

젖소 목장에서 분리된 황색포도상구균의 아형 분포와 특성

유종현 · 박희명 · 오태호 · 손대호 · 한홍율

서울대학교 수의과대학 내과학교실

(1999년 9월 30일 접수)

Distribution and characteristics of *Staphylococcus aureus* subtypes isolated from dairy herds

Jong-hyun Yoo, Hee-myung Park, Tae-ho Oh, Dae-ho Sohn, Hong-ryul Han

Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Sep 30, 1999)

Abstract : *Staphylococcus aureus* is one of most prevalent intramammary pathogens and have characteristics which are not easily eradicated. Recently, to understand the sources and transmission of *S aureus*, many studies have focused on the subtyping of field isolate. This study was preformed to investigate the distribution pattern and characteristics of the isolates using phenotyping and genotyping.

Samples were collected from milk of each udder, cow bodies (perianal region, vagina, tail, udder skin, sole) and environment (floor, liner, milker's hands, water, towel, insect) from 6 herds located in Kyung-gi province. Forty five strains of *S aureus* were isolated from 3 dairy herds (A, B, C) and were typed by hemolytic pattern, antibiotic resistant pattern, enterotoxin typing and PCR-based DNA fingerprinting. Slime productivity was also compared by each subtype to examine potential infectiousness.

Of 45 strains, 41 were isolated from milk samples and 4 were isolated from liners. No strains isolated in the bodies and environment. Forty five strains isolated were classified as 18 subtypes by phenotyping and genotyping. There was common subtype between A and B herd, but the subtype of C herd showed different pattern. Among predominant subtypes, 60% of *S aureus* strain isolated from A and B herd showed subtype I and 50% of *S aureus* strain isolated from C herd belonged to subtype VI and X II. Neither somatic cell count (SCC) nor slime production was significantly different between predominant and minor subtypes.

In summary, the study revealed that liners play more important roles in the mode of transmission than environmental sources. Several subtypes can be found in a herd, only a few subtype, however, was largely associated with the majority of infection.

Key words : *Staphylococcus aureus*, mastitis, multiplex PCR toxin typing, PCR-based DNA fingerprinting, somatic cell count.

Address reprint requests to Dr. Jong-hyun Yoo, Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University.

서 론

젖소의 유방염은 분방의 염증으로 인해 산유량을 감소시키고 유질을 저하시킴으로써 막대한 경제적 손실을 초래하는 매우 중요한 전염성 질병이다^{6,39}. 특히 *Staphylococcus aureus*는 주요한 전염성 유방염의 원인균의 하나로서 심한 산유량 감소와 유질저하를 가져온다. 또한 유선내로 *S. aureus*가 감염되면 감염분방은 치료가 어렵고 박멸이 매우 어렵기 때문에 이에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다^{24,38,41}. 그러한 연구의 일환으로 *S. aureus*에 관한 역학적 연구가 이루어져 왔는데 이를 수행하기 위해서는 원인균의 생태에 관한 자세한 지식이 필요하고 전파매개물과 전파의 수단을 항상 염두에 두고 있어야 한다¹⁹. 지금까지 *S. aureus*의 젖소 유선내 감염의 주요 전파방식으로 착유시 라이너를 통한 전염이 가장 중요하다고 알려져 왔다^{19,27}. 또한 축사환경이나 곤충, 우체표면에서 중식한 환경성 *S. aureus*의 중요성도 지적되고 있다^{8,16,20,21,24}.

유방염 방제를 수행하는데 있어 원인균에 대한 아형의 분류는 기본적이면서 중요한 골격의 위치에 있다^{8,24}. *S. aureus*를 아형분류하는 방법은 고전적인 phage typing을 포함한 coagulase typing, hemolysis pattern, antibiogram resistant pattern 등 표현형적 분류 및 RELP(restriction fragment length polymorphism) typing, PFGE(pulsed-field gel electrophoresis), MLEE(multilocus enzyme electrophoresis), RAPD(random amplified polymorphic DNA) fingerprinting, ribotyping, plasmid analysis 등 유전자를 대상으로 한 유전형적 분류로 대별되는데 표현형적 분류보다 유전형적 분류가 훨씬 감별능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다^{13,23,31,34}. 이 중 RAPD fingerprinting은 임의의 primer를 이용해 특정 염기서열에 대한 지식이 없이도 DNA의 다형성을 다양하게 나타낼 수 있기 때문에 감별력 및 간편성과 비용절감의 측면에서 우수한 아형분류 방법으로서³⁹ 세균의 유전형 분포, 유전자의 구조와 발달에 관한 연구에도 권장되는 방법이다³⁵.

이러한 여러가지 아형분류의 방법을 이용해 *S. aureus* 감염 우군에서의 다양한 특징들을 밝히려는 노력이 진행되고 있다. 아형의 분포적 특징에서 볼 때 주요 아형과 소수 아형으로 분류된다. Sordillo *et al*²⁸은 우군에서 분리되는 *S. aureus*가 여러 아형으로 분류되지만 그중 한

개 내지 수 개의 아형만이 젖소의 유선내 감염을 일으킨다고 보고하였다. Piccinini *et al*²²은 한 우군내 *S. aureus*가 plasmid pattern에 따라 여러 아형이 분리되었고 그중 한 아형이 99%를 차지한다고 하였다. 병원성에서 *S. aureus*의 아형별로 숙주의 면역방어작용에 대한 저항능력의 차이가 있다. White *et al*³⁷과 Aarestrup *et al*¹은 전염력과 병원성이 강한 *S. aureus* 아형은 유선내 다형핵 백혈구에 대한 탐식작용과 사멸에 저항하는 등 병원성에 관여한다는 특징을 보고한 바 있다.

유방염의 전파에서 문제되는 원인균의 아형과 그 특성을 규명하는 것은 질병 전파경로에 대한 이해를 향상시키고 효과적인 유방염 방제전략을 선택하는데 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다. 또한 국내에서는 다양한 측면에서 유방염에 대한 연구가 있었지만 아직 아형에 대한 구체적인 조사는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 경기도 일부지역 목장에서 분리한 *Staphylococcus aureus*에 대한 아형의 분포양상 및 특성을 밝혀보고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

목장의 선정 및 특성 : 경기도 포천과 수원 및 안성지역 6개 목장을 대상으로 시료를 채취하였다(Table 1). 각 목장의 착유두수는 11마리에서 50마리 사이였으며 착유방식면에서 착유실 방식, 착유후 유두침지, 전착유, 개체타월 사용 등의 차이가 있었다. 각 목장에서 수집한 집합유는 체세포를 기준으로 한 집합유의 유질 면에서 1등급, 2등급 및 3등급으로 분류하였다.

시료 채취방법 : 시료는 크게 유즙과 우체표면, 환경시료로 나누어 채취하였다.

1) 유즙 : 유즙시료의 채취는 NMC(1987) 방법에 준하여 시행하였다. 분방을 물수건이나 스프레이식 분무기로 깨끗이 하고 건조시킨 후 유두표피를 70% 알콜솜으로 잘 닦는 후 처음 몇 젖줄기를 버리고 유두 끝이 손에 닿지 않도록 주의하여 20ml 멀균 샘플병에 낙하세균으로 오염을 최소한으로 막기 위해 45° 기울려 5~15ml 정도 채취하였다. 채취후 최대한 빠른 시간에 냉동팩과 함께 넣고 실험실로 운반하였다.

2) 우체표면 및 환경가검물 : 우체표면의 시료는 항문, 질, 꼬리, 유방피부, 발굽, 비강주위를, 환경가검물은 축사 바닥, 착유실 바닥, 라이너, 착유자의 손, 세척수,

Table 1. Characteristics of Dairy herd

Herd	A	B	C	D	E	F
Area	Pochon	Ansung	Pochon	Suwon	Pochon	Ansung
No. of Milking cow	20	50	26	11	11	40
Bulk milk grade ^a	3rd	2nd	2nd	1st	2nd	2nd
Milking parlor system	Customary	Herringbone	Customary	Herringbone	Herringbone	Customary
Postmilking teat dip	×	×	×	○	○	○
Foremilking discard	○	○	×	○	○	○
Use of separate towel	×	×	×	×	×	○

○ : performed, × : not performed.

^a Each grade is determined by bulk milk somatic cell count(SCC) : 1st grade represent less than 200,000cell/ml. 2nd grade represent between 200,000-500,000cell/ml. 3rd grade represent above 500,000cell/ml.

세척수건, 파리를 대상을 하였다.

항문과 질은 2-5cm 멀균 면봉을 삽입하고 점막과 밀착시켜 잘 문지른 후 가검물을 채취하였다. 파리는 착유시 축사에서 깨끗한 장갑으로 잡은 후 6.5% NaCl 침가 tryptic soy broth(Difco Laboratories)에 넣었다. 나머지 가검물에 대해서는 멀균 면봉으로 채취부위를 충분히 점축시킨 후 6.5% NaCl 침가 tryptic soy broth에 넣었다.

균분리동정방법 : 실험실에 운반된 유즙과 가검물은 NMC 원장방법(1987)에 준하여 *S aureus* 분리작업을 시행하였다.

Loop를 이용해 유즙 샘플을 5% 우혈액 배지에 접종후 37℃에서 24시간 배양하여 황색으로 착색된 집락을 대상으로 카탈레이즈 검사와 그람염색을 하였다. 그람양성 구균이면서 카탈레이즈 양성인균을 대상으로 coagulase test 및 Mannitol salt agar에서 배양을 하였다. Coagulase test는 토끼 혈장 0.5ml에 균집락을 따서 섞은 후 37℃에서 배양하였고 접종후 4시간 이내에 응고되지 않는 경우 18시간에서 최대 24시간까지 추가 배양하여 응고여부를 관찰하였다. DNase test는 DNase agar(Difco Laboratories)에 접종하여 18시간 배양후 1N 염산을 떨어뜨려 집락 주위가 투명하게 변하면 DNase 양성으로 판독하였다. 위의 진단방법에 모두 양성인 균을 황색포도상구균으로 확진하였다.

체세포수 : 냉장상태로 운반된 유즙을 12시간 이내에 Fossomatic 90 somatic cell counter[®](Foss Electric, Denmark)를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

Antibiogram : Kirby-Bauer 방식에 따라 Disk diffusion

method에 의한 항생제 감수성 양상 시험을 하였다⁴. 혈액배지상의 순수집락을 적당량 따라 Muller-Hinton broth (Difco Laboratories)에 8시간 정도 배양하였다. 배양액의 탁도가 0.5 MacFarland 표준용액과 비교하여 배양액의 균농도가 10⁸/ml에 이르면 Muller-Hinton agar 표면에 멀균 면봉을 이용하여 도포하였다. 균 배양액이 도포된 Muller-Hinton agar에 11개의 항생제 감수성 디스크를 놓고 18시간 배양후 억제대의 직경에 따라 항생제에 대한 저항성과 감수성, 중정도를 평가하였다. 항생제 감수성 디스크(Difco Laboratories)는 Streptomycin 10mcg, Gentamicin 10mcg, Tetracycline 30mcg, Novobiocin 30mcg, Penicillin G 10 units, ampicillin 10mcg, oxacillin 1mcg, kanamycin 30mcg, Trimethoprim 1.25mcg/Sulfamethoxazole 23.75mcg, Erythromycin 15mcg, Cephalothin 30mcg을 사용하였다.

PCR-based DNA fingerprinting :

1) DNA 추출 : DNA 추출은 Takeuchi *et al*³⁰과 Murray & Thompson¹⁷이 기술한 방법들을 수정하여 사용하였다. 순수분리된 균주를 tryptic soy broth 1.5ml에 접종하여 37℃ 진탕배양기에서 overnight 배양한 후 12,000g 5분간 원심분리하였다. 침전된 pellet을 TE buffer(pH 8.0) 700μl로 2회 세척하고 TE buffer 565μl로 재부유시켰다. 30μl의 20% Sodium dodecyl sulfate(Sigma), 5μl의 Proteinase K (20mg/ml in DW ; Sigma), 50μl의 Lysostaphin(200μl/ml, Sigma)를 첨가하고 37℃에서 90분간 배양하였다. 배양후 100μl의 5M NaCl와 80μl의 CTAB/NaCl(10% cetyltrimethyl ammonium bromide w/v 0.7M NaCl ; Sigma)을 혼합하고 65℃ 20분간 배양한 후 12,000g에서 15분간 4℃에서 저

은 원심분리하였다. 상층액을 버리고 750 μ l TE buffer로 부유시킨 후 양의 phenol 추출법을 이용하여 분리하였다.

2) Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)

PCR : Primer는 RAPD AP3 primer(5'-TCA-CGA-TGC-A-3'; (주)바이오니아)¹⁵를 사용하였다. PCR의 방법은 van Belkum *et al*³⁹ 기술한 방법을 수정하여 사용하였다. DNA 100ng, 최종 MgCl₂ 농도 3.5mM, primer 100pmol, 최종 dNTP 농도 0.2mM, PCR buffer(Mg²⁺ free, Promega) 5 μ l, Taq ploy-merase(Promega) 3U, 최종 반응액 용적이 50 μ l가 되도록 중류수를 첨가하였다. GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Co., USA)를 이용하여 94°C 1분, 25°C 1분, 74°C 2분을 1 cycle로 하여 39 cycle을 시행하였다.

1.5% agrose gel(Gibco BRL)에 2 μ l의 loading buffer를 포함한 PCR product 14 μ l를 100V에서 4시간 전기영동을 시행하였다.

Enterotoxin typing : 분리된 총 45주의 *S aureus*에 대하여 multiplex PCR enterotoxin typing 방법을 사용하여⁴² sea (staphylococcal enterotoxin A), seb (staphylococcal enterotoxin B), secI (staphylococcal enterotoxin C1), sed (staphy-

lococcal enterotoxin D), see (staphylococcal enterotoxin E), tst (toxin shock syndrome toxin)를 검사하였다.

결 과

목장별 *S aureus*의 분리를 : 경기도의 총 6개 목장을 대상으로 유즙내 및 환경에 존재하는 *S aureus*를 검사한 결과 A, B, C 목장에서만 *S aureus* 가 분리되었고 D, E, F 목장에서는 분리되지 않았다(Table 2). 모든 *S aureus*는 유즙과 라이너에서만 분리되었으며 우체표면이나 환경에서는 분리되지 않았다. A, B, C 목장의 개체우 *S aureus* 분리율은 각각 30%, 5%, 54%였다(Table 3). A와 C목장의 라이너에서 *S aureus* 가 분리되었는데 A목장에서 분리된 라이너는 같은 분방에서 *S aureus* 가 분리되었으며, C목장에서는 2개의 라이너와 분방에서 동시에 *S aureus* 가 분리되었고 1개의 라이너에서는 분방에서 분리되지 않고 *S aureus* 가 분리되었다.

Antibiogram과 혈액배지상의 용혈양상 : Antibiogram 상에서 저항성이 있는 항생제의 첫 대문자를 따서 PA,

Table 2. Distribution of *S aureus* isolated from 6 dairy herds

Herd	A	B	C	D	E	F	Total
Milk	9	1	30	- ^a	-	-	40
Rectum	-	-	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	-	-	-	-	-
Tail	-	-	-	-	-	-	-
Udder skin	-	-	-	-	-	-	-
Sole	-	-	-	-	-	-	-
Muzzle	-	-	-	-	-	-	-
Floor	-	-	-	-	-	-	-
Teatcup liner	1	-	3	-	-	-	4
Feed	-	-	-	-	-	-	-
Milker's hand	-	-	-	-	-	-	-
Water	-	-	-	-	-	-	-
Towel	-	-	-	-	-	-	-
Fly	-	-	-	-	-	-	-
Bulk milk	-	-	1	-	-	-	1

^a not isolated.

Table 3. Distribution of *S. aureus* in the quarter milks and teat cup liners

Herd	A	B	C	Total
No. of sampling cow	20	20	26	66
No. of cow that <i>S. aureus</i> isolated	6(30%)	1(5%)	13(54%)	20
1	4	1	7	12(60%)
No. of udder that <i>S. aureus</i> isolated	2	1	— ^c	6(30%)
3	1	—	1	2(10%)
4	—	—	—	—
Total no. of udder <i>S. aureus</i> isolated	9	1	20	30
No. of liner of <i>S. aureus</i> isolated	1	—	3	4
No. of cow that <i>S. aureus</i> isolated in both liner and milk	1	—	2	3(3-20)

^a(no. of cow that *S. aureus* isolated/No. of sampling cow) × 100.

^b(no. of udder that *S. aureus* isolated/no. of udder of cow that *S. aureus* isolated.) × 100.

^cnot isolated.

GPAK, GPAKE, GTPAK, GTPAOKEC의 5개 아형으로 분류하였다(Table 4). A목장은 모두 PA group에 속하였고,

Table 4. Subtypes by antibiogram patterns in 3 herd

Group	No. of strains isolate from 3 herd			
	A	B	C	Total
PA	10	— ^a	—	10
GPAK	—	1	29	30
GPAKE	—	—	1	1
GTPAK	—	—	1	1
GTPAOKEC	—	—	3	3
Total	10	1	34	45

^anot isolated.

B목장과 C목장은 GPAK가 상대적으로 다수를 차지하였다. 우혈액배지상의 용혈양상에 따라 $\alpha\beta$, β , (용혈없음)의 3가지로 구분되었다(Table 5).

Enterotoxin typing : Multiplex PCR Enterotoxin typing 결과 총 45주의 *S. aureus* 중 20주(44%)가 *sea*와 *sec*를 동시에 산생하였으며 *sed*는 6주(13%), *see*는 1주(2%), *tst*는 2주(4%)가 산생하였다. *seb*는 검출되지 않았다(Fig 1, Table 6).

Table 5. Hemolytic patterns of *S. aureus* on the blood agar

Hemolytic pattern	No. of strains isolate from 3 herd			
	A	B	C	Total
$\alpha\beta$	9	1	31	41
β	1	— ^a	2	3
No hemolysis	—	—	1	1
Total	10	1	34	45

^anot hemolysis.

Table 6. Enterotoxin typing of *S. aureus*

Group	No. of strains isolate in 3 herd			
	A	B	C	Total
<i>sea</i> , <i>sec</i>	8	1	11	20
<i>sed</i>	— ^a	—	6	6
<i>see</i>	—	—	1	1
<i>tst</i>	—	—	2	2
Not detected	2	—	14	16
Total	10	1	34	45

^anot isolated.

sea : staphylococcal enterotoxin A, *sec* : staphylococcal enterotoxin C, *sed* : staphylococcal enterotoxin D, *see* : staphylococcal enterotoxin E, *tst* : toxin shock syndrome toxin.

Table 7. Genotyping by PCR-based DNA fingerprinting

Group	No. of strains isolate in 3 herd			
	A	B	C	Total
i	9	1	-	10
ii	1	-	-	1
iii	-	-	7	7
iv	-	-	2	2
v	-	-	5	5
vi	-	-	17	17
vii	-	-	3	3
Total	10	1	34	45

Fig 1. Multiplex PCR enterotoxin typing.

(a) lane 1: pGEM® DNA Markers, lane 2: *seb*, *see*, *tst* producer, lane 3: blank, lane 4: strain 40(*tst* producer), lane 5: strain 42(*tst* producer), lane 6: strain 43(*see* producer), lane 7: strain 39(non-toxin producer), lane 8: strain 41(*sed* producer). (b) lane 1: pGEM® DNA Markers, lane 2: *see* producer, lane 3: *sec* producer, lane 4: *sed* producer, lane 5: strain 6(*sea* & *sec* producer), lane 6: strain 19(*sea* & *sec* producer), lane 7: strain 26(*sed* producer), lane 8: strain 30(*sed* producer), lane 9: strain 14(*sed* producer), lane 10: blank.

DNA PCR fingerprinting : DNA PCR fingerprinting 기법을 이용하여 총 45주의 *S aureus*를 7개 유전형적 아형으로 분류할 수 있었다(Table 7, Fig 2). A와 B우군에서는 전체 11주중 10주(91%)가 i 아형에 속하였으며, C우군에서는 34주중 24주(71%)가 iii 아형과 vi 아형에 속하였다.

최종 아형분류 결과 : 45주의 *S aureus*를 용혈양상과,

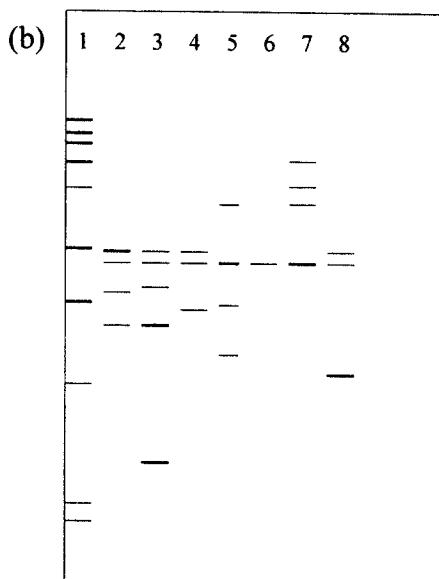


Fig 2. Polymorphism of *S aureus* using RAPD AP3 primer.

(a) lane 1 : 1 kbp ladder marker, lane 2 : genotype i, lane 3 : genotype ii, lane 4 : genotype iii, lane 5 : genotype iv, lane 6 : genotype v, lane 7 : genotype vi, lane 8 : genotype vii. (b) Representative view of different genotype patterns.

항상제 저항성 패턴, enterotoxin type, 유전형적 아형에 따라 최종 아형분류를 한 결과, 모두 18개 아형으로 나눌 수 있었다(Table 8). A우군에서 *S aureus* 10주중 6주(60%)가 아형 I에 속하였고, C우군에서는 7주가 아형 VI, 10주가 아형 X II에 속하여 총 34주중 17주(50%)가 아형 VI과 영형 X II에 속하였다. 아형 I과 아형 VI 및 아형 X II을 주요 아형으로 분류하고 나머지 아형은 소수 아형으로 분류하였다.

Table 8. Final subtyping by phenotype and genotype

Group	No. of strain isolate in 3 herd			
	A	B	C	Total
I	6	-	-	6
II	1	-	-	1
III	2	-	-	2
IV	1	-	-	1
V	-	1	-	1
VI	-	-	7	7
VII	-	-	1	1
VIII	-	-	3	3
IX	-	-	1	1
X	-	-	2	2
XI	-	-	1	1
XII	-	-	10	10
XIII	-	-	4	4
XIV	-	-	1	1
XV	-	-	1	1
XVI	-	-	1	1
XVII	-	-	1	1
XVIII	-	-	1	1
Total	10	1	34	45

아형과 체세포수 : 주요 아형(I, VI, X II)과 소수 아형(II-V, VII-X I, X III-X VII)의 *S aureus*에 감염된 분양의 체세포수를 linear score로 바꾸어 median test로 비교 분석하였을 때 median p = 0.3483(p > 0.05)으로 주요 아형

과 소수 아형 사이에 차이가 없었다.

고 칠

*S aureus*는 매우 전염성이 높은 유방염의 원인균으로서 관리상태가 좋고 체세포가 낮은 목장에서 조차 일단 우군 안에 도입되면 박멸하기 매우 어렵다^{12,26}. *S aureus*의 전염원과 전염양식을 밝히기 위해 아형을 이용한 여러 연구들이 이루어져 왔다. 특히 착유경험이 없는 처녀우의 체표면에 *S aureus*의 증식이 *S aureus* 유선내 감염의 위험성을 증가시킨다고 하였다²⁴. 유두표피와 라이너 외에 *S aureus*가 발견되는 곳은 축사, 사료, 젖소 이외의 혼사하는 동물, 착유기내의 기류, 비강주위, 피모, 질, 항문주위이며 전염율이 높은 우군에서는 깔짚이나 곤충, 음수에서도 발견되는데 깔짚이나 사료는 중요한 전염원이 아닌 것으로 보고되었다^{16,24}. 또 Horn fly가 *S aureus* 유선내 감염의 직접적인 원인임이 증명되었고²¹ 처녀우에서 파리가 여름 유방염의 주된 감염원으로서 역할을 한다고 RAPD fingerprinting를 통해 밝혀졌다²¹. 목장 작업자의 *S aureus*가 같은 목장에서 검출된 유즙내 *S aureus*와 관련성 높은 RFLP type을 나타내었고²⁹ phage typing을 통해 *S aureus* 유선내 감염에서 분리된 균주가 사람과 관련성 있는 아형이 있다고 보고²된 한편 MLEE를 통해 사람과 젖소에서 분리된 균주간에 상관관계가 거의 없음을 보고하기도 했다¹⁴. 이렇듯 환경성 유방염의 중요성에 대해 많이 보고되었지만 대조적인 입장을 보이는 보고도 있다. *S aureus*의 어떤 균주는 항문 주위와 질에서 증식할 수 있으나 유두 주위의 집락이 더 문제라고 하였다¹⁹. 또 유두컵이 환경중 *S aureus*가 발견되는 유일한 환경이고 56샘풀중 8샘풀이 역류세척한 후 유두컵 라이너에서 발견되었다²⁷. 이와같은 결과는 본 연구에서도 라이너 이외에 다른 환경부위에서 *S aureus*가 분리되지 않은 결과와 일치한다. 본 실험에서는 유즙 이외의 여러 환경에서 *S aureus*를 분리하였으나 라이너에서만 유일하게 분리되었다. *S aureus*는 전형적인 창상감염원으로서 지난 수십년간 착유방식이 손착유에서 기계착유로 바뀌고 벗집 축사바닥에서 콘크리트 축사바닥으로 바뀌어 유두가 손상받을 기회가 많아지면서 *S aureus* 유선내 감염이 급속히 증가하였다¹⁸. *S aureus*의 라이너를 통한 전파는 그 방제방법에서 다른 여러 방법보다 착유후 유두침지가 가장 효과적이다라는 보고를 통해서도 그 중

요성을 확인할 수 있다^{5,9,11,40}. 본 연구에서도 라이너를 통한 전파의 중요성을 *S aureus*가 문제되는 3개의 목장과 문제되지 않는 3개의 목장간의 뚜렷한 관리방식의 차이가 착유후 유두침지의 유무에 있음으로 보아 유추할 수 있다. 환경성 *S aureus*에 대한 의견의 차이는 방목과 축사내 사육 같은 사육방식의 차이¹⁶ 및 *S aureus* 균주간의 고유의 특성 차에 의한 것으로 사료된다. 따라서 본 연구의 실험대상 목장들이 모두 축사내 사육방식이므로 환경에서의 *S aureus* 분리율에 영향을 주었을 가능성도 배제할 수 없다.

본 연구에서는 *S aureus*를 아형분류하기 위하여 항생제 감수성양상, 혈액배지상의 용혈양상, RAPD PCR fingerprinting을 실시하였다. 사람이나 젖소 유방염의 감염균인 *S aureus*에 사용되는 표현형 분류방법으로 항생제 감수성양상, capsular polysaccharide, ELISA based typing, phage typing, automated biochemical profiling이 있지만 판별력과 안정성 면에서 좋지 않다고 보고되었다³⁴. 그동안 세균의 phage typing이 *S aureus*의 역학에 있어서 광범위한 아형분류방법으로 사용되어 왔지만 비용이 많이 들며 다른 유전형 분류법에 비해 판별력이 높은 것도 아니다³¹. 그에 비해 RAPD PCR fingerprinting는 임의의 염기순서로 짜여진 짧은 한가지 primer를 이용하여 전체 genome중 임의의 부분들을 증폭시키는 방법이다²⁵. 이 방법은 매우 경제적이고 정확하게 균종을 동정할 수 있고 genetic map를 구성하는데도 활용할 수 있다^{36,39}. RAPD fingerprinting은 이미 여러 연구에서 *S aureus*를 typing 하는데 효과적인 것으로 보고되었고^{24,29} PFGE가 RAPD fingerprinting보다 판별력이 좀더 높다는 보고²⁵ 이외에는 다른 방법보다 정확하다고 알려져 있다. 본 실험의 결과에서도 DNA fingerprinting과 다른 아형분류방식과 대체로 일치하였고 C우군에서 용혈양상과 항생제 저항성 양상이 같은 것들은 아형 v와 vi로 구별해주어 표현형적 아형분류방식보다 판별력이 더 좋은 것을 알 수 있다.

본 연구에서 *S aureus*의 한 아형 또는 두 개의 아형이 한 우군에서 대다수를 차지하며 주요 아형과 소수 아형이 분명히 구별되었다. 이것은 다른 연구자 및 유방염의 원인균 아형에 관한 연구에서도 비슷한 보고를 하였다¹

^{14,22} 북유럽에서 *S aureus*의 주된 아형이 나라마다 다르다는 것이 관찰되기도 하였다². *S aureus*는 많은 아형으로 나누어지지만 수 개의 아형만이 젖소 유선내에 감염

을 일으킬 수 있다고 하였다²⁸. 또한 *Streptococcus dysgalactiae* 등의 다른 세균의 감염연구에서도 1개 또는 두 개의 아형이 우군 감염의 대부분에 관여함이 보고되었다²⁰.

여러 아형의 균주 중 한 개 또는 2개의 아형만 주로 집단감염에 관여하는지 확실한 이유를 밝힌 연구는 없지만 몇가지 추정들이 있다. 첫째, 장기간 치료제를 사용할 경우 이에 의한 선택적인 압력을 들 수 있다. Vicenzoni et al³³은 오랫동안 치료에 실패한 우군에서 한 아형이 많이 나타났는데 이것은 치료제의 선택적 압력에 의해 항생제 저항성이 강한 아형들만 증식했을 것이라고 하였다. 둘째, *S aureus*의 아형중에서 원래 사람 유래균이 있을 경우 숙주가 달라지기 때문에 전파력과 병원성 면에서 약할 수 있다는 것이다. Newbould¹⁹은 *S aureus* 66주중 24주는 사람 유래로 생각되며 전파력이 약하다고 하였다. 또한 사람 유래의 *S aureus*가 젖소 유선내에 감염이 성립되어도 전파되기는 매우 드문 경우라고 하였다⁷. 본 연구에서 제41, 42, 43주가 다재 내성을 보이는데 체세포수는 매우 낮았다(본문에는 제시하지 않았음). 계속적인 관찰이 요구되지만 다른 개체우로 전파되지 않고 크게 병원성을 일으키지 않는 점에서 사람 유래의 균일 가능성도 배제할 수 없다. 셋째, 아형 자체의 특성으로 Aarestrup et al¹은 소수 아형의 세포벽의 밖에 receptor-compatible carbohydrate가 차지하는 부분이 많아 다형핵백혈구 공격에 쉽게 사멸할 수 있다고 가정하였다. Aarestrup et al¹은 또한 주요 아형일수록 숙주의 면역에 저항하는 능력이 크다고 보고하였는데 Myllys et al¹⁸은 이러한 숙주면역에 저항하는 능력이 손착유에서 기계착유로 바뀌면서 증가하였다고 가정하였다. 즉, 라이너의 인공고무가 이물역할을 하여 세균이 유즙내에서 biofilm type으로 증식하도록 적응시킬 수 있다는 가정을 하였다.

체세포면에서 주요 아형과 소수아형간의 체세포를 비교하는 것은 유의성이 없었다. 이는 Piccinini et al²²이 보고한 것 같이 높은 전염력이 가진 신규 아형의 감염이 오히려 이전의 아형보다 병원성이 낮다고 보고와도 상통한다. 체세포수의 증감은 *S aureus*의 전파력보다도 enterotoxin 등의 다른 병원성 인자에 의해 영향을 받을 것으로 사료된다.

결 론

우리나라 젖소 우군의 환경과 유즙에서 분리한 *S aureus* 를 용혈양상, 항생제 저항성 패턴을 포함한 표현형적 아형분류와 enterotoxin typing과 PCR-based DNA fingerprinting 기법을 이용한 유전형적 아형분류를 통한 *S aureus* 의 역학적 특성을 규명하고자 한 본 연구의 결과는 다음과 같다.

3개 우군에서 45주의 *S aureus* 를 분리했으며, 이중 40주는 유즙에서, 1주는 집합유에서, 4주는 유두컵 라이너에서 분리한 것이었고 우체부위와 환경에서는 분리되지 않았다.

분리된 45주의 *S aureus* 를 표현형적 아형분류와 유전형적 아형분류를 실시한 결과 총 18가지의 아형으로 분류되었다. A와 B 우군은 공통된 아형을 공유하였고 C우군은 다른 아형을 나타내었다. A우군에서 분리된 10주 중 6주가 아형 I에 속하였고 C우군에서 분리된 34주 중 17주가 아형 VI과 X II에 속하여 주요 아형과 소수 아형으로 구분되었다.

본 연구를 통해 젖소 우군에서 상재하는 *S aureus* 의 전파양식으로서 환경에서의 감염보다 라이너를 통한 *S aureus* 의 감염이 매우 중요함을 알 수 있었다. 또한 한 우군 내에서 *S aureus* 의 여러 아형이 발견되었으며 한 개 내지 수 개의 아형이 대부분의 감염에 관여하는 것으로 관찰되었다.

참 고 문 현

1. Aarestrup FM, Scott NL, Sordillo LM. Ability of *Staphylococcus aureus* Coagulase Genotypes to Resist Neutrophil Bactericidal Activity and phagocytosis. *Infect Immun*, 62(12):5679-5682, 1994.
2. Aarestrup FM, Wegener HC., Jensen NE, Jonsson O, Mylllys V, Thorberg BM, Waage S, Rosdahl VT. A Study of phage-and Ribotype Patterns of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in the Nordic Countries. *Acta Vet Scand*, 38(3):243-252, 1997.
3. Anonymous. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. *National Mastitis Council*, Arlington, VA, 1987.
4. Bauer AW, Kierby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk method. *Am J Clin Pathol*, 45(4):493-496, 1969.
5. Bushnell RB. The Importance of Hygienic Procedures in Controlling Mastitis. *Vet Clin North Am : Large Animal Practice*, 6(2):361-370, 1984.
6. Craven N. Efficacy and Financial Value of Antibiotic Treatment of Bovine Clinical Mastitis during Lactation - a Review. *Br Vet J*, 143(5):410-422, 1987.
7. Devriese LA, Hommez J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci*, 19(1):23-27, 1975.
8. Enevoldsen C, Grohn YT, Thysen I. Dairy cow Characteristics related to *Staphylococcus aureus* isolation from quarter samples. *J Dairy Res*, 62:69-81, 1995.
9. Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spencer SB. Herd Management and Prevalence of Mastitis in Dairy Herds with High and Low Somatic Cell Counts. *JAVMA*, 190(11):1411-1416, 1987.
10. Galliani S, Viot M, Cremieux A, Van der Auwera P. Early adhesion of bacteremic strains of *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene : influence of hydrophobicity, slime production, plasma, albumin, fibrinogen, and fibronectin, *J Lab Clin Med*, 123(5):685-692, 1994.
11. Goodger WJ. Benefits and Costs of a Control Program for an Epizootic of *Staphylococcal aureus* Mastitis. *JAVMA*, 190(10):1284-1287, 1987.
12. Hoblet KH, Bailey JS, Pritchard DE. Coagulase-positive staphylococcal mastitis in a herd with low somatic cell counts. *J Am Vet Med Assoc*, 192(6):777-780, 1988.
13. Jayarao BM, Gillespies BE, Oliver SP. Application of Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting for Species Identification of Bacteria Isolated from Bovine Milk. *J Food Prot*, 59(6):615-620, 1996.
14. Kapur V, Sischo WM, Greer RS, Whitham TS, Musser JM. Molecular Population Genetic Analysis of *Staphylococcus aureus* Recovered from Cows. *J Clin Microbiol*, 33(2):376-380, 1995.
15. Lipman LJ, de Nijs A, Lam TJ, Rost JA, van Dijk L, Schukken YH, Gaastra W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. *Vet Microbiol*, 48(1-2):51-55, 1996.
16. Matos JS, Whites DG, Harmon RJ, Langlois BE. Iso-

- lation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other than the Lactation Mammary Gland. *J Dairy Sci*, 74 (5): 1544-1549, 1991.
17. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:4321-4325. 1980.
 18. Myllys V, Honkanen-Buzalski T, Huovinen P, Sandholm M, Nurmi M. Association of Changes in the Bacterial Ecology of Bovine Mastitis with Changes in the use of Milking Machines and Antibacterial Drugs. *Acta Vet Scand*, 35(4):363-369, 1994.
 19. Newbould FH. Epizootiology of Mastitis Due to *Staphylococcus aureus*. *JAVMA*, 153(12):1683-1687, 1968.
 20. Oliver SP, Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC. DNA Fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from Horn Flies and Frome Mammary Secretions of Heifers. *Natl Mas Counc Annu Meet Proc*, 258-259, 1997.
 21. Owens WE, Oliver SP, Gillespie BE, Ray CH, Nickerson SC. Role of Horn Flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced Mastitis in Dairy Heifers. *AJVR*, 59(9):1122-1124, 1998.
 22. Piccinini R, Moroni P, Zepponi A, Zecconi A. Practical application of Plasmid Fingerprinting in the Control of *Staph aureus* Mastitis. *Natl Mas Counc Annu Meet Proc*, 265-266, 1997.
 23. Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA Fingerprinting by Pulsed-Field Gel Electrophoresis is More Effective than Ribotyping in Distinguishing among Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol*, 30(4):967-973, 1992.
 24. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM. Ecology of *Staphylococcus aureus* Isolated form Various Sites on Dairy Farms. *J Dairy Sci*, 77(11):3354-3364, 1994.
 25. Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andremont A. Random Amplified Polymorphic DNA Assay is Less Discriminant than Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 31(4):982-985, 1993.
 26. Schukken YH, Vanvliet J, Vandegoor D, Grommers FJ. A randomized blind trial on dry cow antibiotic infusion in a low somatic cell count herd. *J Dairy Sci*, 76(10):2925-30, 1993.
 27. Smith TH, Fox LK, Middleton JR. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. *JAVMA*, 212(4):553-556, 1998.
 28. Sordillo LM, Scott NL, Aarestrup FM. *Staphylococcus aureus* Genotypes Show Variable Resistance to Neutrophil phagocytosis and killing. *Natl Mas Counc Annu Meet Proc*, 148-149, 1995.
 29. Tambic A, Power EG, Talsania H, Anthony RM, French GL. Analysis of an Outbreak of Non-Phage-Typable Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Using a Randomly Amplified Polymorphic DNA Assay. *J Clin Microbiol*, 35(12):3092-3097, 1997.
 30. Takeuchi SK, Ishiguro M, Ikegami T, Kaidoh, Hayakawa Y. Detection of toxic shock syndrome toxin-1 gene in *Staphylococcus aureus* bovine isolates and bulk milk by the polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 58 (11):1133-1135, 1996.
 31. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 32 (2):407-415, 1994.
 32. van Belkum A, Bax R, Peerbooms P, Goessens WH, van Leeuwen N, Quint WG. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 31(4):798-803, 1993.
 33. Vicenzoni G, Piccinini R, Ben CD, Bronzo V, Zecconi A. Phenotypic and Genotypic characteristics of *Staph aureus* Strains Isolated from Clinical and Subclinical Mastitis. *BCVA Edinburgh* 302-305, 1996.
 34. Wallace RL, Hoblet K, Hogan J. Strain typing *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infections using Antibiograms, Biochemical Profiles and DNA Fingerprinting. *Natl Mas Counc Annu Meet Proc*, 260-262, 1997.
 35. Wang G, Whittam TS, Berg CM, Ber DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus

- enzyme elestrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Research* 21(25):5930-5933, 1993.
36. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting Genomes using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24):7213-7218, 1990.
37. White EA, Paape MJ, Weinland BT, Mather IH. Virulence of Three Strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Clinically Infected Bovine Mammary Glands. *J Dairy Sci*, 63(7):1128-1133, 1980.
38. White G. An Attempt to Control the Spread of Staphylococcal Mastitis in Two Herds by Segregation and Culling. *Vet Rec*, 77(47):1384-1386, 1965.
39. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535, 1990.
40. Wilson CD, Richards MS. A Survey of Mastitis in the British dairy herd. *Vet Rec*, 106:431-435, 1980.
41. Wilson DJ, Gonzalez RN, Sears PM. Segregation or Use of Separate Milking Units for Cows infected with *Staphylococcus aureus* : Effects on Prevalence of Infection and Bulk Tank Simatic Cell Count. *J Dairy Sci*, 78(9):2083-2085, 1995.
42. 윤장원. Development of multiplex PCR for toxin-typing of Staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, E and TSST-1. 서울대학교 수의학 석사학위논문, 1997.