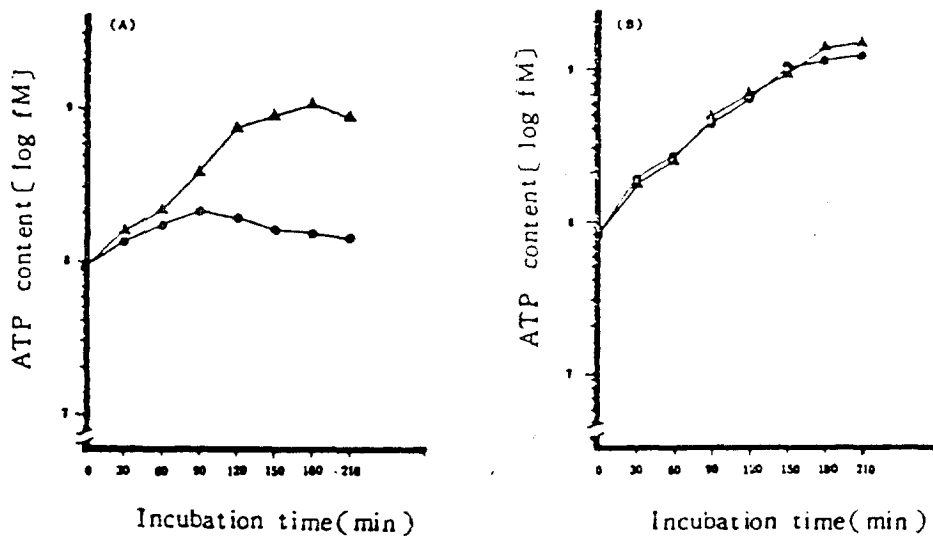


Fig 13. The effect of erythromycin on the ATP level in culture of sensitive (A) and resistant (B) *St aureus*. Cultures were incubated at 37°C in the absence of erythromycin [\blacktriangle] and in the presence of 2 μ g/ml erythromycin [\bullet].

생제(kanamycin : 6.25 μ g/ml, erythromycin : 2 μ g/ml, streptomycin sulfate : 8 μ g/ml) 존재하에서 3시간 배양하여 시험구의 ATP 량을 측정하여 대조구 ATP 량에 대한 백분율(%)로 나타냈을 때 Fig 15, 16, 17 과 같은 결과를 얻었다.

나타난 결과는 상법의 결과와 거의 일치하는 좋은 결과를 보였다. 따라서 ATP 측정법으로도 항생제에

대한 감수성 조사를 보다 신속히 그리고 간편하게 실시할 수 있다고 사료되며 앞으로 임상학적으로 폭넓은 응용이 기대되는 바이다.

세균성 유방염의 약제 치료 시험 : 세균이 원인이 된 젖소 유방염 약제 치료 시험의 결과는 Table 2에서 나타난 바와 같으며 *Staphylococcus* sp.가 원인이 된 유방염에서는 cephalixin이 80%, gentamicin과 cloxa-

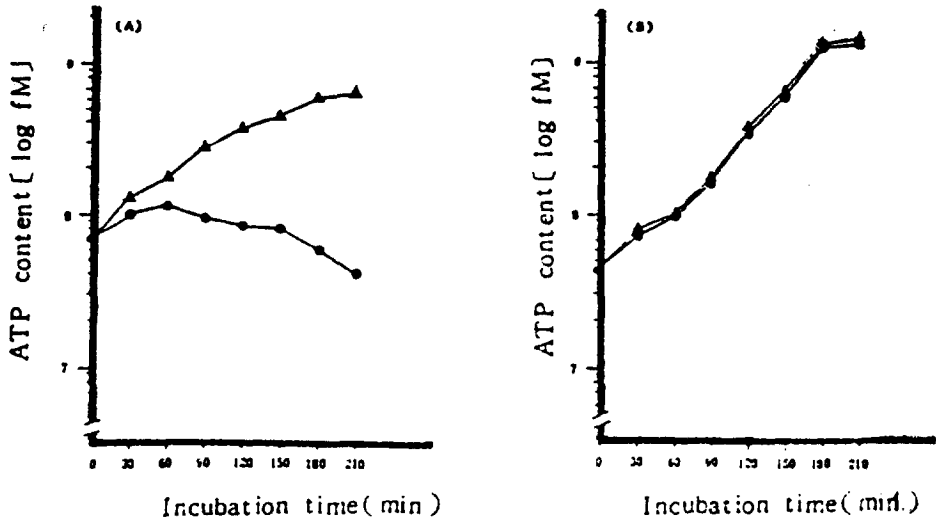


Fig 14. The effect of streptomycin sulfate on the ATP level in culture of sensitive (A) and resistant (B) *St aureus*. Cultures were incubated at 37°C in the absence of streptomycin sulfate [▲] and in the presence of 8µg/ml streptomycin sulfate [●].

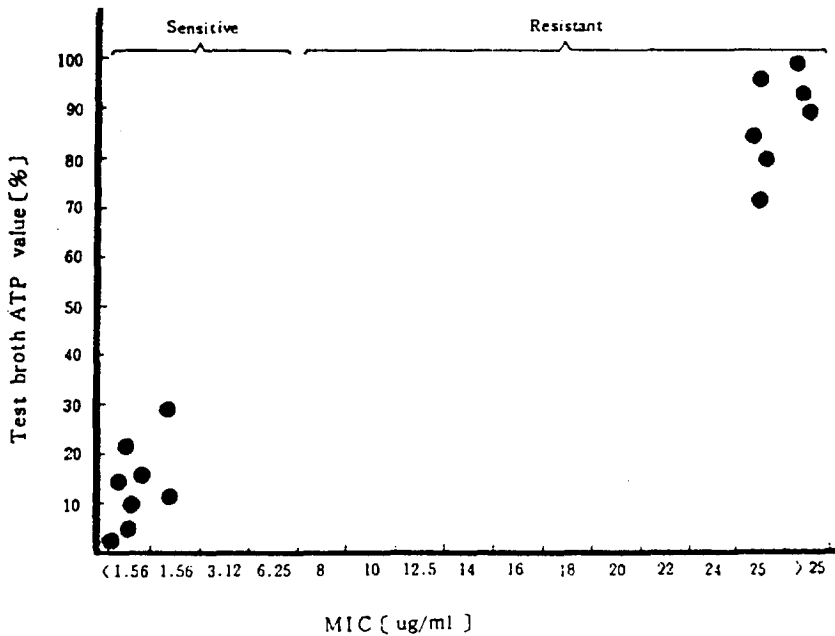


Fig 15. Relationship between MIC levels to kanamycin and test broth ATP values after 3 hours incubation 37°C in the presence of 6.25µg/ml kanamycin. Test broth ATP values is expressed as a percentage of antibiotic free control. Values of <30% ATP was indicative of sensitivity to 6.25µg/ml kanamycin.

cillin이 70% 그리고 oxytetracycline이 60%의 치료율을 나타냈다. 또한 *Streptococcus*가 원인이 된 유방염에서는 cephalexin이 85%, penicillin이 80%, oxytetracycline과 cloxacillin이 75%, 그리고 ampicillin이

70%의 치료율을 나타내어서 *Streptococcus*에 의한 유방염이 *Staphylococcus*에 의한 유방염보다 치료가 잘 되는 것으로 나타났다. Gram 음성 간균인 *E coli*에 의하여 유방염에 감염된 4두를 penicillin으로 치료한

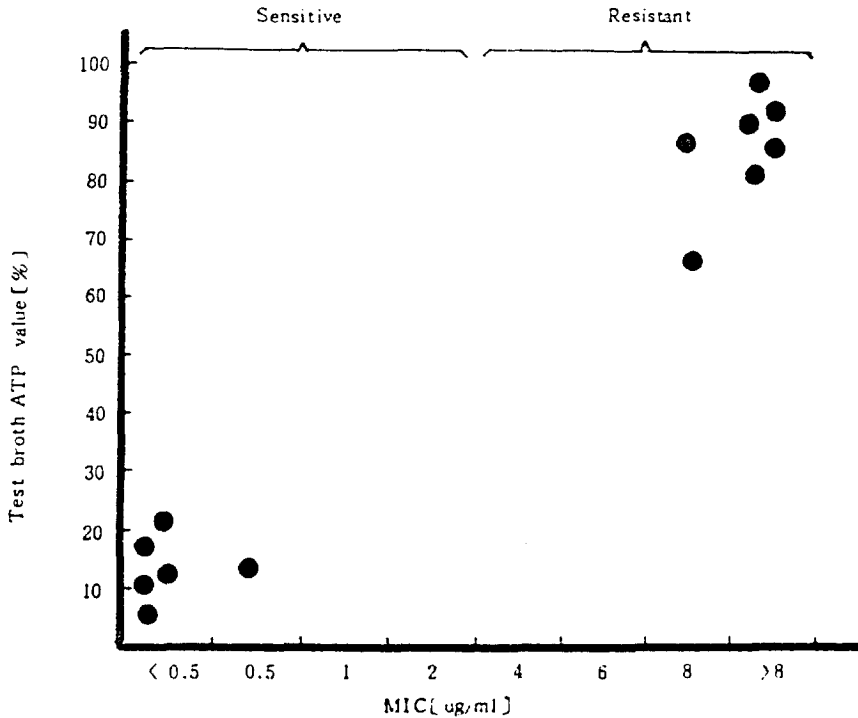


Fig 16. Relationship between MIC levels to erythromycin and test broth ATP values after 3 hours incubation 37°C in the presence of 2µg/ml erythromycin. Test broth ATP values is expressed as a percentage of antibiotic free control. Values of <30% ATP were indicative of sensitivity of 2µg/ml erythromycin.

Table 3. Cure rate of intramammary treatment of mastitis in lactating quarters

Preparation	Dose	Quarters	Cure Rate (%)	
			Staphylococcal mastitis	Streptococcal mastitis
Ampicillin	100ml	20	12(60)	14(70)
Cephalexin	250ml	20	16(80)	17(85)
Chloramphenicol	250ml	20	4(20)	4(20)
Cloxacillin	250ml	20	14(70)	15(75)
Erythromycin	300ml	20	10(50)	10(50)
Gentamicin	300ml	20	14(70)	10(50)
Penicillin	100,000IU	20	6(30)	16(80)
Streptomycin	1g	20	2(30)	—
Oxytetracycline	500mg	20	12(60)	15(75)

결과 2두만이 치료가 되었으며 *Pseudomonas*가 원인이 된 유방염에서 gentamicin으로 5두를 치료한 결과 3두가 치료되었고 *Klebsiella*에 의한 유방염 2두를 cephalixin으로 치료한 결과 1두가 치료되었다. 이와같이 Gram 음성균에 의한 유방염의 치료는 그람 양성균의

유방염의 치료보다 잘 치료되지 않았다.

Blood et al¹²은 *Staphylococcus*가 원인이 된 유방염에서 penicillin G를 100,000 unit를 쓴 결과 40~70%의 치유율을, cloxacillin을 500mg 투여한 결과 30~60%, tetracycline은 50%, cloxacillin과 ampicillin은

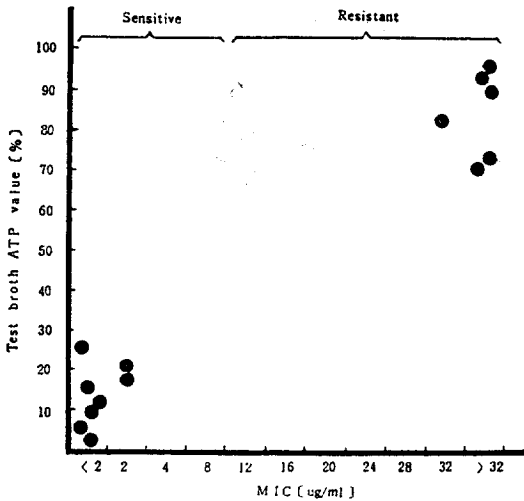


Fig 17. Relationship between MIC levels to streptomycin sulfate and test broth ATP values after 3 hours incubation 37°C in the presence of 8µg/ml streptomycin sulfate. Test broth ATP value is expressed as a percentage of antibiotic free control. Values of <30% ATP was indicative of sensitivity to 8µg/ml streptomycin sulfate.

64%, streptomycin과 penicillin을 복합제로 썼을 때 40~70%의 치료율을 보였다고 보고하였다.

또한 *Streptococcus*에 의한 유방염의 치료에서 penicillin G, streptomycin과 penicillin 복합제, cloxacillin, tetracycline 및 erythromycin은 100%의 치료율을 나타냈으며 chloramphenicol은 24%의 치료율을 나타냈다고 보고하였다.

Coliform에 의한 유방염에서 cloxacillin과 ampicillin은 97%, streptomycin과 penicillin은 80%, 그리고 chloramphenicol은 50%의 치료율을 나타냈다고 보고하였다.

본 연구에서는 대체적으로 임상형 유방염은 치료가 잘 안되는 편이었다. 항생제 감수성 검사에서 잘 듣는 항생제로 치료가 잘 안되는 것은 실험실 검사와 실제 유방 속에서의 작용이 서로 다르고 또한 유방염을 일으킨 균이 복합적이기 때문이며, 항생제 감수성시험에서는 세균배지에 잘 자라는 균만 채취하여 검사를 하여 치료를 했기 때문이라고 생각되며 이 분야에 대해서는 앞으로 좀 더 연구가 있어야 된다고 생각된다.

*Candida krusei*가 원인인 유방염에서 clotrimazole로 치료하였던 결과 2분방중 1분방은 치료되었지만 nystatin으로 치료한 1분방은 치료되지 않았다. *Candida pseudotropicalis*와 *Candida albicans*가 원인인 유방염

에서 각각 2분방씩 clotrimazole과 nystatin으로 치료한 결과 *Candida pseudotropicalis*에 감염된 2분방중 1분방만 치료되었다.

Howard¹⁵는 유방염에서 분리된 효모양 진균류는 실험실에서 항진균성 약제 감수성 시험을 해보면 clotrimazole이 가장 우수하게 나타나지만 실제 임상에서는 잘 치료가 안된다고 보고하였다. 그러나 여와 최¹⁶는 유방염에 걸린 7개분방에 nystatin 300,000 IU를 3일간 치료한 결과 모두 치료가 되었다고 보고하였다.

이와 같은 것은 각 연구자들간의 치료기간 또는 치료약과 부형제 등의 합리적 적용의 차이 때문이라고 생각되며 앞으로 이 부분에 더욱 많은 연구를 하여 실제적으로 젖소의 유방염이 잘 치료될 수 있도록 많은 연구가 뒤따라져야 한다고 생각한다.

결론

본 연구는 bioluminescence 반응에 의하여 유방염 치료에 관한 연구를 실시하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 젖소 유방염 원인균에 대한 약제 감수성 시험을 한 결과 *Staphylococcus* sp, *Micrococcus* sp, *Streptococcus* sp, Gram 양성 간균에서는 cephalothin이 각각 72.3%, 84.2%, 71.2%, 72.7%의 감수성을 나타냈으며, Gram 음성간균은 gentamicin이 92.3%의 감수성을 나타냈다. 진균에 대한 약제 감수성 시험에서 clotrimazole이 가장 좋고 nystatin 순이었다.

2. 젖소의 유방염 우유에서 분리한 *Staphylococcus aureus*와 *Candida tropicalis*에서 추출한 ATP 농도와 균수는 거의 비례하였고 *Staphylococcus aureus* 한개당 ATP 농도는 3.1fM으로 나타났고 *Candida tropicalis* 인 경우에는 높은 ATP 농도인 90fM으로 나타났다.

3. 항생제의 minimum inhibitory concentration (MIC)를 결정하기 위한 ATP 측정방법의 이용 가능성을 조사하기 위하여 *Staphylococcus aureus* (ATCC 196E)를각기 농도가 다른 tetracycline, erythromycin, kanamycin 및 streptomycin을 함유한 배지에서 배양하면서 세균수 측정과 세균 ATP 농도를 측정하여 상호 비교하였던 바, 각 항생제에 대한 MIC 농도는 각각 ml당 1µg, 2µg, 6.25µg, 그리고 8µg으로 동일한 결과를 얻었다. 그러나 상법에 비해 ATP 측정법은 6시간내에 항생제 MIC를 신속히 결정할 수 있었다.

4. 유방염 우유에서 분리된 *Staphylococcus aureus*를 tetracycline, erythromycin, kanamycin 및 streptomycin에 대한 감수성 균주와 저항성 균주를 선택하여 ATP 측정법의 최소 배양시간을 결정하기 위해 37°C

에서 3시간 배양하였을 때 감수성 균주의 ATP 함량이 대조구에 비해 30% 이하의 값을 나타낸 반면 저항균주에서는 대조구와 비슷한 수준의 ATP 함량을 나타냈다.

상기 항생제에 대한 방법은 상법인 disc diffusion method 및 MIC test와 비교시 매우 밀접한 상관관계가 있었고 분리된 균주를 상법이 18시간 이상보다 최소한 3시간 배양하여 신속한 결과를 얻을 수 있었다.

5. 유방염에 걸린 젖소의 치료를 위해 약제를 사용하였던 결과 *Staphylococcus*에 의한 유방염은 cephalexin 80%, cloxacillin과 gentamicin이 70%, ampicillin과 oxytetracycline이 60%의 치료율을 나타냈고, *Streptococcus*에 의한 유방염은 cephalexin 85%, penicillin 80%, cloxacillin과 oxytetracycline이 75%, 그리고 ampicillin은 70%의 치료율을 나타내었다. 진균에 대한 유방염 치료는 clotrimazole만이 약간의 효과가 있었다.

참 고 문 헌

1. Thore A, Ansehn S, Lundin A, et al. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. *J Clin Micro* 1975;1:1~18.
2. Thore A, Nilsson L, Hojer H, et al. Effects of ampicillin on intracellular levels of adenosine teiphosphate in bacterial cultures related to antibiotic susceptibility. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia 85 section B* 1977;161~166.
3. Hojer H, Nilsson L, Ansehn S, et al. Possible application of luciferase assay of ATP to antibiotic susceptibility. In proceedings of the international symposium on analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence. Westlak Village; *California state printing and publishing* 1979;523~530.
4. Beckers B, Lang HRM, Beinke A. Determination of intracellular ATP during growth of *Escherichia coli* in the presence of ampicillin In: *Analytical application of bioluminescence and chemiluminescence*. Orando Florida: Academic

press Inc, 1984;67~70.

5. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Path* 1966; 45(4):493.
6. Saubolle MA, Hoeprieh PD. Disc agar diffusion susceptibility testing of yeast. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:517.
7. 박용호, 주이석, 강승원, 박정문, 유방염 원인균 분리와 유두침지용 소독약제의 효과에 관한 연구. *농사시험연구 논문집* 1985;27:39.
8. 김태중, 박용호. 유방염 특정원인체 분리 및 치료 약제 선발에 관한 연구. *건국대학교 축산과학연구소 논문집* 1987;12:115~128.
9. 장국현, 김태중. 유방염 감염유우에서 분리된 효모양 진균에 관한 연구. *대한수의사회지* 1984;20(11):684~691.
10. 김태중, 장국현. 젖소 유방염 유즙에서 분리된 *candida*속 진균의 특성과 약제감수성. *건국대학교 축산과학연구소 논문집* 1986;11:211~218.
11. McDonald JS, Richard JL, Anderson AJ, et al. In vitro Antimycotic sensitivity of yeast isolated from infected bovine mammary glands. *Am J Vet Res* 1980;14:1987.
12. Blood DC, Radostitis OM, Henderson JA, et al. *Veterinary medicine*. 6th ed. London: Bailliere Tindal, 1983;460~481.
13. McWater DW. Determination of susceptibility of *Staphylococcus aureus* to methicillin by luciferin-luciferase assay of bacterial adenosine triphosphate. *J App Bacteriol* 1984;56:145~150.
14. Bodenhof J. New antibiotic from BAYER AG b 5009. *Acta Path microbiol second section B* 1971;79:345.
15. Howard JL. *Current Veterinary Therapy*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1981;615~616.
16. 여상건, 최원필. 젖소 유방염에 관한 효모양 진균에 관한 연구. 1. 역학조사. *대한수의학회지* 1982;22:121.