

유방염 유증에서 분리한 포도구균의 분자생물학적 typing과 multiplex PCR을 이용한 장독소의 검출

김 신¹, 홍현표, 김상윤, 권현일, 이희무*

경상북도가축위생시험소 북부지소¹
안동대학교 자연과학대학*
(접수 2002. 3. 26, 게재승인 2002. 5. 3)

Molecular typing and detection of enterotoxin by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastiti

Shin Kim¹, Hyon-Pyo Hong, Sang-Yun Kim, Heon-Il Kwon, Hee-Moo Lee*

¹Northern Branch, Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Andong, 760-901, Korea

*Dept of Biology, Andong National University, 760-749, Korea

(Received 26 March 2002, accepted in revised form 3 May 2002)

Abstract

Forty strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from mastitic milk. As a result of antimicrobial susceptibility test, the strains of *S aureus* revealed 47.5% were resistant to ampicillin and penicillin, and 7.5% to gentamicin. But 45% of isolates were sensitive to antimicrobial agents tested. In case of enterotoxin production, 56.3% of 16 strains produced enterotoxin D. Two strain of enterotoxin D producers produced both enterotoxin B and D. According to isolation date, 15 representative strains were selected. As a results of pulsed field gel eletrophoresis analysis of the 15 representative strains, 14 strains were identical. Therefore we consider the identical strains of *S aureus* have caused continuously bovine mastitis in this dairy farm. If autogenous vaccine can be made by the strains, it will work well for the prevention of bovine mastitis caused by *S aureus*.

Key words : *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, Multiplex PCR, PFGE

서 론

유방염이란 젖소 자체의 유전, 생리 및 해부

학적 요인과 사양관리나 사육환경 등의 요인이 서로 복합적으로 작용하여 유방 주위에 상존하는 미생물이 유방내에 침입하여 유선에 염증을

¹Corresponding author

Phone : 054-821-9884, Fax : 054-821-0556

E-mail : kimshinb@hanmail.net

형성하는 것으로¹⁾, 젖소 질병 중 낙농가에 미치는 경제적 손실이 가장 큰 질병이다²⁻⁵⁾.

80여종의 유방염 원인균 중 *Staphylococcus aureus*는 전염성균으로 젖소의 유방표면, 체표면에 상재하면서 유두를 통해 유방내에 침입하여 유즙내의 백혈구에 의해 탐식되더라도 백혈구내에서 계속 생존하며⁶⁾, 유선조직내에서는 섬유조직으로 encapsulation된 다양한 크기의 micro-abscess를 형성함으로써 한 번 감염되면 약물 침투가 불가능하여 준임상형과 임상형 감염 형태를 반복하는 고질적인 감염 양상을 띄게 된다⁷⁾.

*S aureus*는 다양한 병원성 인자를 분비하면서 숙주세포에 저항하는데 먼저 유선조직에 병변을 형성하는 단계에서 opsonization 유도 및 보체의 활성을 유도하는 protein A와 fibronectin binding protein이 관여하여 부착을 용이하게 하며⁸⁾, 일단 부착되면 capsule을 형성하여 호중구나 대식세포 등의 백혈구 탐식작용으로부터 용이하게 피할 수 있다⁹⁾.

*S aureus*가 생산하는 병원성 인자 중 발열성 외독소인 장독소(enterotoxin)가 젖소의 유방염 발병에 깊이 관여하고 있다고 밝혀져 있다²⁾. 또한 *S aureus*의 주요 병원성 인자인 enterotoxin은 사람에서 포도구균 식중독의 주요 원인으로, *S aureus*가 증식하면서 생산한 enterotoxin이 함유된 육류, 햄, 소세지, 치즈, 버터 등의 식품을 섭취함으로써 발생하는 것으로 밝혀졌으며¹⁰⁾, 치즈나 버터의 오염원은 enterotoxin을 생산하는 *S aureus*에 이환된 유방염 젖소로부터 착유한 우유로 제조한 것으로 밝혀져¹¹⁾, *S aureus*에 의한 유방염이 유량감소, 원유의 품질저하로 인한 경제적 손실뿐만 아니라 공중보건학적으로도 중요하게 인식되었다.

지금까지 밝혀진 enterotoxin은 항원성에 따라 enterotoxin A(SEA), enterotoxin B (SEB), enterotoxin C(SEC), enterotoxin D (SED), enterotoxin E(SEE), enterotoxin H (SEH)등이 밝혀져 있으며 SEC는 다시 이화학적 성상에 따라 C1, C2, C3로 분류된다¹²⁾. 이 중 SEA를 생산하는 *S aureus*가 식중독 원인식품과 환자에서 가장 높게 분포하고 있어 enterotoxin 중 SEA가 식중독과 밀접한 관계가 있음을 시

사하였다¹³⁾.

이제까지 동일농장에서 시기별로 *S aureus*를 분리하여 분자생물학적 분석방법을 이용한 성적보고가 없었다.

따라서 본 연구는 동일농장에서 유방염의 발병시기가 다른 *S aureus*를 대상으로 pulsed field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 분자생물학적 역학분석과 multiplex PCR을 이용한 enterotoxin 생산능을 조사하여 유방염 근절, *S aureus* 자가백신 제조 및 공중보건학적 위해요소 분석에 대한 기초자료를 확보할 목적으로 이루어졌다.

재료 및 방법

재료

1999년 1월부터 2000년 2월까지 영주의 한 젖소농가에서 유방염검사를 의뢰한 우유 중 california mastitis test (CMT)결과 양성반응을 나타낸 우유를 재료로 사용하였다.

균분리 및 동정

상기의 우유를 멸균면봉을 이용하여 혈액한천 배지에 도말하여 초대분리 배양을 한 후, 이 배지에서 용혈현상을 나타내는 집락을 mannitol salt agar(Difco, USA), baird-parker agar (Difco, USA)를 선택배지로 이용하여 확인한 후 oxidase, catalase, slide coagulase, tube coagulase test 등을 실시한 후, manual of clinical microbiology¹⁴⁾의 방법에 준하여 *S aureus*로 동정하였다. 동정된 균주는 tryptic soy broth (Difco, USA) 5ml에 37°C에서 24시간 배양 후 20%의 멸균 glycerol을 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하면서 시험에 사용하였다.

항균제 감수성 검사

National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS, 1997)의 방법¹⁵⁾에 따라 표준 평판 디스크확산법으로 실시하였다. 사용한 배지는 Müller-Hinton agar(Difco, USA)이고, 항균제 디스크는 sesi-disc(BBL, USA)로 am-

picillin(10 μ g), amikacin(30 μ g), cephalothin(30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), erythromycin(15 μ g), gentamicin(10 μ g), norfloxacin(10 μ g), penicillin G(10 IU), sulfamethazole/trimethoprim(1.25 μ g/23.75 μ g), tetracycline(30 μ g), oxacillin(1 μ g), vancomycin(30 μ g) 등 12종 항균제를 사용하였다. 이때 표준균주로는 *S aureus* ATCC 25923을 사용하였다. 최종판독은 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양 후 억제대의 직경을 측정하였다.

Enterotoxin 검출을 위한 multiplex PCR

Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex-PCR)은 윤²¹의 방법을 변형하여 실시하였다.

1) DNA 분리 : Hookey 등¹⁶¹의 방법에 준하여 순수 분리한 균주를 brain heart infusion broth(BHI, Difco, USA)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양한 후, 12,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 침전물을 TE buffer 700 μ l로 2회 세척하고 이를 다시 TE buffer 565 μ l로 재부유시켰다. 30 μ l의 20% sodium dodecyl sulfate (Sigma, USA), 5 μ l의 proteinase K(20mg/ml, Promega, USA), 그리고 50 μ l의 lysostaphin (200 μ g/ml, Sigma, USA)을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시켰다. 100 μ l의 5M NaCl과 80 μ l의 CTAB/NaCl(Sigma, USA)를 혼합하여 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응한 후 12,000 \times g(4 $^{\circ}$ C)에서

15분간 원심분리하였다. 상층액을 수거하여 동량의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25 : 24 : 1, Sigma, USA)을 가하고 12,000 \times g에서 원심분리 후 상층액을 수거하여 absolute ethanol (Sigma, USA)을 상층액량의 2~3배 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 정치시켰다. 12,000 \times g에서 20분간 원심분리한 후 침전물을 70% ethanol로 1회 세척한 다음 침전된 DNA를 진공 건조시킨 후 30 μ l의 TE buffer로 부유시켜 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

2) Primer : 각각의 enterotoxin primer는 Johnson¹⁷¹이 보고한 primer를 (주)Bioneer에 합성 의뢰하여 사용하였다.

3) PCR 반응조건 : PCR mixture는 윤²¹의 방법을 변형하여 사용하였으며, PCR반응은 먼저 95 $^{\circ}$ C 1분간 denaturation, 56 $^{\circ}$ C에서 2분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 PCR-Gene Cyclor(Bio-Rad, USA)를 이용하여 총 30 cycles을, 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 실시하였다. PCR-products는 1% agarose gel에서 100V, 1시간 전기영동 후 ethidium bromide(EtBr, 0.5 μ g/ml)로 염색한 후 자외선 하에서 증폭산물을 확인 후 사진 촬영하였다.

Pulsed field gel eletrophoresis (PFGE)

PFGE는 Jorgensen 등¹⁸¹의 방법을 변형하여 실시하였다. 혈액배지에서 자란 세균 집락 중

Table 1. The oligonucleotide sequence of primers

Primers	5' → 3' sequence	Location	Expected size(bp)	
<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAACGGTTAAAACGAA	490-509	121
	SEA-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA	591-610	
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACCTGACAAAGG	634-653	477
	SEB-2	GCAGGTA CTCTATAAGTGCC	1091-1110	
<i>sec</i>	SEC-1	GACATAAAAAGCTAGGATTTT	676-695	257
	SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC	913-932	
<i>sed</i>	SED-1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	354-373	318
	SED-2	TAACTTACCGTGGACCTTC	652-671	
<i>see</i>	SEE-1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	491-510	169
	SEE-2	TAACTTACCGTGGACCTTC	640-659	

한 집락을 취하여 5ml의 BHI broth(Difco, USA)에 접종하여 하룻밤 배양한 균액을 EET 용액으로 3,000×g에서 20분간 원심 세척한 후 다시 0.5ml의 EET용액으로 부유시켰다. 세균 부유액을 60℃로 유지한 1% chromosomal agarose(Bio-Rad, USA)와 동량으로 섞어 mold의 well에 약 250 μ l씩 넣어 실온에서 약 20분간 방치하여 plug를 만들었다. Plug는 lysis용액(EET-LL)에 담구어 30℃에서 4시간 방치하였다. Plug를 꺼내어 EET-SP에 50℃에서 하룻밤 반응시킨 후 EET-SP용액을 제거하고 TE buffer로 3~4회 세척하였다. React buffer(Promega, USA) 100 μ l에 Sma I을 15 unit되게 넣어 상온에서 6시간 반응시켰다. Plug는 enzyme reaction buffer를 제거하여 0.5×TBE buffer에 30분간 담근 후 1% PFGE agarose(Bio-Rad, USA) gel에 loading하여 1% low melting point agarose(Promega, USA)로 각 well을 덮고 0.5×TBE buffer에서 14℃를 유지하면서 CHEF-DRIII(Bio-Rad, USA)를 이용하여 20시간 동안 전기영동하였다. 영동이 끝난 후 gel은 EtBr(0.5 μ g/ml)로 염색하여 자외선 하에서 관찰하였다. DNA band의 similarity는 unweighted pair group method of analysis(UPGMA) 프로그램으로 분석하였다.

결 과

분리균주

실험재료로부터 분리한 *S aureus*는 총 40주

Table 2. Number of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis

Isolation month	No of isolates
January 1999	4
March 1999	23
April 1999	1
June 1999	7
July 1999	4
February 2000	1
Total	40

였으며, 분리율은 1999년 3월에 23주(57.5%)로 가장 높았다(Table 2).

Table 3. Antimicrobial susceptibility and coagulase reaction of isolates

Strains	Antimicrobial drug resistant patterns	Coagulase	
		Slide	Tube
BY2	P, AM, GM	+	4h+
BY4	All susceptible	+	24h+
BY5	P, AM	+	24h+
BY6	P, AM	+	24h+
BY7	All susceptible	+	24h+
BY8	P, AM	-	24h+
BY9	All susceptible	+	24h+
BY10	All susceptible	+	24h+
BY11	All susceptible	+	24h+
BY12	P, AM	+	24h+
BY13	All susceptible	+	24h+
BY14	P, AM, GM	+	24h+
BY15	P, AM,	+	24h+
BY16	P, AM	+	24h+
BY17	P, AM	+	24h+
BY18	P, AM	+	24h+
BY19	P, AM	+	24h+
BY20	All susceptible	+	24h+
BY21	All susceptible	+	4h+
BY22	P, AM, GM	+	24h+
BY23	All susceptible	+	24h+
BY24	P, AM	+	24h+
BY25	All susceptible	+	4h+
BY26	P, AM	+	24h+
BY27	All susceptible	+	24h+
BY28	P, AM	+	24h+
BY29	All susceptible	+	4h+
BY30	P, AM	+	4h+
BY31	All susceptible	+	4h+
BY32	P, AM,	+	4h+
BY33	P, AM,	+	4h+
BY35	All susceptible	+	4h+
BY36	P, AM	+	4h+
BY37	All susceptible	+	4h+
BY38	P, AM	+	24h+
BY39	All susceptible	+	4h+
BY40	P, AM	-	24h+
BY41	P, AM	+	4h+
BY42	All susceptible	+	4h+
BY44	All susceptible	+	24h+

분리주의 항균제 감수성 및 coagulase 양성률

분리균주별 항균제 감수성, slide coagulase test, tube coagulase test 결과는 Table 3과 같다. 항균제 내성에 있어서는 공시된 모든 항균

제에 감수성인 균주가 18주(45%), penicillin과 ampicillin에 내성을 보인 균주는 19주(47.5%), penicillin, ampicillin, gentamicin등에 내성인 균주는 3주(7.5%)로 나타났다. Slide coagulase test에서는 2주가 음성이었고, tube coagulase

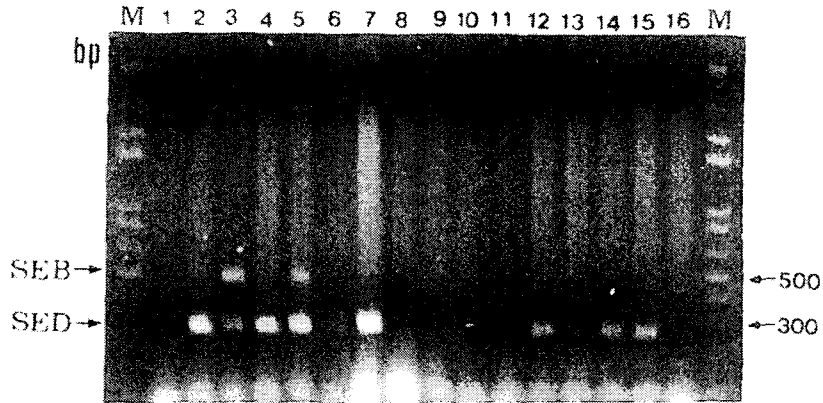


Fig 1. Detection of enterotoxin genes from *Staphylococcus aureus* isolates. M ; 1kb DNA ladder marker(Bio-Rad Co), Lane 2,4,6,7,12,14,15 ; SEB producer, Lane 3,5 ; SEB and SED producer, Lane 1,8,9,10,11,13,16 ; Non-toxin producer.

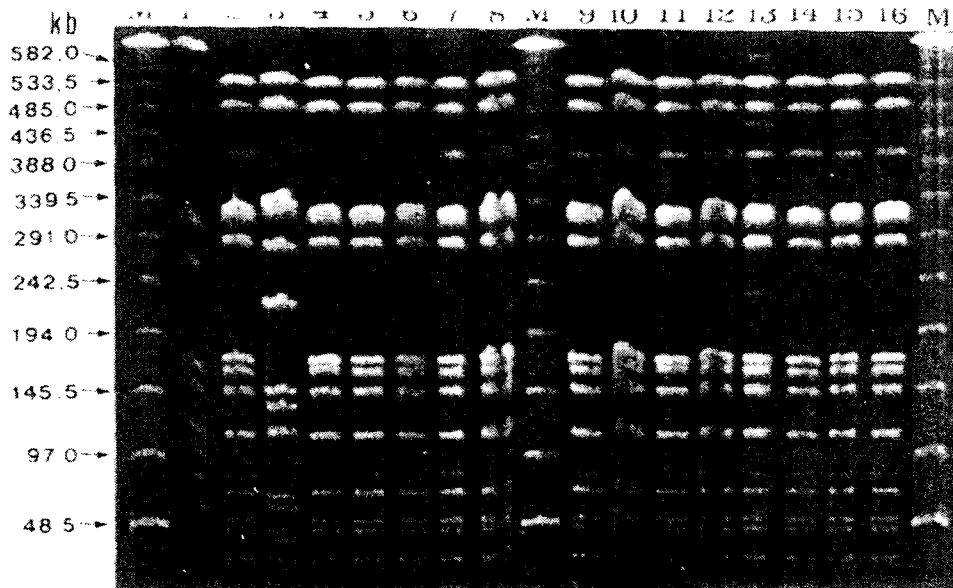


Fig 2. Patterns of PFGE for Sma I digested genome DNA of *Staphylococcus aureus* isolates.

M ; Lambda Ladder PFG Marker(BioLabs, New England, USA), Lane 1 ; *S. aureus* ATCC 25923, Lane 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 ; pattern a, Lane 3 ; pattern b, Lane 13 ; pattern c.

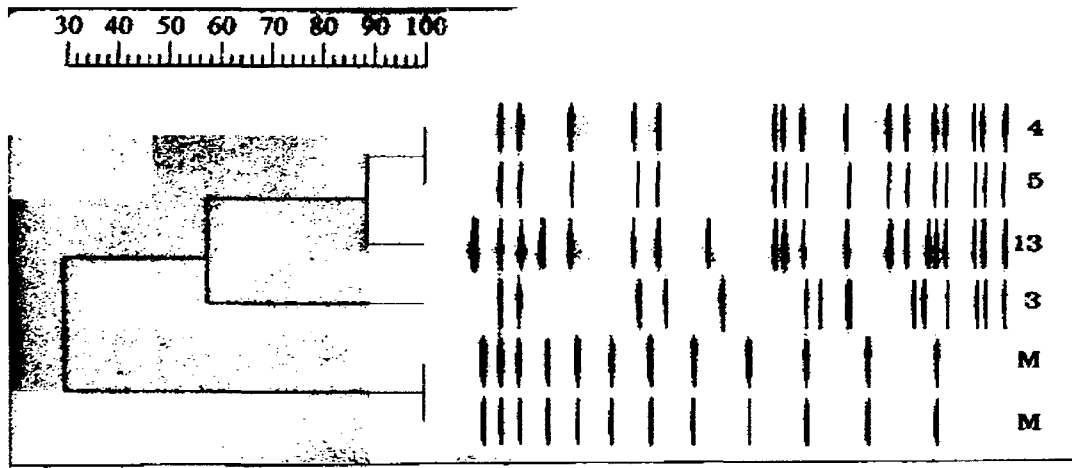


Fig 3. Dendrogram showing the percentage of genetic similarity among the *Sma* I restriction PFGE patterns obtained from 15 *Staphylococcus aureus* isolates.
 Number 13 ; Lane 13 isolate of Fig 2, Number 3 ; Lane 3 isolate of Fig 2, Number 4 ; Lane 4 isolate of Fig 2, Number 5 ; Lane 5 isolate of Fig 2, M ; Lambda Ladder PFGE Marker(Biolabs, New England, USA).

test에서는 4시간에 양성반응을 나타낸 균주는 14주(35%), 24시간에 양성을 나타낸 균주는 26주(65%)로 확인되었다.

Enterotoxin 생산 균주

Enterotoxin을 생산하는 균주를 확인하기 위하여 enterotoxin multiplex PCR을 실시한 결과 총 16주 중 9주(56.3%)가 enterotoxin D를 생산하였고, 이 중 2주는 enterotoxin B도 동시에 생산하였다. 그러나 enterotoxin A, C, E를 생산하는 균주는 없었다(Fig 1).

Pulsed field gel electrophoresis(PFGE) 패턴

Fig 2는 총 40주 중 분리시기별로 선정한 대표균주 15주와 표준균주인 *S aureus* ATCC 25923의 PFGE 양상을 나타낸 것으로 lane 3번과 13번외에는 육안적으로 보아서도 상당히 유사한 DNA분절을 확인 할 수 있었다. Fig 3은 Fig 2의 그림을 그래픽 분석프로그램인 UPGMA를 이용하여 균주간 유사성을 분석한 dendrogram이다. 이 분석결과 3번과 13번을 제외한 전 균주가 분리시기와 관계없이 유전적으로도 동일한 균주임을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서 분리된 *S aureus*의 항균제 내성을 살펴보면 다른 연구자들의 성적보다는 비교적 낮게 나타남을 알 수 있었다. Francis 등¹⁹⁾이 보고한 ampicillin에 58.5%, penicillin에 45.3%, tetracycline에 4.3% 내성과 Davidson 등²⁰⁾이 보고한 ampicillin에 55%, penicillin에 69%, tetracycline에 8% 내성, gentamicin에 0% 내성과, 암²¹⁾의 ampicillin에 65.7%, penicillin에 66.3%, tetracycline에 50%, gentamicin에 61.4% 내성과 비교할 때 본 연구의 결과인 ampicillin에 47.5%, penicillin에 47.5%, gentamicin에 7.5% 내성으로 상당히 낮은 항균제 내성 경향을 나타냈다. 특히 사용된 모든 항균제에 내성을 나타낸 균주가 47.5%로 이 목장에서는 항균제 내성 패턴에서도 다양하지 않은 소수의 균주가 연속해서 유방염에 관여하고 있음을 보여주고 있다. 이 결과는 PFGE 성적과도 일치하는 경향을 나타냈다.

Enterotoxin 생산능을 살펴보면 강 등²²⁾이 집합유 유래 *S aureus*의 enterotoxin 생산능 조사에서 총 133균주 중 enterotoxin C를 생산

하는 균주가 48.9%, enterotoxin D를 생산하는 균주가 15%, enterotoxin A를 생산하는 균주가 5.3%라고 하였다. 임¹⁹⁾은 젖소 유방염 유래 *S aureus*의 enterotoxin 생산능 조사에서 enterotoxin A를 생산하는 균주가 17.5%, enterotoxin C를 생산하는 균주가 0.6%로 보고하였다. 위의 두 성적과 본 성적을 비교해보면 분리된 지역과 시기, 같은 지역일지라도 균주에 따라 다양한 장독소를 산생함을 확인할 수 있었고, 다행히도 이 농장에서 분리된 균주는 enterotoxin A를 생산하지 않아 식중독과는 연관이 없음을 알 수 있었다.

그 동안 사람이나 동물에서 유행하는 병원체에 대한 유전적 다양성과 구조 등에 관한 연구가 진행되어 왔고 질병발생은 전체 유전형 중 적은 부분을 차지하는 clone에 의해 발생한다고 보고하고 있다^{23,24)}. 이러한 역학조사에 대한 연구를 수행하는데 있어 균주간 아형의 분류는 균주간 동일여부를 판정하는 기준이 된다. *S aureus*의 경우 이제까지 phage typing, biotyping, 항균제 내성 양상 등 세균의 생물학적 대사 활성을 이용한 방법을 주로 이용하여 왔지만 특정 내성 유전자를 갖고 있다 하더라도 유전자의 변형에 의해 각기 다른 형의 균으로 표현될 수 있기 때문에 표현형 분석법만으로는 역학적 분석이나 전파경로를 정확히 밝히는 것이 어려웠다.

그러나 유전자형의 분석법은 균주의 변형이나 유전자는 지니고 있으면서 발현하지 않는 균주까지도 분류할 수 있어 최근에 많이 활용되고 있다. 그 중에 PFGE는 표현능, 재현성, 판별력에 있어 지금까지 개발된 방법 중 가장 우수한 방법이다²⁵⁾. 본 연구에서도 이 PFGE 분석방법을 적용하였는데, Sordelli 등²⁶⁾이 젖소 유방염 유래 *S aureus*의 PFGE 분석결과 총 127주가 4종의 PFGE patterns을 나타냈고, 이 중 pattern A가 86%로 우세하였다고 보고했다. 임²¹⁾은 젖소 유방염 유래 *S aureus* 166주의 PFGE 분석결과 10종의 PFGE patterns을 보고하였다. 본 연구에서는 분리시기별로 대표균주 15주에 대한 PFGE 분석결과 2주를 제외한 13주가 동일한 DNA분절상을 보였고 다른 DNA

분절상을 나타낸 2주 중 13번 균주는 90%의 동질성을 나타내어 동일균주의 점돌연변이에 의한 결과로 사료되었다. 따라서 본 연구결과 15주 중 1주를 제외한 14주가 동일균주로 사료되며, 이것은 이 목장의 경우 이 동일균주가 시간에 관계없이 연속적으로 유행하면서 유방염을 일으키는 것으로 판단된다. 그러므로 이 균주를 이용하여 *S aureus* 자가백신을 제조하여 사용한다면 유방염 예방효과가 높을 것으로 사료되었다.

결 론

경북 영주의 한 목장에서 유방염유로부터 분리한 *S aureus* 40주에 대한 항균제 감수성 결과 ampicillin과 penicillin에 47.5%의 내성을, gentamicin에 7.5%의 내성을 나타냈고, 분리주의 45%가 사용한 모든 항균제에 감수성을 나타냈다. Enterotoxin 생산능은 16주 중 56.3%가 enterotoxin D를 생산하였고, 그 중 2주는 enterotoxin B도 동시에 생산하였다. 분리시기 별 대표균주 15균주에 대한 PFGE분석 결과 14주가 동일균주인 것으로 분석되었다. 따라서 이 목장의 경우 동일균주에 의해서 연속적으로 유방염이 발병하는 것으로 사료되어 이 균주를 이용하여 *S aureus* 자가백신을 만든다면 유방염 예방효과가 높을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Jasper DE. 1970. Interrelationships of etiological factors in bovine mastitis. *J Dairy Sci* 53 : 1151~1155.
2. 윤장원. 1988. Staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, E와 TSST-1의 독소형 분석을 위한 multiplex PCR 확립. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.
3. Francis DG, Carrol PT. 1986. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis. *Vet Rec* 118 : 361~363.

4. McDonald JS, Aderson AJ. 1981. Antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from infected bovine mammary glands. *Cornell Vet* 71 : 391~396.
5. Davidson JN, Barbish JG, Dunny GM. 1982. Bovine mastitis : Antimicrobial resistance patterns. *JAMA* 180(2) : 153~155.
6. Sela MN, Ofeek I, Lehav M, et al. 1987. The effect of leukocyte hydrolases of bacteria XI. Lysis by leukocyte extracts and by myeloperoxidase of a *Staphylococcus aureus* mutant which is deficient in teichoic and the inhibition of bacteriolysis by lipoteichoic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 159 : 126~130.
7. Sanchez MS, Ford CW, Yancey RJ. 1988. Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. *J Antimicrob Chemother* 21 : 773~786.
8. Koneman EW, Allen SD, Janda WN, et al. 1992. Staphylococci and related organisms. In *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 4ed. Lippincott company, Philadelphia : 405~428.
9. Baselga R, Albizu I, Amorena B. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factor in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol* 39 : 195~204.
10. Isigidi BK, Mathieu AM, Deverise LA, et al. 1994. Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. *J Appl Bacteriol* 72 : 16~20.
11. Gross EM, Weizman Z, Picard E, et al. 1988. Milk borne gastroenteritis to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B from a goat with mastitis. *Am J Trop Med Hyg* 39 : 103~104.
12. Bergdoll MS. 1983. Enterotoxins in staphylococci and staphylococcal infections. Academic Press, London : 559~598.
13. Teryama T, Igarashi H. 1981. Direct detection of staphylococcal enterotoxin from incriminated foods in food poisoning and coagulase types of the isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Japan Food Hygiene Res* 31 : 193~197.
14. Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, et al. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Manual of clinical microbiology*. 7ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. : 264~282.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1977. Approved standard M2-A6, performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
16. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD, et al. 1988. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene. *J Clin Microbiol* 36 : 1023~1089.
17. Johns MB, Khan SA. 1988. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol* 170 : 4033~4039.
18. Jorgensen M, Givency R, Pegler M et al. 1996. Typing multi-resistant *Staphylococcus aureus* : conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 34 : 398~403.
19. Francis PG, Carrol PJ. 1986. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis. *Vet Rec* 118 : 361~363.

20. Davidson JN, Babish JG, Dunny GM. 1982. Bovine mastitis : Antimicrobial resistance patterns. *JAVMA* 180 : 153~155.
21. 임숙경. 2000. 젖소 유방염 유래 *Staphylococcus aureus*의 유전적 특성과 약제 내성에 관한 연구. 전남대학교원 박사학위논문.
22. 강호조, 최홍근, 손원근. 1991. 가축 유래의 Enterotoxin 산생과 plasmid profile에 관한 연구 : II 분리균주의 enterotoxin 산생. 한국수의공중보건학회지 15(1) : 7~12.
23. Selander RK, Musser JM, Caugant DA, et al. 1987. Population genetics of pathogenic bacteria. *Microb Pathogen* 3 : 1~7.
24. Whittam TA, Schulze J, Hunfeld KP, et al. 1997. Clonal heterogeneity distribution and pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16 : 893~897.
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9) : 2233~2239.
26. Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, et al. 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina : Genetic and epidemiologic analysis. *J Clin Microbiol* 38(2) : 846~850.