

## TTC II 검사방법을 이용한 유방염치료제의 최소검출농도

조옥숙, 도재철, 김기철\*, 이상명\*, 정종식

경상북도가축위생시험소, 경상북도가축위생시험소 서부지소\*

### The detection limits to antibiotic drugs in treatment of mastitis by TTC II redution test

Ok-Sook Cho, Jae-Cheul Do, Gi-Cheol Kim\*,  
Sang-Myeng Lee\*, Jong-Sik Jyeong

Kyongbuk Veterinary Service Laboratory,  
Western Branch, Kyongbuk Veterinary Service Laboratory\*

#### Abstract

The study was investigated detectable limits of antibiotic drugs in treatment of mastitis by TTC II reduction test. The detectable limits of antibiotic drugs by TTC II reduction test were summarized as follows,

1. Detectable limits to compounds drugs were higher than those of monodrugs.
2. Detectable limits to ointments were lower than injections.

Key words : TTC II reduction test, Mastitis, Antibiotics

#### 서 론

우유는 오랜 옛날부터 건강식품으로는 물론 영양학적으로도 영양소를 가장 골고루 갖춘 완전식품으로 인정되어 왔지만, 다른 어떤 식품보다도 변패나 부패가 쉽고 인수공통전염병을 매개하는 역할을 함으로써 우유위생이 강조되어 왔을 뿐만 아니라 근래에는 질병의 예방 및 치료와 생산성 향상을 목적으로 첨가되는 항균성물질의 우유 중 잔류문제로 인한 공중보건상 주요한 관심사로 대두되어 왔다<sup>1)</sup>. 특히 낙농산

업의 급속한 발달에 따라 낙농업의 규모나 사육두수는 증가되었으나 젖소의 유방염은 고품질 원유생산의 가장 큰 적으로서 젖소 질병 중 낙농가와 낙농산업에 가장 큰 경제적 손실을 초래하는 단일 질병이다. 낙농산업 발전에서 유방염의 치료를 위한 항생제의 오·남용은 약제내성의 문제뿐 만 아니라 유즙내 잔류로 인한 공중보건의 위해 요소가 되고 있다<sup>2)</sup>.

항생물질은 열에 대단히 안정되므로 일반적인 시유나 유제품의 살균조건에서는 거의 파괴되지 않고 그대로 잔류하며<sup>3)</sup>, 항균물질이 함유

된 우유를 매일 마실 경우 인체내에 항생물질의 내성균이 출현하고<sup>4)</sup>, 항생물질 과민증(ana-phylaxis)이 되거나 혹은 장내 세균총을 불안정하게 하며 조혈기계의 장애, 간장염, 신장염, 면역체형성 저해, 청각 및 시각장애<sup>5)</sup>, 발암성 등 많은 부작용에 대한 연구가 보고된 바가 있다<sup>6)</sup>.

이와 같은 유해성 때문에 그 잔류여부를 검사하는 방법으로 high performance liquid chromatograph (HPLC), gas chromatograph (GC), thin layer chromatograph (TLC), enzyme immunoassay, radioimmuno receptor assay 및 생물학적 방법이 이용되고 있는데, 우리나라에서는 원유 중 세균발육억제물질 검사법으로 생물학적 방법을 이용한 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride(TTCII) 환원시험법을 공인시험법으로 채택하고 있으며<sup>7)</sup> 이 방법에 의해 양성반응을 나타낸 원유는 폐기와 동시에 당해 목장에 대해 3일간 납유를 금지시키고 있다.

현재 수의학분야에서 특히 유방염에 많은 양의 항생제를 사용하고 있어 사람과 동물에 약제잔류와 세균의 내성발현과 내성유전자 전달 때문에 공중보건학적 위해와 감염병의 치료에 큰 문제가 되고 있다. 유방염의 치료를 위해서 항생제의 사용은 피할 수 없는 실정이지만 정확한 진단을 한 것에 대해서만 사용해야 한다<sup>8)</sup>.

본 실험은 TTCII 검사법을 이용하여 현재 시판되고 있는 다양한 유방염 치료제의 최소검출농도를 측정하여 원유위생의 기초자료로 제공하고자 실시 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

본 실험에 사용한 우유는 멸균된 skim milk (Difco)이다.

Table 1. Used antibiotics (injection) in treatment of mastitis

Drugs	Concentration of original drugs (mg/ml)	Manufacturer
Ampicillin (AM)	200	Bayer(Binotal)
Gentamicin (GM)	50	Shinil chem(Gentamicin)
Kanamycin (KM)	100	Green-cross(Kanamycin)
Penicillin (PG)	1,000,000 IU*	Sigma
Enrofloxacin (ENR)	50	Bayer(Baytril)
Sulfadimethoxine (SUD)	400	Green-cross(Sulfa-40)
Streptomycin (SM)	200	Jonggundang(Stremptomycin)
Amikacin (AK)	250	Korea Unite
Oxytetracycline (OT)	50	Pfizer(Oxytetracycline)
Tylosin-chloramphenicol	TY50-CM200	Samyang(Tylocetin)
Spiramycin-colistin sulfate	SP100-CL10,000 IU	Handong(Kopamycin)
Spiramycin-streptomycin	SP100-SM200	Shinil(Spitocin)
NND PenicillinG	100,000 IU	Bayer(Tardomyocel-Comp II)
Procaine penicillinG	25,000 IU	
Dihydrostreptomycin sulphate	125,000 IU	

\* IU : International unit

Table 2. Used antibiotics (ointment) in treatment of mastitis

Drugs	Concentration of original drugs	Manufacturers
ENR-PG*	200 mg-1,590,000 IU/7.5 g	Bayer(Baytril)
CP-NOR	250 mg-200 mg/10 g	Daesung(Nophazine)
Gentamicin (GM)	7mg/g	Daesung(Gentamicin cream)
SP-AM-SM	10 mg-10 mg-15 mg/g	Handong(Spiramasty)
CP-NM	10 mg-10 mg/g	Handong(Cephamasty)
NND Penicillin G	100,000 IU	Bayer(Tardomyocel)
Procaine penicillin G	100,000 IU	
Dihydrostreptomycinsulphate	500 mg	

\*PG : Penicillin, CP : Cephalexin monophydrate, NOR : Norfloxacin, SP : Spiramycin, NM : Neomycin.

#### 시험균주

*Streptococcus thermophilus*를 10% 탈지유배지 (Difco)에 37°C 12시간 계대배양 한 후 이 균액을 10% 탈지유배지에 1 : 1 (v/v) 혼합하여 시험균액으로 사용하였다.

#### 유방염 치료약제

낙농가에서 일반적으로 사용하는 유방염치료제를 Table 1 및 Table 2와 같이 선정하여 실험에 사용하였다.

#### TTCII용액

4g의 TTCII를 취해 100 ml의 멸균증류수로 녹여 4%용액을 조제하여 4°C 냉장보관하면서 2주간 사용하였다.

#### TMP용액

50 mg의 TMP를 100 ml 용량의 플라스크에 취해 methanol 10 ml에 녹이고 멸균증류수를 가하여 500 µl/ml가 되게 한 후 1주일간 냉장보관하면서 멸균증류수로 10배 희석하여 50 µl/ml용액을 사용하였다.

#### TTCII 환원시험

멸균된 skim milk 9 ml씩 분주된 시험관에 약제 1 ml씩 첨가하여 각 약제를 10배 희석한 후 각 8 ml를 사용하였고, 2개의 control sample로

멸균된 skim milk 8 ml에 멸균증류수 1 ml를 첨가한 음성대조 (negative control)와, 멸균된 skim milk 8 ml에 TMP용액 1 ml를 첨가하여 TMP control로 명명하여 사용하였다.

Fig 1과 같이 각각 약제 sample과 control sample에 TMP용액을 1 ml가하고 vortex mixer를 이용해 15초간 혼합한 후 82°C 항온수조에 담구어 2분 30초간 가열한 즉시 수돗물에 담구어 37°C 이하로 유지하고 시험균 1:1 (v/v) 혼합액을 각각 1 ml씩 접종하여 잘 혼합한 후 37°C incubator에서 2시간 배양하였다.

배양 후 4% TTCII용액 0.3 ml씩을 첨가하여 잘 혼합한 다음 TMP control 시료의 색상이 negative control시료의 색상과 유사할 때 TMP control 시료의 색상을 기준으로 결과를 판정하였다. 시료의 색상이 TMP control시료의 도홍색보다 현저히 옅을 경우 양성을 판정하였고 같거나 진하면 음성으로 판정하였다.

### 결과 및 고찰

축산업에서 항생물질의 사용이 일반화되면서 항생물질 치료를 받은 젖소에서 생산된 우유가 발효유제품등을 생산하는데 이용되는 스타트세균의 발육을 억제하여 경제적 손실을 일으키고 우유중에 잔류하여 특이체질의 사람에게 과민 반응을 일으키며 장기간 반복 투여하거나 사료

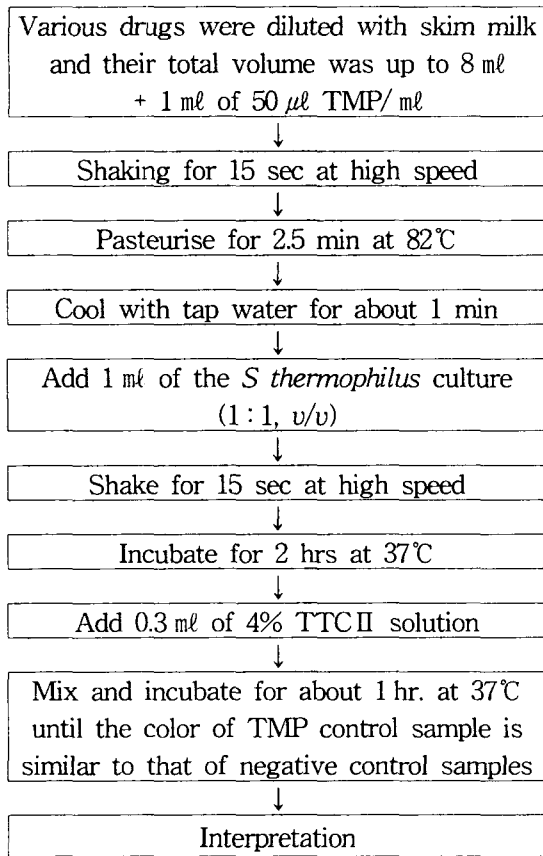


Fig 1. TTCII reduction test for the detection of antibiotic residues in skim milk.

첨가제와 같이 장기간 저농도로 투여한 항생물질에 대한 내성을 갖는 세균의 출현 및 그 내성의 전달로 사람에서의 질병치료를 어렵게 하는 점 등 가족과 그 생산물을 이용하는 사람에게 항생물질 사용으로 인한 유해성이 공중보건학적 문제가 되고 있다. 따라서 축산식품의 잔류약제에 대한 정확한 검사가 이루어져야 한다.

최근 정 등<sup>9)</sup>이 개선된 TTCII법에 의한 검출감도가 penicillin 0.005~0.025, streptomycin 2~5, ampicillin 0.05~0.1, oxytetracycline 0.2~0.5, sulfadimethoxine 0.1~0.5, gentamicin 5~10ppm이며, 조 등<sup>10)</sup>은 penicillin 0.005, streptomycin 5, ampicillin 0.01, oxytetracycline 0.1, sulfadimethoxine 0.025, gentamicin 5~10ppm에서 양성반응을 보였다고 보

고하였다. 본 시험에서도 유방염연고와 주사제로 흔히 사용하는 몇 가지를 선정하여 시험관 회석법으로 시험한 결과 penicillin 0.01 IU, streptomycin 2, ampicillin 0.02, oxytetracycline 0.5, sulfadimethoxine 0.4, gentamicin 5 ppm 으로 유사한 검출농도를 보였으며, 기타 kanamycin 100, enrofloxacin 5, amikacin 25 ppm으로 나타났다.

Table 3. Sensitivity of the TTCII test to various injectable monodrugs

Drugs	TTCII result ( $\mu\text{g/ml}$ )		Dilution ratio (Negative)
	Positive	Negative	
Ampicillin	0.02	0.002	$10^8$
Gentamicin	5	0.5	$10^5$
Kanamycin	100	10	$10^4$
Penicillin	0.01 IU	0.001 IU	$10^9$
Enrofloxacin	5	0.5	$10^5$
Sulfadimethoxine	0.4	0.04	$10^7$
Streptomycin	2	0.2	$10^6$
Amikacin	25	2.5	$10^5$
Oxytetracycline	0.5	0.05	$10^6$

복합제 및 연고제는 각 성분에 대한 검출정도를 정할 수가 없어 회석배율로 비교하여 본 결과 Table 3에서와 같이 단일약제의 TTCII검사 결과 KM  $10^4$ , ENR, GM, AK  $10^5$ , SM, OT  $10^6$ , AM  $10^8$ , PG  $10^9$ 의 회석배율에서 음성반응을 보였고, 복합약제의 TTCII검사결과는 Table 4와 같이 TY-CM, 타도마이오셀콤프주사액  $10^9$ , SP-SM  $10^8$ , SP-CL  $10^6$ 의 회석배율에서 음성반응을 보였다. 대체로 복합약제가 단일약제보다 비교적 높은 회석배율에서 TTCII 음성 반응을 보였고, 또한 연고제로 개발된 유방염치료제의 경우 Table 5와 같이 ENR-PG  $10^8$ , CP-NOK  $10^5$ , GM  $10^4$ , SP-AM-SM  $10^5$ , CP-NM  $10^5$ , 타도마이오셀콤프연고제  $10^5$ 에서 음성반응을 보였다. ENR-PG제품을 제외하고는 대부분 주사제에 비하여 낮은 회석배율

에서 음성반응을 보였다.

Table 4. Sensitivity of the TTCII test to various injectable compound drugs

Drugs	TTCII result with dilution ratio (Negative)
Tylosin-chloramphenicol	10 <sup>9</sup>
Spiramycin-colistin sulfate	10 <sup>6</sup>
Spiramycin-streptomycin	10 <sup>8</sup>
NND Penicillin G	} 10 <sup>9</sup>
Procaine penicillin G	
Dihydrostreptomycin sulphate	

Table 5. Sensitivity of the TTCII test to various ointment

Drugs	TTCII result with dilution ratio (Negative)
ENR-PG	10 <sup>8</sup>
CP-NOR	10 <sup>5</sup>
GM	10 <sup>4</sup>
SP-AM-SM	10 <sup>5</sup>
CP-NM	10 <sup>5</sup>
NND Penicillin G	} 10 <sup>5</sup>
Procaine penicillin G	
Dihydrostreptomycin sulphate	

Sulfa제에 대한 TTC검출농도 조사결과 정<sup>11)</sup>은 sulfadimethoxine 3,100 ppm에서 양성반응을 나타내었고, 김<sup>12)</sup>은 sulfadimethoxine 3,000 ppm에서도 음성반응을 보였다고 보고한 바 있다. 이와 같이 고농도의 설파제가 원유에 잔류되었을 경우에만 TTC 환원시험으로 검출가능하였으나 본 실험에서는 sulfadimethoxine이 0.4 ppm의 저농도에서 양성반응을 나타내었다.

이와 같은 결과를 종합해 보면 주사제가 연고제에 비해 높은 희석배율에서 음성반응을 보

이므로 충분한 휴약기간을 지켜야 하며 연고제의 경우 현재 식용색소를 첨가한 치료제의 사용이 타당함을 알 수 있다. 시판되고 있는 유방염 치료제를 사용할 때는 항상 유방염치료에서의 정확한 진단과 감수성항생제로 항생제의 사용을 줄여야 하며 원유내 잔류문제는 휴약기간을 철저히 지킨다면 우유에 약물이 잔류될 가능성이 거의 없을 것으로 생각되나 휴약기간은 건강한 동물을 대상으로 설정되었기 때문에 유방염 등 질병에 걸려 있는 젖소의 경우 다소 차이가 있을 수 있다. 이러한 방법을 해결할 수 있는 방법은 우유를 납유하기전 반드시 약물검사를 한 후 양성인 경우 휴약기간을 연장해야 한다.

## 결 론

유즙내 잔류약제 검출에 있어 현재 시판되고 있는 유방염 치료제 (단일약제, 복합약제, 연고제)를 TTCII시험법으로 시험관 희석법에 따라 비교한 결과는 다음과 같다.

1. 복합약제가 단일약제보다는 비교적 높은 희석배율에서 TTCII음성반응을 보였다.
2. 연고제는 ENR-PG제품을 제외하고는 대부분 주사제에 비하여 낮은 희석배율에서 TTCII 음성반응을 보였다.

## 참고문헌

1. McEwen SA, Black WP, Meek AH. 1991. Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk, *J Dairy Sci* 74: 2128~2137.
2. 김교준. 1973. 우유의 잔류항생물질에 관한 연구. *대한수의학회지* 13(1): 57~62.
3. Durbin CG. 1956. Antibiotics in food preservation, *Am J Public Health* 46: 1306~1308.
4. Vickers HR, Bagratuni L, Alexander S. 1958. Dermatitis caused by penicillin in

- milk. *Lancet* 1: 358.
5. Mandell GL, Sande HA. 1989. Antimicrobial agents. Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics: 1106~1110.
  6. Charm SE, Zomer E, Salter R. 1988. Confirmation in northeast. US market milk, *J Food Port* 51: 920~924.
  7. 농수산부. 축산물 시험방법. 134(농수산고시 제 85~48호. 1985).
  8. 손봉환. 1999. 유방염치료에서 항생제는 퇴출될 것인가? *대한수의사회지* 35(11): 950~954.
  9. 정동수, 김동훈, 이상목. 1995. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 환원시험법의 개선에 관한 연구: Disc plate method. *한가위지* 18(2): 163~176.
  10. 조병훈, 김봉환, 손성환 등. 1993. 원유중 잔류 설파제의 검출을 위한 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 환원시험법 개량. *한국수의공중보건학회지* 17(1): 77~86.
  11. 정일승. 1989. 설펜아미드제제가 우유의 TTC 테스트에 미치는 영향에 관한 연구. *건국대학교 대학원 논문집*.
  12. 김승룡. 1992. 원유위생에 관한 실험적 연구. *건국대학교 대학원논문집*.