

젖소 유방염 유즙에서 분리한 *Streptococcus uberis*의 항생제 감수성 및 유전학적 특성

이 길 · 강현미¹ · 정충일 · 문진산^{1,*}
건국대학교 낙농학과, ¹국립수의과학검역원
(게재승인: 2007년 1월 16일)

Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis milk

Gil Lee, Hyun-Mi Kang¹, Chung-il Chung, Jin-San Moon^{1,*}

Department of Dairy Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
¹National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
(Accepted: January 16, 2007)

Abstract : *Streptococcus* spp. comprising *Streptococcus* (*S.*) *uberis* and *S. dysgalactiae* strains is major cause of bovine mastitis from particularly well-managed or low somatic cell count herds that have successfully controlled contagious pathogens. In this study, antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *S. uberis* isolated from clinical or subclinical mastitis milk at 2003 were investigated. Eighty seven isolates of *Streptococcus* spp. were identified by the conventional biochemical methods. The antimicrobial susceptibility by disk diffusion method was determined for 46 *S. uberis*, 11 *S. bovis*, 10 *S. oralis*, 6 *S. uberis* and 14 other *Streptococcus* spp.. Overall, the tested strains were susceptible to tetracycline (11.5%), amikacin (14.9%), streptomycin (16.1%), neomycin (26.4%), kanamycin (35.6%), gentamicin (65.2%), oxacillin (70.1%), ampicillin (75.9%), chloramphenicol (78.2%), and cephalothin (97.7%). Additionally, *S. uberis* strains were susceptible to penicillin G (97.8%), but resistant to erythromycin (76.0%) by minimal inhibitory concentration test. The multiple-drug resistance rate of isolated bacteria to 4 more than antimicrobial agents were 84.8% among 13 different antimicrobials. Densitometric evaluation of DNA amplification fingerprinting patterns amplified with primer 8.6d showed that 3 to 8 number of distinguishable DNA fragments ranged from 180 bp to 1,200 bp. Thirty seven isolates of *S. uberis* strains were subtyped into 8 distinct patterns. Each subtype revealed a typical pattern of antimicrobial susceptibilities. These findings demonstrate that *S. uberis* isolates were mastitis pathogens of diverse serotypes, and often encountered the diverse resistant patterns.

Key words : antimicrobial susceptibility, cow, mastitis, *Streptococcus uberis*

서 론

젖소 유방염은 유방 주변에 상존하고 있는 미생물이 유방내로 침입하여 유선에 염증을 일으킴으로써 유량감소, 유질저하, 발열, 식욕감퇴 등의 증상을 나타내는 질병이다 [12]. Watts [29]는 유방염을 일으키는 미생물로

137종을 보고하였다. 이러한 원인체중 *Escherichia*(*E.*) *coli*, *Staphylococcus*(*S.*) *aureus*, *Streptococcus*(*S.*) *dysgalactiae*, *Streptococcus*(*S.*) *agalactiae*, *Streptococcus*(*S.*) *uberis* 등이 전체 유방염 발생의 80% 정도를 차지한다 [10].

유방염 원인균은 발생 양상에 따라 '전염성'과 '비전염성(환경성)'으로 분류되며, 전염성 유방염 원인균은 유

*Corresponding author: Jin-San Moon
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1735, Fax: +82-31-467-1740, E-mail: moonjs@nvrqs.go.kr]

선내 환경에 적응하여 준임상형 감염을 일으키고 착유 중 또는 착유 전후에 다른 개체에 전파되며, *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* 등이 가장 대표적인 균이다. 이외는 대조적으로 비전염성 원인균은 숙주 내에 생존하기 위한 적응과정이 없이 유방에 감염되면 즉시 증식하여 숙주의 면역반응을 유도한 후 임상형 유방염을 일으킨 뒤 빠르게 소멸되며, *E. coli*와 *S. uberis* 등이 대표적인 균으로서 주로 환경으로부터 전파되기 때문에 '환경성 유방염 원인균'으로 분류되기도 한다 [11, 12, 25].

한편, 유방염을 일으키는 요인은 매우 다양하기 때문에 면역학적 방법이나 위생적인 착유과정 등의 특정한 방법만으로 유방염을 근절시키는 것은 어렵다 [14]. 영국의 유방염관리위원회에서는 유방염을 효과적으로 예방하기 위하여 올바른 착유기 사용, 착유후 유두침지 또는 분무소독, 임상형 유방염의 적극적인 치료, 건유기 항생제 치료, 만성 감염우의 적극적인 도태와 같은 '유방염 5대 관리프로그램'을 적용하였고, 그 결과 유방염 발병율이 크게 감소되어 유질이 획기적으로 개선되었다 [11, 18]. 그러나 이러한 유방염 관리프로그램의 적용은 전염성 유방염 원인체 근절에는 절대적인 도움을 주었지만 [17], 환경성 유방염 원인균에는 효과적이지 못하여 이러한 원인체에 의한 유방염이 점차적으로 문제되고 있다 [16, 18].

그리하여 2000년 이후 영국은 임상형 유방염의 가장 흔한 원인으로 *E. coli*(27%)와 *S. uberis*(23%)가 보고된 반면, 전염성 유방염은 전체 유방염 발생률 중 오직 18%로 조사되어 환경성 원인균의 중요성이 더욱 강조되었다 [10]. 대표적인 환경성 유방염 원인균인 *S. uberis*는 젖소의 편도선, 생식기, 소화기, 피부 등 신체 여러 부위와 물, 토양, 깔짚, 사료와 같은 주변 환경에서도 분리된다 [12, 21, 31]. 특히 우사 바닥재는 유두의 중요한 오염 매개체로 작용하여 깔짚이 있는 우사의 경우 착유전에 젖소 유두를 소독했음에도 불구하고 유방염 원인체 중 *S. uberis*가 약 50~60%를 차지하였다. 또한, *S. uberis*에 의한 유방염은 전세계적으로 점차 증가하고 있는 추세이다 [12, 20, 22, 29].

한편, 젖소는 본래 유방염에 대한 자연 치유력을 가지는데 *S. uberis*를 비롯하여 환경성 연쇄상구균에 대한 자연 치유율은 40%에서 50% 수준이고, 임상 증상 발생 후 7일 동안 자연 치료율은 10%에 불과하므로 항생제의 사용은 불가피하다 [28]. 유방염 치료효과를 높이기 위해서는 적절한 치료약제 선정을 위해 유방염 원인균에 대한 항생제 감수성 시험이 선행되어야 한다 [10]. 국내에서도 1970년 정 등 [8]이 유방염 원유로부터 분리한 원인균에 대한 항생제 감수성 결과에 대한 보고서를 발표한 이후 점차적으로 검사가 확대되었다. 국가적 차

원에서 1991~1993년에 각 시도 단위의 유방염 역학조사가 실시되었으며 [4], 2000년 이후에도 경기, 전남, 경남지역을 대상으로 유방염 원인체에 대한 감수성 성격이 보고되었다 [3, 6, 7]. 하지만, 유방염 원인균 및 항생제 감수성 양상은 지역과 목장 단위 또는 조사 시기, 사양 환경 및 관리방법의 변화에 따라 여러 가지로 나타날 수 있으며, 지금도 여전히 많은 농가가 유방염 치료시 항생제 감수성 성적보다는 경험에 의존하고 있어 항생제 오남용에 대한 문제점이 지속적으로 대두되고 있으므로 유방염 원인체에 대한 항생제 변화 양상을 주기적으로 비교할 필요성이 있다.

특히, 최근 낙농업의 형태가 전업화 규모화 되면서 농가별 평균 사육두수가 증가되고 사육환경이 열악해져 환경성 유래의 연쇄상구균에 의한 유방염이 더욱 문제가 될 가능성이 높다. 또한, 연쇄상구균 중 *S. uberis*는 서식할 수 있는 장소가 매우 다양하므로 유방염 예방에도 어려움이 많은 원인체인데도 불구하고 이와 관련된 유전학적 정보가 충분하지 않은 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 연쇄상구균에 의한 젖소 유방염의 효과적인 치료를 위하여 착유우의 원유에서 분리한 연쇄상구균의 항생제 감수성과 그 유전학적 특성에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

대상목장 및 공시재료

2003년 1월에서 12월까지 강원, 경기, 경남, 전남, 충남, 그리고 충북의 37개 지역으로부터 체세포수가 문제가 된 농가 62개 젖소 목장의 CMT 양성반응을 보인 유방염 감염 의심 분방으로부터 유방염 검사를 위하여 70% 알코올 솜으로 유두를 세척한 다음 2~3회 전착유를 실시한 후 유즙을 무균적으로 채취하였다. 채취된 원유는 국립수의과학검역원에 의뢰되어 유방염 원인균을 분리 동정하였다.

체세포수 검사 및 *Streptococcus* spp.의 분리·동정

시료채취중 오염 등에 의한 위양성 결과를 배제시키기 위하여 유방염 감염여부와 매우 밀접한 관련이 있는 체세포수 검사를 Fossomatic 4000(Foss Electric, Denmark) 기기를 이용하여 실시하였다. 체세포수 검사결과가 ml당 20만개 이상의 원유를 유방염 감염 가능성이 높은 것으로 간주하고 1,252개 유즙을 대상으로 연쇄상구균 분리검사를 시도하였다. 즉, 유즙을 혈액배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 의심되는 집락은 그람 염색, 카탈라아제 시험, SF medium(Difco, USA)에서의 배양 정상 등을 기준으로 선별하였고, Vitek system

(bioMerieux, France)의 GPI card를 이용하여 최종적으로 *Streptococcus* spp.를 동정하였다. 균분리 및 유전형 분석을 위하여 대조균주로서 *S. uberis* ATCC 27958이 사용되었다.

항균제 감수성 검사

Ampicillin(10 µg/disk), oxacillin(1 µg/disk), cephalothin(30 µg/disk), amikacin(30 µg/disk), gentamicin(10 µg/disk), kanamycin(30 µg/disk), streptomycin(10 µg/disk), chloramphenicol(30 µg/disk), tetracycline(30 µg/disk), 그리고 neomycin(30 µg/disk) 등 10종의 항생제에 대한 감수성 검사는 디스크 확산법에 의하여 실시하였다. 즉, Muller-Hinton agar에 sheep blood(15 ml/500 ml)를 섞어 굳힌 다음, 균을 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양 후 균 발육 억제대를 측정하여 Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI)에 근거하여 감수성 여부를 결정했다 [13]. 항생제 디스크는 Sesi-Disc(BBL, USA) 제품을 사용하였다. 항생제 감수성 검사의 표준 균주로서 *S. aureus* ATCC 29213과 *S. aureus* ATCC 43300 균주를 각각 감수성 및 내성 균주로 이용하였으며, 또한 *S. pneumoniae* ATCC 49619 균주를 대조균주로 사용하였다.

또한, penicillin-G(P, 10 U), vancomycin(Va, 30 µg), 그리고 erythromycin(E, 15 µg) 3종에 대한 항생제 감수성 검사는 액체배지희석법을 이용하여 최소발육억제농도(Minimum inhibitory concentrations, MIC)에 의하여 결정하였다. 즉, 시험균은 Brain heart infusion broth(Difco, USA)에서 하룻밤 배양한 균액을 cation-adjusted Muller-Hinton Broth(Difco, USA)에 항균제 100 µl를 넣어 2배씩 단계별로 희석하였으며 최종 균의 농도는 5×10^5 CFU/ml 되도록 조정 한 100 µl를 96 well microplate(Costar, USA)에 항균제와 함께 혼합하여 37°C 배양기에서 18-24시간 반응시킨 후 가장 낮은 농도의 약제가 함유된 배지에서 균 발육이 억제된 곳의 농도를 실험균의 약제에 대한 최소발육억제 농도로 하였으며, 결과 판독은 CLSI 기준을 따랐다 [13].

PCR 법을 이용한 *Streptococcus uberis*의 유전형 분석

S. uberis 균주로 부터의 DNA 추출은 Hookey 등의 방법 [17]을 변형하여 사용하였다. 즉, 순수 분리한 균주를 BHI broth(Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 2,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 펠렛을 Tris EDTA buffer로 2회 세척하고 이를 다시 TE buffer 565 µl로 재부유시켰다. 30 µl의 20% sodium dodecyl sulfate(Sigma, USA), 5 µl의 proteinase K(20 µl/ml; Promega, USA), 그리고 50 µl의 lysozyme(200 µl/

mL; Sigma, USA)을 넣은 후 37°C에서 1시간 30분간 반응시켰다. 100 µl의 5 M NaCl과 80 µl의 CTAB/NaCl(10% CTAB, 0.7 M NaCl)를 혼합하여 65°C에서 20분간 반응시킨 후 동량의 phenol chloroform isoamylalcohol(25 : 24 : 1; Sigma, USA)을 첨가하여 15,000 rpm(4°C)에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 수거하여 동량의 chloroform isoamylalcohol(24 : 1; Sigma, USA)을 가한 후 15,000 rpm(4°C)에서 10분간 원심 분리 후 상층액을 수거하여 absolute ethanol (Sigma, USA)을 상층액의 2~3배 첨가하여 -70°C에서 1시간 정치시켰다. 15,000 rpm (4°C)에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 따라 버리고 튜브를 뒤집어 하룻밤 건조시킨 후 30 µl의 Tris EDTA buffer로 부유시켜 4°C에 보관하면서 사용하였다.

*S. uberis*의 유전형 분석은 Jayarao 등이 개발한 방법 [19]을 변형하여 사용하였다. 이때 사용된 primer는 5'-GTAAACGCC-3'의 염기서열을 나타내는 8.6 Dalton으로서 (주)바이오니아에 의뢰하여 제작하였다. 제작된 1.5 µl의 primer를 포함하여 2.5 µl의 10×PCR buffer(Promega, USA), 2 µl의 25 mM MgCl₂, 1 µl의 10 mM deoxynucleotide triphosphate mixture(Promega, USA), 5 µl의 DNA template 및 2 µl의 3.5 unit *Taq* polymerase(Promega, USA)의 혼합액에 DNase free water를 최종 25 µl가 되도록 첨가하여 thermal cycler(Perkin Elmer 9600, USA)에서 증폭을 시도하였다. PCR 반응 조건은 94.5°C에서 2분간 predenaturation시킨 후, 94.5°C에서 70초간 denaturation, 33°C에서 60초간 annealing, 72°C에서 130초간 extension의 cycle을 35회 반복 실시한 후 마지막 extension은 72°C에서 10분간 실시하였다. 10 µl의 증폭산물을 3 µl의 6× dye buffer에 혼합한 후, 1.8% agarose gel(ethidium bromide 1% 첨가)에 loading하여 150 V에서 50분간 전기영동하여 자외선 하에서 band를 확인하였다.

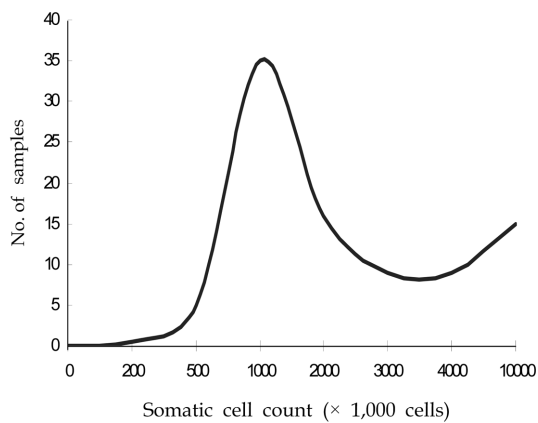
결 과

연쇄상구균의 분리

혈액배지에서 연쇄상구균 소견을 보인 집락증 그림 양성구균이면서 카탈라아제 음성, SF medium 음성인 균주를 대상으로 Vitek system의 GPI card로 최종 동정한 결과 87주의 연쇄상구균이 동정되었으며, 균종별 분포는 Table 1과 같다. 연쇄상구균 중 *S. uberis*가 46주(52.9%)로 가장 많이 분리되었으며, *S. bovis* 11주(12.6%), *S. oralis* 10주(11.5%), *S. agalactiae* 6주(6.8%)가 각각 분리되었다. 또한, *S. dysgalactiae*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans* 등의 일부 연쇄상구균도 분리되었다.

Table 1. Distribution of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis milk in the 2003 survey

Species	No. of isolates (%)
<i>Streptococcus uberis</i>	46 (52.9)
<i>Streptococcus bovis</i>	11 (12.6)
<i>Streptococcus oralis</i>	10 (11.5)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6 (6.8)
<i>Streptococcus salivarius</i>	4 (4.5)
<i>Streptococcus intermedius</i>	3 (3.4)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (2.3)
<i>Streptococcus mitis</i>	2 (2.3)
<i>Streptococcus sanguis</i>	2 (2.3)
<i>Streptococcus mutans</i>	1 (1.4)

**Fig. 1.** Distribution of somatic cell count on 87 *Streptococci* isolates in bovine mastitis milk.

연쇄상구균 감염 분방의 체세포수

연쇄상구균 감염으로 확인된 87개 분방의 체세포수에 대해서는 Fig. 1에서와 같이 1,000,000 cells/ml 전후가 가장 높게 많이 나타났다. 일반적인 임상형 유방염의 체세포수 기준인 3,000,000 cells/ml 이상은 전체 균주의 25.3%로 조사되었으며, 500,000 cells/ml 미만은 매우 낮은 것으로 나타났다.

항생제 감수성 양상

유방염으로부터 분리된 연쇄상구균에 대한 10종 항생제 종류별 감수성 결과는 tetracycline(11.5%), amikacin(14.9%), streptomycin(16.1%), neomycin(26.4%), kanamycin(35.6%), gentamicin(65.2%), oxacillin(70.1%), ampicillin(75.9%), chloramphenicol(78.2%), cephalothin(97.7%) 순으로 나타났다(Table 2). 연쇄상구균 중 *S. uberis*에 대한

Table 2. Antimicrobial susceptibility of 87 *Streptococci* isolated from bovine mastitis milk

Antimicrobial Agents	No. of isolates (%)		
	Resistance	Intermediate susceptibility	Susceptibility
AM	2 (2.3)	19 (21.8)	66 (75.9)
OX	26 (29.9)	13 (14.9)	48 (55.2)
CF	2 (2.3)	9 (10.3)	76 (87.4)
AN	74 (85.1)	8 (9.2)	5 (5.7)
GM	32 (36.8)	17 (19.5)	38 (43.7)
K	56 (64.4)	17 (19.5)	10 (16.1)
S	73 (83.9)	10 (11.5)	4 (4.6)
C	19 (21.8)	25 (28.7)	43 (49.5)
TE	77 (88.5)	4 (4.6)	6 (6.9)
N	64 (73.6)	18 (20.7)	5 (5.7)

AM; Ampicillin(10 µg/disk), OX; oxacillin(1 µg/disk), CF; cephalothin(30 µg/disk), AN; amikacin (30 µg/disk), GM; gentamicin(10 µg/disk), K; kanamycin(30 µg/disk), S; streptomycin(10 µg/disk), C; chloramphenicol(30 µg/disk) TE; tetracycline(30 µg/disk), N; neomycin(30 µg/disk).

항생제 종류별 감수성 결과는 streptomycin(8.7%), tetracycline(15.2%), amikacin(17.4%), neomycin(30.4%), kanamycin(43.6%), chloramphenicol(56.5%), oxacillin(56.5%), gentamicin(58.7%), cephalothin(95.6%), ampicillin(97.8%) 순으로 나타났다(Table 3). 이에 반하여 *S. bovis*와 *S. oralis*의 항생제 감수성 시험에서 amikacin (0% & 10%), neomycin(9.1% & 10.0%), streptomycin(0% & 20%), chloramphenicol(45.4% & 0%), oxacillin(36.4% & 0%) 등 일부 항생제는 균종별 항생제 감수성에 있어 차이가 있는 것으로 나타났다.

연쇄상구균 중 가장 분리율이 높은 *S. uberis*에 대하여 추가적으로 erythromycin, penicillin-G, vancomycin 3종 항생제에 대한 감수성을 조사한 결과 각각 24.0%, 80.4%, 87.0%로 조사되었다(Table 4). 또한, *S. uberis*에 대하여 13종 항생제에 대한 다제 내성을 분석한 결과 대부분의 *S. uberis* 분리주가 Table 5에서 나타난 것처럼 amikacin, streptomycin, erythromycin, tetracycline에 대한 다제 내성을 나타내었으며, 39주(84.8%)가 4개 이상의 항생제에 대하여 다제내성을 나타내었다.

*S. uberis*의 유전형 분석

S. uberis ATCC 27958 표준균주와 분리균주 46주의 genomic DNA를 8.6d primer의 절편 분포에 따라 분류한 결과 *S. uberis* 분리주의 절편 수는 3~8개의 분포를 보였

Table 3. Antimicrobial susceptibility by disk diffusion methods of *Streptococcus uberis*, *S. bovis* and *Streptococcus oralis* strains isolated from bovine mastitis milk

Anti-microbial agents	No. of isolates (%)								
	<i>S. uberis</i> (n = 46)			<i>S. bovis</i> (n = 11)			<i>S. oralis</i> (n = 10)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AM	1 (2.2)	14 (30.4)	31 (67.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (100.0)	0 (0.0)	2 (20.0)	8 (80.0)
OX	20 (43.5)	10 (21.7)	16 (34.8)	4 (36.4)	2 (18.2)	5 (45.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (100.0)
CF	2 (4.4)	5 (10.8)	39 (84.8)	0 (0.0)	2 (18.2)	9 (81.8)	0 (0.0)	1 (10.0)	9 (90.0)
AN	38 (82.6)	6(13.0)	2 (4.4)	11 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (90.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
GM	19 (41.3)	8 (17.4)	19 (41.3)	9 (81.8)	2 (18.2)	0 (0.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	8 (80.0)
K	26 (56.5)	9 (19.6)	11 (23.9)	11 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (70.0)	2 (20.0)	1 (10.0)
S	42 (91.3)	4 (8.7)	0 (0)	11 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (80.0)	2 (20.0)	0 (0.0)
C	12 (26.1)	8 (17.4)	26 (56.5)	5 (45.4)	3 (27.3)	3 (27.3)	0 (0.0)	3 (30.0)	7 (70.0)
TE	39 (84.8)	1 (2.2)	6 (13.0)	11 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
N	32 (69.6)	11 (23.9)	3 (6.5)	10 (90.9)	1 (9.1)	0 (0.0)	8 (80.0)	1 (10.0)	1 (10.0)

AM; Ampicillin, OX; oxacillin, CF; cephalothin, AN; amikacin, GM; gentamicin, K; kanamycin, S; streptomycin, C; chloramphenicol, TE; tetracycline, N; neomycin, R; Resistance, I; Intermediate susceptibility, S; Susceptibility

Table 4. Antimicrobial susceptibility by broth dilution methods of 46 *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis milk

Antimicrobial agents	No. of isolates (%)		
	Resistance	Intermediate susceptibility	Susceptibility
Erythromycin	35 (76.0)	1 (2.2)	10 (21.8)
Penicillin G	1 (2.2)	8 (17.4)	37 (80.4)
Vancomycin	6 (13.0)	0 (0.0)	40 (87.0)

Table 5. Antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis milk

Patterns of antibiotic resistances types	No. of isolates (%)
AN, S, N	7 (15.2)
AN, S, E, TE	5 (10.9)
AN, S, E, TE, N	9 (19.6)
AN, S, E, TE, GM, K	13 (28.3)
AN, S, E, TE, N, GM, K, OX	6 (13.0)
AN, S, E, TE, N, GM, K, OX, C, CF	6 (13.0)
Total	46 (100.0)

AN; amikacin, S; streptomycin, N; neomycin, E; erythromycin, TE; tetracycline, GM; gentamicin, K; kanamycin, OX; oxacillin, C; chloramphenicol, CF; cephalothin

으며, 크기는 180 bp에서 1,200 bp로 나타났다(Fig. 2). 분리주의 유전형은 A, B, C, D, E, F, G, H의 8개 subtype

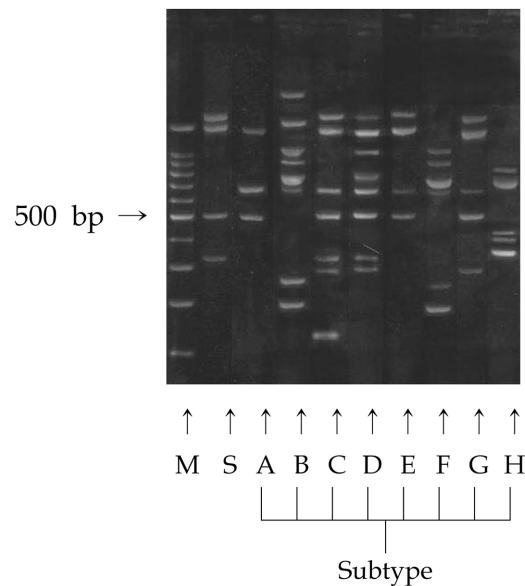


Fig. 2. Random amplified polymorphic DNA PCR patterns of *Streptococcus uberis*. M : molecular size markers, S : standard strain (*Streptococcus uberis* ATCC 27958), A-H: isolates of *Streptococcus uberis*, respectively.

으로 분류되었으며, 8개의 subtype 중 D, E, G subtype의 분포가 각각 10.9%, 15.2%, 17.4%로 가장 높은 분포를 나타내었다(Table 6). 8개 subtype별 항생제 감수성 및 내성 양상을 비교 조사한 결과에서 D subtype은 tetracycline, erythromycin 항생제에 대해서는 100%의 감

Table 6. Comparison of antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *Streptococcus uberis* subtypes by random amplified polymorphic DNA PCR method

Subtype	No. of isolates (n = 37)	No. of fragment	Antimicrobial	
			Resistance	Susceptibility
A	4	3	S, TE, E	CF, P, Va
B	3	8	AN, C OX, E, Va	P
C	4	7	S, TE	AM, CF, C, P, Va
D	5	8	CF, C, OX, P, Va	TE, E
E	7	4	AN, S	AM, CF, C, P, Va
F	4	6	C, S, TE	AM
G	8	5	N, TE, E	AM, CF, P, Va
H	2	6	AN, K, N, S	AM, CF, C, GM, OX, P, Va

수성을, E subtype은 ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, penicillin, vancomycin에 대해서는 100%의 감수성을, G subtype은 ampicillin에 대해서는 100%의 감수성을 각각 나타내어 subtype별 항생제 감수성 차이가 있는 것으로 나타났다.

고 찰

캐나다, 미국, 네덜란드, 영국에서의 임상형 유방염 발생률 중 약 14-26%가 *S. uberis*에 의한 것으로 보고되었으며 [16], 방목을 주로 하는 뉴질랜드와 호주에서도 *S. uberis*가 주요 유방염 원인균으로 보고되었다 [23, 30]. 미국 캘리포니아에서 연쇄상구균에 대한 균 분리 결과 *S. dysgalactiae* 42.2%, *S. uberis*가 39.9%, 그리고 enterococci는 11.1%로 조사되었다 [26]. 이러한 결과는 본 연구에서 전체 유방염 발생 원인체중 연쇄상구균에 의한 발생 비율을 조사하지 않아서 직접적으로 비교할 수 없지만 분리된 연쇄상구균 중 환경성 연쇄상구균의 대표균주인 *S. uberis*가 52.9%로서 전염성 연쇄상구균의 대표균주인 *S. agalactiae* 6.8%에 비하여 매우 높은 분리율을 나타낸 성적에 비추어 볼 때 국내에서도 최근에는 환경성 유방염 원인체에 의한 유방염이 문제시되며 연쇄상구균에서는 *S. uberis*가 주요 원인체라는 사실을 제시해주고 있다. 이러한 원인으로서는 무엇보다도 국내에서도 1993년부터 체세포수에 의한 유대차등적용 실시에 의하여 대부분의 낙농가들이 효과적인 유방염 관리를 위하여 유방염 5대 관리프로그램을 지속적으로 적용한 결과로 판단된다.

한편, 유방염은 재감염이 쉬운 질병으로서 1회의 비유기에 두 번 감염된 소의 64%는 세번째 감염이 일어나고 세번째 감염된 소의 70%는 네번째의 감염이 일어난다 [24]. 그러므로 감염된 소가 우군내에 있으면 병원

균 전파의 온상이 되고 최종적으로는 다른 건강한 소로 전파되기 때문에 유방염이 반복적으로 발병되는 소는 도태시키는 것이 바람직하다. 하지만 도태는 경제적 손실이 상대적으로 높기 때문에 적절한 항생제를 이용한 유방염 치료가 권장되지만 치료효과를 높이기 위해서는 유방염 원인균에 대한 약제 감수성 검사가 선행되어야 한다 [10].

본 연구에서 연쇄상구균에 대한 항생제 감수성 조사에서 tetracycline(11.5%), amikacin(14.9%), streptomycin(16.1%), neomycin(26.4%), kanamycin(35.6%)이 50% 이하의 감수성을 나타냈으며, gentamicin(65.2%), oxacillin(70.1%), ampicillin(75.9%), chloramphenicol(78.2%), cephalothin(97.7%)이 50% 이상의 감수성을 나타내었다. 이러한 결과는 김 등 [3]이 경남 남부지역에서 조사한 ampicillin 84.3%, penicillin 75.7%, cephalothin 67.1%, gentamicin 25.1%, neomycin 13.1%, tetracycline 26.4%, streptomycin 2.4%의 감수성을 보인 성적 [12]과는 전반적으로 비슷한 양상을 나타내었다. 하지만 1970년대 김 등 [3]이 조사한 항생제 감수성에서 lincomycin 81.9%, chloramphenicol 76.4%, tetracycline 78.5%, erythromycin 83.2%, streptomycin 57.5% 등 대부분의 항생제가 높은 감수성을 보인 성적과 김 [2]이 1984년부터 1988년까지의 임상형 유방염에서 ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, lincomycin이 70-100%의 감수성을 보인 성적과, 손 [4]이 조사한 항생제 감수성 결과에서 cephalothin 72.3%, gentamicin 55.2%, tetracycline 48.7%, erythromycin 45.5%, chloramphenicol 41.0%, streptomycin 29.1%의 성적과 비교해 볼 때 과거에 비해 점차 항생제 내성율이 높아지고 있는 것으로 나타났다.

또한, 이 등 [7]이 전남 및 충남 성환지역에서 조사한 tetracycline 36.8%, neomycin 42.1%, kanamycin 42.1%,

penicillin 42.1%, cephalothin 44.7%, ampicillin 50.0%, gentamicin 63.2%의 감수성 성적과 강 등 [1]이 조사한 gentamicin, streptomycin, kanamycin, ampicillin, cephalothin의 감수성은 높지만 penicillin, tetracycline에 대해서는 내성이 높게 나타났다는 성적과 본 연구의 성적을 비교해 볼 때 항생제 종류별로 약간의 차이가 있었다. 이것은 항생제 감수성 조사 시기 및 지역, 균종, 유방염 치료에 사용되는 사용제의 종류 및 사양관리 방법 등에 의한 차이로 사료된다. 실제적으로 본 연구에서 *S. uberis*, *S. bovis* 및 *S. oralis* 균주의 항생제 감수성 정도를 비교해 볼 때 일부 항생제에 있어서는 균종별 차이가 있는 것으로 나타났다.

Rossitto 등 [26]이 미국 캘리포니아 농장의 *S. uberis* 분리주의 항생제 감수성 조사에서 penicillin 50.4%, ampicillin 92.5%, oxacillin 96.2%, cephalothin 97.2%, erythromycin 51.9%, tetracycline 27.1%로서 tetracycline을 제외한 대부분의 항생제에서 감수성을 보인 성적과 Guerin-Fauble 등 [15]이 조사한 tetracycline, macrolide 계열의 항생제와 aminoglycoside 계열의 streptomycin, kanamycin에 대해서 내성을 보인 성적과 본 연구의 결과를 비교해 볼 때 항생제 종류별 감수성 수준에 있어서는 약간의 차이는 있지만 전체적인 감수성 양상은 유사한 결과를 나타내었다.

한편, Salmon 등 [27]이 뉴질랜드 유방염으로부터 분리한 *S. uberis*의 penicillin과 erythromycin에 대한 MIC 감수성 판정기준($\mu\text{g/ml}$)인 0.125와 0.25 이하 수준보다도 낮은 0.06과 0.13으로 각각 조사되었다. 그러나 Salmon 등 [27]이 덴마크로부터 분리한 *S. uberis*의 penicillin, ampicillin, oxacillin, cephalothin, erythromycin에 대한 MIC 결과가 각각 $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.13 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.13 \mu\text{g/ml}$ 로서 감수성이 높게 나타난 것과 비교해 볼 때 본 연구에서 *S. uberis* 전체 균주의 97.8%가 penicillin에 감수성을 보인 결과와는 유사한 결과를 보였지만 erythromycin에 대한 감수성이 24.0%로서 낮게 나타난 성적과는 차이가 있었다.

연쇄상구균의 다제내성 결과에서 Guerin-Fauble 등 [15]은 tetracycline, streptomycin, kanamycin에 다제내성을 나타내는 균주가 14% 이상이 되는 것으로 보고하였다. 국내의 경우 손 등 [5]이 5개 이상 및 3-4개의 항생제에 내성을 나타내는 경우가 각각 38.5%와 36.5%로 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 amikacin, streptomycin, erythromycin, tetracycline 등 4개 이상의 항생제에 대한 다제내성을 나타내는 *S. uberis* 분리율이 84.8%로 높게 조사된 것에 비추어 볼 때 항생제 종류별 내성에 있어서는 국내 및 외국의 보고와 큰 차이가 없지만 다제내성 균주가 과거에 비하여 큰 폭으로 증가하고 있

는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 한국동물약품협회에서 보고한 1980년 이후 국내의 aminoglycoside 및 tetracycline 계열의 동물용 항생제 사용량 증가와 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다. 부적절한 용량과 부적당한 항생제의 선택은 내성균주의 출현을 촉진하는 역할을 하기 때문에 항생제 구입의 접근성이 용이할수록 이의 남용과 오용이 증가하리라는 예측은 어렵지 않다. 더욱이 동물약품의 경우에는 수의사의 처방없이 대부분 구입할 수 있어서 축주의 자가 처방률이 높은 우리나라에서는 항생제의 오남용으로 항생제 내성 세균의 출현이 초래되어 항균제 치료요법에 어려움을 겪게 될 가능성이 높다. 따라서 항균제 선택의 근거가 되는 자료를 구하기 위해서 항생제 감수성 검사를 주기적으로 실시할 필요성이 있을 것으로 보고되었다 [9].

*S. uberis*는 젖소의 신체 여러 부위와 우사 환경 등 다양한 장소에서 서식하면서 준입상형 및 입상형 유방염을 일으키는 원인체로서 연쇄상구균중 가장 분리율이 높지만 유방염과 관련되는 역학적 정보들이 불충분하여 유방염 예방에 많은 어려움이 있다 [12, 25]. 그리하여 본 연구에서는 연쇄상구균 종간의 유전학적 특성을 구별하는데 사용되는 primer를 이용하여 46주 *S. uberis*의 유전형형을 조사한 바 37주에서 8개로 분류되었으며 크기는 180 bp에서 1,200 bp로 나타났다. 이러한 결과는 Jayarao 등 [19]이 유방염으로부터 분리한 *S. uberis* 24주에서 120 bp에서 1,400 bp 크기를 가진 유전자로서 15개의 유전형형을 보였다는 성적과는 약간의 차이가 있었다. 이러한 원인은 분리 균주의 기원에 따른 차이로 생각된다.

한편, 본 연구에서 조사된 8개의 type 중 D, E, G type의 분포가 각각 10.9%, 15.2%, 17.4%로 높은 분포율을 보였으며, 유전형별 항생제 감수성 결과에서는 D type이 tetracycline, erythromycin에 대해서, E type은 ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, penicillin-G, vancomycin에 대해서, 그리고 G type은 ampicillin에 대하여 각각 100%의 감수성을 나타내어 유전형별로 다른 감수성 양상을 보이는 것으로 나타났다. 또한, 시험기간 동안 동일한 목장에서 개체는 다르지만 지속적으로 거의 동일한 유전형의 *S. uberis*가 분리됨을 알 수 있어서 균주의 기원 및 감염경로, 균주의 특성을 확인하는데 있어서 매우 유용한 방법으로 확인되었다. 하지만, 전체 46주 중 9주의 유전형은 8개 유전형과는 심한 유전적인 이질형태를 보였다. 그 원인을 규명하기 위해서는 유전적 변이인지, 또는 *S. parauberis* 인지를 알아보기 위한 추가적인 시험이 필요할 것으로 보인다. 향후 *S. uberis* 정확한 유전학적 특성 규명을 위해서는 다양한 장소로부터 좀 더 많은 시료를 대상으로 폭넓은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

유방염을 치료하기 위해서는 원인균을 밝혀 그 항생제 감수성 정보가 필수적인데, 연쇄상구균에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *S. uberis* 균주에 대한 항생제 감수성과 유전학적 특성을 조사하였다. 임상형 또는 준임상형 유방염 감염우의 유즙으로부터 연쇄상구균을 분리한 바 *S. uberis*가 46주(52.9%)로 가장 많이 분리되었으며, *S. bovis* 11주(12.6%), *S. oralis* 10주(11.5%), *S. agalactiae* 6주(6.8%) 분리되었다. 기타 *S. dysgalactiae*, *S. salivarius*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*도 일부 분포하는 것으로 나타났다. *S. uberis*의 13종 항생제에 대한 감수성 시험에서 amikacin(85.1%), kanamycin(64.4%), neomycin(73.6%), streptomycin(83.9%), tetracycline(88.5%), erythromycin(76.0%) 항생제에 대하여 높은 내성을 나타냈으며, ampicillin(75.9%), cephalothin(87.4%), penicillin-G(80.4%), vancomycin(87.0%) 항생제에 대하여 높은 감수성을 나타내었다. 또한, 4개 이상의 항생제에 다제내성을 나타내는 분리주가 84.8%로 높게 나타났다. *S. uberis* 분리주에 대한 유전학적 특성을 조사한 바 180 bp에서 1,200 bp크기를 가진 절편이 3~8개의 분포를 보였으며, 8개의 type으로 분류되었다. 유전형에 따른 항생제 감수성 양상에도 차이가 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 강희장, 김익천, 김진희, 손원근, 이두식. 젖소의 원인균 분리 및 약제 감수성 검사. 대한수의학회지 2001, **41**, 511-521.
2. 김 두. 유우의 임상형 유방염 원인균과 항생제 감수성의 변화 양상. 대한수의학회지 1988, **28**, 397-404.
3. 김충희, 김근섭, 허정호, 점명호, 김국현, 조명희, 이국천, 류재두, 하대식, 김중수. 경남 남부지방에서 임상형 유방염의 원인균 분리 및 약제 감수성 시험. 한국임상수의학회지 2003, **20**, 177-184.
4. 손봉환. 유방염 감염 조사 및 예방대책에 관한 연구. (최근 3년간(91-93) 유방염 발생 실태에 관한 최종결과 보고서), 한국가축위생학회, 서울, 1994.
5. 손봉환, 김효민, 한웅주, 정홍환, 김수장. 경기도지역의 유우 유방염에 관한 조사. 4. 유우 유방염에서 분리한 *Staphylococcus*와 *Streptococcus*의 항균제에 대한 감수성시험. 대한수의학회지 1975, **15**, 101-108.
6. 송영민, 김기일, 김창수, 최석호, 윤영호. 환경형 유방염 원인균 *Streptococcus uberis*의 Genomic DNA Typing과 항생제 감수성. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 93-100.
7. 이정치, 이채용, 김상기, 이정길, 서국현. Holstein 유우의 유즙에서 분리한 유방염 원인균의 항균제 감수성. 한국임상수의학회지 2003, **20**, 166-171.

8. 정창국, 한홍율, 정길택. 우리나라 젖소 유방염 원인균 역학조사 및 치료에 관한 연구. 대한수의학회지 1970, **10**, 39-45.
9. 한홍율, 박선일, 유종현. 항생제 내성에 관한 수의학적 고찰. 대한수의학회지 1998, **34**, 483-489.
10. Anon. Veterinary Investigation Surveillance Report, Veterinary Laboratories Agency. London, 2001.
11. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J 2002, **164**, 116-128.
12. Bramley AJ, Dodd FH. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. J Dairy Res 1984, **51**, 481-512.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2nd, NCCLS document M32-A2, Wayne, Pennsylvania, 2002.
14. Dodd FH, Westgarth DR, Griffin TK. Strategy of mastitis control. J Am Vet Med Assoc 1977, **170**, 1124-1128.
15. Gurin-Fauble V, Tardy F, Bouveron C, Carret G. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. Int J Antimicrob Agents 2002, **19**, 219-226.
16. Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE, Brockett BL, Conrad HR. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. J Dairy Sci 1989, **72**, 1547-1556.
17. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J Clin Microbiol 1998, **36**, 1083-1089.
18. Leigh JA. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis. Vet J 1999, **157**, 225-238.
19. Jayarao BM, Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM, Oliver SP. Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. J Clin Microbiol 1992, **30**, 1347-1350.
20. King JS. *Streptococcus uberis*: a review of its role as a causative organism of bovine mastitis. I. Characteristics of the organism. Br Vet J 1981, **137**, 36-52.
21. Mackey ET, Hinton M. The survival of streptococci and enterococci in animal feed and on straw with particular reference to *Streptococcus uberis*. J Appl Bacteriol 1990, **68**, 345-348.

22. **Oliver SP.** Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. *Am J Vet Res* 1988, **49**, 1789-1793.
23. **Pankey JW, Pankey PB, Barker RM, Williamson JH, Woolford MW.** The prevalence of mastitis in primiparous heifers in eleven Waikato dairy herds. *N Z Vet J* 1996, **44**, 41-44.
24. **Philpot WN.** Economics of mastitis control. *Vet Clin North Am large Anim Pract* 1984, **6**, 233-245.
25. **Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF.** Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 2001, **39**, 1460-1466.
26. **Rossitto PV, Ruiz L, Kikuchi Y, Glenn K, Luiz K, Watts JL, Cullor JS.** Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J Dairy Sci* 2002, **85**, 132-138.
27. **Salmon SA, Watts JL, Aarestrup FM, Pankey JW, Yancey RJ Jr.** Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J Dairy Sci* 1998, **81**, 570-578.
28. **Smith KL, Hogan JS.** Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993, **9**, 489-498.
29. **Watts JL.** Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 1988, **16**, 41-66.
30. **Williamson JH, Woolford MW, Day AM.** The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *N Z Vet J* 1995, **43**, 228-234.
31. **Zadoks RN, Tikofsky LL, Boor KJ.** Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. *Vet Microbiol* 2005, **109**, 257-265.