

젖소 유방염으로부터 분리한 그람음성균의 분포 및 항생제 감수성

이은실 · 강현미¹ · 정충일 · 문진산^{1,*}

건국대학교 낙농학과, ¹국립수의과학검역원
(게재승인: 2007년 2월 22일)

Antimicrobial susceptibility and prevalence of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis

Eun-Sil 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: February 22, 2007)

Abstract : Environmental mastitis has increased particularly in well-managed or low somatic cell count herds that have successfully controlled contagious pathogens. Major pathogens of environmental mastitis are *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Streptococcus uberis*. The present study was conducted to investigate the isolation and antibiotic susceptibility of 406 (21.8%) gram-negative bacteria isolated mastitis milk from 1,865 quaters of 241 Korean dairy farms from 2001 to 2004. Prevalence of major gram-negative bacteria isolated from mastitis milk were *E. coli* (22.7%) and *Enterobacter* spp. (16.3%) in coliforms and *Pseudomoas* spp. (10.3%) and *Serratia* spp. (7.9%) in non-coliforms. The results on antibiotic susceptibility by agar diffusion test against these pathogens were 86.7% in piperaciliin, 94.6% in cefepime, 85.5% in amikacin, 87.7% in gentamicin and so on. In contrast, the susceptibility against ampicillin (41.9%), cephalothin (9.9%), streptomycin (39.9%) and tetracycline (46.7%) appeared to be below 50%. Gram-negative bacteria showed the high minimal inhibitory concentration on cephalothin (96.1%), streptomycin (99.5%) and tetracycline (96.8%). According to year, distribution of high 256-64 µg/ml on cephalothin get increased, but the others are different. These findings demonstrate that major gram-negative bacteria were *E. coli* and *Enterobacter* spp. isolates, and often encountered the diverse antibiotic resistant patterns.

Key words : antimicrobial susceptibility, cow, gram negative bacteria, mastitis

서 론

유방염은 젖소 질병 중 가장 많이 발생하며, 우유 중 체세포수 증가 등으로 유질이 저하되고 우유 생산량의 감소와 치료비용 증가, 도태 등으로 낙농산업에 있어서 막대한 경제적 손실을 초래하는 질병이다. 유방염의 원인체로는 세균, 마이코플라스마, 효모와 조류 등 135종 이상이지만, 주요 원인체로는 포도상구균, 연쇄상구균, 그람음성균으로 보고되고 있다 [13].

유방염 원인체는 발생 양상에 의해서 전염성과 환경

성으로 분류되며 [12, 31], 전염성 유방염 원인균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*와 *Streptococcus agalactiae* 등이 있고, 환경성 유방염 원인균으로는 *Escherichia coli*(*E.coli*)와 *Streptococcus uberis* 등이 있다 [13]. 전염성 유방염은 감염된 분방을 통해 착유시에 전 우균에 전파되어 지속적으로 발생하여 주로 준임상형 및 만성 유방염을 일으킨다 [14, 23, 30]. 이에 반하여 환경성 유방염은 토양, 분변 및 생식기 분비물, 깔짚, 유방 및 유두, 그리고 착유기 세척에 사용되는 오염된 물 등의 주변 환경을 통해 유선조직에 침입하여 기

*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]

회감염을 일으키어 주로 일시적으로 임상형 유방염을 일으킨다 [19, 20, 24, 36].

‘유방염 5대 관리프로그램’을 적용한 후에는 전염성 유방염 원인균이 크게 감소되어 유질이 획기적으로 개선되었지만 사양관리가 우수하여 냉각기내 체세포수가 낮은 목장에서 환경성 유방염 원인균 근절에는 효과적이지 못하여 이러한 원인체에 의한 임상형 유방염이 점차적으로 문제되었다 [13, 21]. 이러한 그람음성균에 의한 환경성 유방염의 원인체로서 *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. 등과 같은 coliforms 이라는 보고가 있지만 [13, 30], *Pseudomonas* spp.와 *Serratia* spp. 등과 같은 Non-coliforms이 원인체라는 보고들도 있다 [16, 33].

한편, 효과적인 유방염 치료를 위해서는 적절한 치료 약제를 선정하고 투여용량, 치료횟수, 치료기간 또는 투여경로와 부형제 등을 합리적으로 적용하여야 하며, 특히 항균제의 선택은 유방염 원인균에 대한 감수성 검사 후에 수반되는 것이 중요하다 [9, 32]. 국내에서도 1970년 정 등 [6]이 유방염 원인균에 대한 항생제 감수성 결과에 대한 보고서를 발표한 이후 점차적으로 검사가 확대되었다. 국가적 차원에서 1991-1993년에 각 시도 단위의 유방염 역학조사가 실시되었으며 [3], 2000년 이후에도 경기, 전남, 경남지역을 대상으로 유방염 원인체에 대한 감수성 성적이 보고되었다 [2, 4].

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 모니터링 할 필요성이 있다 [3]. 특히, 최근 낙농업의 형태가 전업화 및 규모화 되면서 농가별 평균 사육두수가 증가되고 사육 환경이 열악해져 환경성 유래의 그람음성균에 의한 유방염이 더욱 문제가 될 가능성이 높다. 하지만 그동안 대부분의 연구가 *E. coli* 중심으로 이루어져 있으며, Non-coliforms 균주를 비롯하여 그람음성균의 다양한 균주에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 그람 음성균에 의한 유방염의 보다 정확한 치료와 예방을 위한 기초자료로 활용하고자 그람 음성균에 대한 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

재료 및 방법

대상목장 및 공시재료

2001년 8월부터 2004년 7월까지 경기, 강원, 충청, 전

라 및 경상도 지역 등 전국 24개 체세포수 문제목장의 CMT(California mastitis test) 양성반응을 보인 유방염 감염 의심 분방유 1,865개를 대상으로 유방염 원인균 검사를 위하여 70% 알코올 솜으로 유두를 세척한 다음 2-3회 전착유를 실시한 후 유즙을 무균적으로 채취하였다. 채취된 원유는 냉장상태에서 운반된 후에 체세포수 및 유방염 원인균 검사에 사용되었다.

우유중 체세포수 검사

시료채취 중 오염 등에 의한 위양성 결과를 배제시키기 위하여 유방염 감염여부와 매우 밀접한 관련이 있는 체세포수 검사기기(Fossomatic 4000, Foss Electric, Denmark)를 이용하여 실시하였다. 체세포수 검사결과가 ml당 20만개 이상의 원유에 대하여 유방염 원인균 검사를 실시하였다.

그람음성균의 분리 및 동정

유방염 가검물 시료를 혈액배지상에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 의심되는 집락을 그람염색, Oxidase 시험 등을 기준으로 선별한 다음, Vitek system (bioMerieux, USA)의 GNI card를 이용하여 최종적으로 동정하였다.

항생제 감수성 검사

젖소 유방염 유래 그람음성균에 대한 항생제 감수성 검사는 Kirby-Bauer [11]의 디스크 확산법을 이용하여 실시하였다. 시험에 사용한 항생제는 ampicillin(10 µg/disk), piperacillin(100 µg/disk), ticarcillin(75 µg/disk), amoxicillin/clavulanic acid(20/10 µg/disk), cefazolin(30 µg/disk), Cephalothin(30 µg/disk), cefamandole(30 µg/disk), cefepime(30 µg/disk), amikacin(10 µg/disk), gentamicin(10 µg/disk), kanamycin(30 µg/disk), streptomycin(10 µg/disk), tobramycin(10 µg/disk), rifampin(5 µg/disk), trimethoprim(5 µg/disk), chloramphenicol(30 µg/disk), tetracycline(30 µg/disk) 등 17종을 사용하였으며, 항생제 디스크는 Sensi-Disc(BBL, USA) 제품을 사용하였다. 즉, Muller-Hinton agar에 균을 접종한 다음 항생제 디스크를 배지 위에 놓은 다음 37°C에서 24시간 배양 후 균 발육 억제대를 측정하여 Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI)에 근거하여 감수성 여부를 결정했다 [15]. 이때 항생제 감수성 검사의 표준균주로서 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

또한, 국내에서 동물용 항생제로서 널리 사용되고 있고 그 동안의 연구보고 [3, 4]에서 전체적으로 항생제 내성율이 높게 나타난 cephem계, aminoglycoside계와 tetracycline계에 대한 내성 정도를 조사하기 위하여 각 계열별로 cephalothin, streptomycin, tetracycline 3종을 선

정하여 추가적으로 액체배지희석법을 이용하여 최소발육억제농도(Minimum inhibitory concentrations, MIC)를 조사하였다. 즉, 시험균은 Brain heart infusion broth(Difco, USA)에서 하룻밤 배양한 균액을 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 최소 발육억제 농도로 하였으며, 결과 판독은 CLSI [15] 기준을 따랐다.

결 과

그람음성균 감염율 및 체세포수 분포

2001년 8월부터 2004년 9월까지 젖소 유방염 우유 1,865개 시료로부터 유방염 원인균 검사를 실시하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 그람 음성균으로 분리된 균주는 총 406(21.8%)주로 조사되었다. 또한, 감염된 분방의 체세포수 분포율에 있어서는 20-50만, 50만-100만, 100-300만 cells/ml이 각각 41.0%, 24.3%, 23.9%로 나타났으며, 일반적인 임상형 유방염의 체세포수 기준인 300만 cells/ml 이상이 전체 균주의 10.8%로 나타났다.

그람음성균의 분포

그람음성균으로 분리된 총 406균주 중 coliforms이 217균주로 53.5%, Non-coliforms이 168균주로 41.4%, 그리고 미동정된 균주가 21균주로 조사되었다(Table 2). 또

한, coliforms 중에서는 *E. coli*가 92균주로서 22.7%를, *Enterobacter* spp.는 66균주로 16.3%를 나타내어 가장 주요한 원인균으로 나타났으며, 그 다음으로 *Klebsiella* spp.(8.4%)와 *Citrobacter* spp.(6.2%) 순으로 나타났다. Non-coliforms 중에서는 *Pseudomonas* spp.가 42균주로 10.3%, *Serratia* spp.가 32균주로 7.9%를 나타내어 가장 주요한 원인균으로 나타났으며, *Sphingomonas* spp.(5.7%), *Acinetobacter* spp.(4.9%) 그리고 기타 균주(11.6%)로 나타났다. 기타 균주에는 *Stenotrophomonas* spp., *Vibrio* spp., *Pasteurella* spp., *Pantoea* spp., *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Yersinia* spp., *Proteus* spp.와 *Shigella* spp. 등 총 20여종 이상이 확인되었으며, 이들 균주의 분포는 매우 미미한 것으로 나타났다.

연도별 균 분리율에 있어서는 2001년에 비하여 2003년과 2004년에는 *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp.는 상당히 감소된 반면, *E. coli*, *Klebsiella* spp.는 2배 이상 증가되는 것으로 나타났다. 또한, *Sphingomonas* spp. 균주는 2001년에는 전혀 분리되지 않았지만 2003년과 2004년에는 각각 9.3%와 5.5%가 분리되었다.

Table 1. Prevalence of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis milk according to year

Year	No. of farms	No. of sample	No. of isolates (%)
Aug. 2001-Nov. 2001	61	543	100 (18.4)
Jun. 2003-Dec. 2003	58	678	151 (22.3)
Jan. 2004-Sep. 2004	122	644	155 (24.1)
Total	241	1,865	406 (21.8)

Table 2. Distribution of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis milk

Class	Genus	Distribution rate (%)			
		2001	2003	2004	Total
Coliforms	<i>E. coli</i>	9 (9.0)	48 (31.8)	35 (22.6)	92 (22.7)
	<i>Klebsiella</i> spp.	5 (5.0)	15 (9.9)	14 (9.0)	34 (8.4)
	<i>Citrobacter</i> spp.	8 (8.0)	11 (7.3)	6 (3.9)	25 (6.2)
	<i>Enterobacter</i> spp.	30 (30.0)	9 (6.0)	27 (10.5)	66 (16.3)
	sub-total	52 (52.0)	83 (55.0)	82 (52.9)	217 (53.5)
Non-coliforms	<i>Serratia</i> spp.	4 (4.0)	11 (7.3)	17 (10.9)	32 (7.9)
	<i>Acinetobacter</i> spp.	2 (2.0)	10 (6.6)	8 (5.2)	20 (4.9)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	30 (30.0)	8 (5.3)	4 (2.6)	42 (10.3)
	<i>Sphingomonas</i> spp.	0 (0)	14 (9.3)	9 (5.8)	23 (5.7)
	<i>Pasteurella</i> spp.	2 (2.0)	1 (0.6)	1 (0.6)	4 (1.0)
	others	3 (3.0)	19 (12.6)	25 (16.5)	47 (11.2)
	sub-total	41 (41.0)	63 (41.7)	64 (41.2)	168 (41.4)
Unidentified	7 (7.0)	5 (3.3)	9 (5.9)	21 (5.2)	
Total	100 (100)	151 (100)	155 (100)	406 (100)	

Table 3. Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis milk by agar disk diffusion test

Bacteria	No. of isolates	Antimicrobial susceptibility by disk diffusion test (%)														TE		
		AM	PIP	TIC	AmC	CZ	CF	MA	FEP	AN	GM	K	S	NN	RA		TMP	C
<i>E. coli</i>	92	57 (61.9)	80 (86.9)	39 (42.4)	80 (86.9)	85 (92.4)	4 (4.3)	90 (97.8)	91 (98.9)	84 (91.3)	83 (90.2)	57 (61.9)	36 (39.1)	76 (82.6)	6 (6.5)	78 (84.8)	84 (91.3)	47 (51.1)
<i>Enterobacter</i> spp.	66	7 (10.6)	64 (96.9)	60 (90.9)	12 (18.2)	14 (21.2)	0 (0)	62 (93.9)	65 (98.5)	49 (74.2)	59 (89.4)	29 (43.9)	27 (40.9)	52 (78.8)	0 (0)	64 (96.9)	60 (90.9)	36 (54.5)
<i>Klebsiella</i> spp.	34	15 (44.1)	21 (61.8)	11 (32.4)	100 (100)	88.2 (50.0)	17 (50.0)	31 (91.2)	33 (97.1)	23 (67.6)	29 (85.3)	15 (44.1)	10 (29.4)	27 (79.4)	2 (5.9)	29 (85.3)	26 (76.5)	16 (47.1)
<i>Citrobacter</i> spp.	25	12 (48.0)	23 (92.0)	23 (92.0)	11 (44.0)	14 (56.0)	0 (0)	24 (96.0)	15 (100)	23 (92.0)	203 (92.0)	14 (56.0)	9 (36.0)	21 (84.0)	1 (4.0)	22 (88.0)	23 (92.0)	7 (28.0)
Subtotal	217	91 (41.9)	188 (86.6)	133 (61.3)	137 (63.1)	143 (65.9)	4 (1.8)	207 (95.4)	214 (98.6)	179 (82.5)	194 (89.4)	115 (52.9)	82 (37.8)	176 (81.1)	9 (4.1)	193 (88.9)	193 (88.9)	106 (48.8)
<i>Pseudomonas</i> spp.	42	7 (16.7)	38 (90.5)	38 (90.5)	15 (35.7)	13 (30.9)	2 (4.8)	18 (42.9)	37 (88.1)	41 (97.6)	39 (92.9)	7 (16.7)	14 (33.3)	35 (83.3)	8 (19.1)	20 (47.6)	29 (69.1)	3 (7.1)
<i>Serratia</i> spp.	30	12 (37.5)	31 (96.9)	30 (93.8)	7 (21.9)	18 (56.3)	0 (0)	16 (50.0)	32 (100)	31 (96.9)	30 (93.8)	26 (81.3)	17 (53.1)	19 (59.4)	5 (15.6)	29 (90.6)	29 (90.6)	9 (28.1)
Non- <i>Sphingomonas</i> coliforms spp.	23	19 (82.6)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	17 (73.9)	15 (65.2)	19 (82.6)	19 (82.6)	17 (73.9)	20 (62.5)	18 (56.3)	13 (40.6)	13 (40.6)	19 (82.6)	17 (73.9)	18 (56.3)	20 (62.5)
<i>Acinetobacter</i> spp.	20	9 (45.0)	14 (70.0)	18 (90.0)	13 (65.0)	6 (30.0)	2 (10.0)	10 (50.0)	19 (95.0)	14 (70.0)	14 (70.0)	13 (65.0)	9 (45.0)	13 (65.0)	5 (25.0)	4 (20.0)	9 (45.0)	10 (50.0)
Others	51	22 (43.1)	39 (76.5)	32 (62.7)	24 (47.1)	15 (29.4)	11 (21.6)	29 (76.5)	42 (82.4)	49 (96.1)	46 (90.2)	30 (58.8)	23 (45.1)	38 (74.5)	20 (39.2)	33 (64.7)	37 (72.5)	29 (76.5)
Subtotal	168	69 (41.1)	145 (86.3)	141 (83.9)	82 (48.8)	69 (41.1)	30 (17.8)	92 (54.8)	149 (88.7)	152 (90.5)	149 (88.7)	94 (55.9)	76 (45.2)	118 (70.2)	57 (33.9)	103 (61.3)	122 (72.6)	71 (42.3)
Unidentified	21	10 (47.6)	19 (90.5)	17 (80.9)	17 (80.9)	14 (66.7)	6 (28.6)	19 (90.5)	21 (100)	16 (76.2)	13 (61.9)	9 (42.9)	4 (19.1)	13 (61.9)	5 (23.8)	16 (76.2)	18 (85.7)	12 (57.1)
Total	406	170 (41.9)	352 (86.7)	291 (71.7)	236 (58.1)	226 (55.7)	40 (9.9)	318 (78.3)	384 (94.6)	347 (85.5)	356 (87.7)	218 (53.7)	162 (39.9)	307 (75.6)	312 (76.8)	312 (76.8)	333 (82.1)	189 (46.7)

Am: ampicillin(10 µg/disk), PIP: piperacillin(100 µg/disk), TIC: ticarcillin(75 µg/disk), AmC: amoxicillin/clavulanic acid(20/10 µg/disk), CZ: ceftazidime(30 µg/disk), CF: cephalothin(30 µg/disk), MA: cefamandole(30 µg/disk), FEP: ceftepime(30 µg/disk), AN: amikacin(10 µg/disk), GM: gentamicin(10 µg/disk), K: kanamycin(30 µg/disk), S: streptomycin(10 µg/disk), NN: tobramycin(10 µg/disk), RA: rifampin(5 µg/disk), TMP: trimethoprim(5 µg/disk), C: chloramphenicol(30 µg/disk), TE: tetracycline(30 µg/disk).

그람 음성균의 항생제 감수성 양상

분리균에 대한 17종의 항생제에 대하여 디스크 확산 방법으로 감수성 검사를 실시한 바 piperacillin(86.7%), cefepime(94.6%), amikacin(85.5%) 및 gentamicin(87.7%), chloramphenicol(82.1%) 등이 80% 이상의 감수성을 보였으며, ampicillin(41.9%), cephalothin(9.9%), streptomycin(39.9%) 및 tetracycline(46.7%)에 대해서는 50% 이하의 감수성을 보였다(Table 3).

원인체별로 항생제 감수성 결과를 비교한 결과, coliforms에 속하는 *E. coli*는 cefepime(98.9%), cefamandole(97.8%), ceftazidime(92.4%) 등의 항생제에 대해 90% 이상의 감수성을 보인 반면, streptomycin(39.1%), rifampin(6.5%)과 cephalothin(4.3%) 등에 대해서는 낮은 감수성을 나타내었다. *Enterobacter* spp.는 cefepime(98.5%), piperacillin(96.9%), trimethoprim(96.9%) 등에 대하여 90% 이상의 감수성을 나타낸 반면, ampicillin은 10.6%, 그리고 cephalothin과 rifampin에 대해서는 모두 내성을 나타내었다. *Klebsiella* spp.의 경우에는 amoxicillin-clavulanic acid(100%), cefepime(97.1%) 및 cefamandole(91.2%) 등에 대하여 높은 감수성을, ticarcillin(32.4%), streptomycin(29.4%)과 rifampin(5.9%) 등에 대해 낮은 감수성을 보였다. *Citrobacter* spp.는 cefepime(100%), cefamandole(96.0%), piperacillin(92.0%) 등에 대해서 높은 감수성을 나타냈고, streptomycin(36.0%), tetracycline(28.0%) 및 rifampin(4.0%) 등에 대해서는 낮은 감수성을 나타내었다. 이와 같이 coliforms에 속하는 균주들 사이에서도 감수성 결과에 있어서는 약간의 차이를 나타내었다.

또한, Non-coliforms 원인체에 대하여 항생제 감수성 조사에서도 *Pseudomonas* spp.는 amikacin(97.6%), gentamicin(92.9%), piperacillin(90.5%) 등의 항생제에 대해서 높은 감수성 분포율을 보였고, gentamicin(16.7%), tetracycline(7.1%) 및 cephalothin(4.8%) 등에 대해서는 낮은 감수성을 보였다. *Serratia* spp.의 경우 cefepime(100%), piperacillin(96.9%), amikacin(96.9%), ticarcillin(93.8%)와 gentamicin(93.8%)에 대한 감수성 분포율은 높은 반면, ampicillin(37.5%), tetracycline(28.1%), amoxicillin-clavulanic acid(21.9%)과 rifampin(15.6%)에 대한 감수성을 나타내었다. *Sphingomonas* spp.는 piperacillin(100%), ticarcillin(100%), amoxicillin-clavulanic acid(100%)의 높은 감수성을 보였고, streptomycin(40.6%)과 tobramycin(40.6%)에 대해 낮은 감수성을 보였다.

균주별 항생제 감수성에서는 다른 균주들에 비하여 전반적으로 *Pseudomonas* spp. 균주가 가장 높은 내성을, 그리고 *Sphingomonas* spp. 균주가 가장 낮은 내성을 보였지만 몇몇 항생제에 대해서는 균주별로 약간의 차이

Table 4. Antimicrobial resistance of 406 gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis milk by minimal inhibitory concentration (MIC) test

Antibiotics	Standard of resistance (μl/ml)	No. of isolates by MIC for antibiotics (%)	
		Resistance	Susceptibility
Cephalothin	≥ 8	390 (96.1)	16 (3.9)
Streptomycin	≥ 2	404 (99.5)	2 (0.5)
Tetracyclin	≥ 4-8	393 (96.8)	13 (3.2)

Table 5. Comparison of antibiotic susceptibility by minimal inhibitory concentration (MIC) methods of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis milk according to year

Antibiotics	MIC (μl/ml)	Antimicrobial resistance (%)		
		2001	2003	2004
Cephalothin	≥ 256-64	70.0	64.9	100
	32-16	20.0	25.2	0
	≥ 8	2.0	4.6	0
Streptomycin	≥ 256-64	45.0	41.0	31.6
	32-16	34.0	45.0	55.5
	2-8	19.0	13.2	12.9
Tetracyclin	≥ 256-64	43.0	60.9	30.3
	32-16	42.0	28.5	53.5
	≥ 4-8	9.0	9.9	12.3

를 나타내었다. 하지만 전반적으로 coliforms과 Non-coliforms 균주와의 항생제 감수성 양상 비교에서 항생제 계열별로 유사한 결과를 나타내었다.

한편, 본 연구에서 디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 결과에서 가장 낮은 수준을 나타내고, 축산 분야에 널리 사용되고 있는 cephalothin, streptomycin과 tetracycline 3종 항생제에 대하여 최소발육억제농도 검사를 실시하여 내성 정도를 분석하였다. 그 결과 전체 406주 균주 중 각 항생제별 CLSI의 내성 기준 농도 이상을 보인 균주가 각각 390주(96.1%), 404주(99.5%), 그리고 393주(96.8%)를 나타내어 높은 내성률을 보이는 것으로 조사되었다(Table 4). 특히, cephalothin 항생제는 전체 균주의 79.6%가 높은 고도내성(≥ 256-64 μl/ml)을 보이는 것으로 나타났다. cephalothin, streptomycin과 tetracycline 3종 항생제에 대한 균주별 내성 정도는 균주별로 약간의 차이가 있었으나 그 수준은 미미한 것으로 나타났다. 하지만 균주별 내성 정도(고도, 중등, 저도)는 *Serratia* spp. 균주가 다른 균주에 비하여 상대적으로 높은 고도 내성

을 보이는 등 균주별로 약간의 차이가 있었다.

연도별로 항생제 감수성 양상을 비교해 보았을 때 cephalothin 고도내성 균주가 2001년도에는 70%였으나 2004년에 100%로 증가한 반면, 상대적으로 중등내성(32-16 µl/ml)과 저도내성(8 µl/ml) 균주는 감소하였다. Streptomycin의 경우에는 고도내성 균주가 2001년도(45.0%)에서 2004년도(31.6%)까지 감소한 반면, 중등내성 분포도는 34%에서 55.5%로 증가한 것으로 나타났으며, tetracycline에 대한 내성 분포도는 고도내성 분포도가 2001년도(43.0%)와 비교하였을 때 2003년도(60.9%)에 크게 증가하였다가 2004년도(53.5%)에 약간 감소하였고, 반면에 중등내성은 2003년도(28.5%)에 2001년도(42.0%) 보다 감소하였다가 2004년도 (53.5%)에 크게 증가하였다(Table 5).

고 찰

유방염 원인체 중 그람음성균에 의한 유방염 발생 양상 및 원인체의 비율은 조사 시기 및 지역별로 매우 다양하다. 1990년 미국에 있어서 임상형 유방염의 40%가 그람 음성균에 의해서 발생되었고 [17], 이스라엘과 핀란드에서는 임상형 유방염의 60% 이상과 약 20%의 비율이 coliforms에 의한 것으로 보고된 바 있다 [27, 29]. 또한, 2000년 이후 영국에서 임상형 유방염 원인균 중 가장 문제되는 원인체로는 *E. coli*(27%)와 *Streptococcus uberis*(23%)이며, 전염성 유방염 원인균은 전체의 18%로 조사되어 환경성 원인균의 중요성이 더욱 강조되고 있다 [9]. 또한 영국 내 유방염 조사에서 *E. coli*와 *Enterobacteriaceae* 균주의 34.7%와 40%가 임상형 유방염을 나타내었다. 이렇게 그람음성균에 의한 환경성 유방염 원인균이 주로 *Enterobacter* spp. *Klebsiella* spp. 등과 같은 coliforms이라는 보고가 지배적이지만, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Serratia* spp. 등의 non-coliforms이 원인균이라는 보고들 역시 적지 않은 비중을 차지하고 있다 [16, 33].

본 연구에서 그람음성균에 대한 분리율은 전체 시료 중 21.8%를 나타내었으며, 그 중 coliforms과 Non-coliforms의 비율은 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한, 원 인체별로는 *E. coli*(22.7%), *Enterobacter* spp.(16.3%), *Pseudomonas* spp.(10.3%), *Klebsiella* spp.(8.4%), *Serratia* spp.(7.9%) 등의 순으로 분리되었다. 이러한 결과는 국내에서 이와 박 [5]이 그람음성균에 의한 임상형 유방염 중에서 *E. coli*(59.3%), *Klebsiella pneumoniae*(18.5%), *Enterobacter aerogenes* (15.3%), *Pseudomonas aeruginosa* (3.4%)가 분리되었다는 성적과 비교해 볼 때 발병율에 있어서는 약간의 차이가 있었지만 주요 원인균이라는

사실과 유사하였다. 한편, 본 연구에서 *E. coli*가 22.6%로서 가장 높게 조사되었으며, 이러한 결과는 영국에서 Anon [9]과 미국에서 Bradely 등 [13]이 대표적인 그람 음성균의 원인체를 *E. coli*라고 보고한 성적과 비슷한 양상을 나타내었다.

E. coli, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp.에 의한 유방염 감염원의 주요 오염원은 각각 분변, 톱밥, 물로 보고되고 있으며 [25], *Klebsiella* spp.와 *E. coli* 유방염 발생 비율이 1:10에서 1:1까지 매우 다양하다 [10, 28]. 본 연구에서 주요 원인균에 대하여 연도별 균분리율을 조사한 결과 2001년에 비하여 2003년과 2004년에는 *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp.의 분리율은 점차적으로 상당한 수준으로 감소된 반면, *E. coli*, *Klebsiella* spp.는 2배 이상 증가된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 최근 우리나라의 낙농업의 형태가 전업화 및 규모화 되면서 농가별 평균 사육두수가 증가됨에 따른 사육환경의 열악함과 더불어 우사 바닥재로서 톱밥이 널리 사용되고, 유방 세척시에 물은 가능한 적게 사용하고 유방 세척후에는 마른수건을 사용하는 사양관리의 변화에 의한 것으로 사료된다.

한편, 목장에서 유방염을 치료하기 위해서는 항생제 감수성 검사에 기초하여 적절한 항생제를 선별하는 것이 바람직하지만, 이러한 조건이 만족되지 않은 경우에는 차선책으로 최근에 동일한 환경이나 지역에서 분리되었던 균주들의 역학적 자료에 근거를 두어야 한다 [9, 26]. 하지만, 우리나라의 경우에는 항생제가 함유된 유방염 주입제를 비롯하여 동물약품 사용에 있어서 주의사의 처방없이 대부분 쉽게 구입할 수 있어서 축주의 자가 처방률이 높기 때문에 항생제의 오남용으로 항생제 내성 세균의 출현이 초래되어 항균제 치료요법에 어려움을 겪게 될 가능성이 높으며, 이러한 결과로 인하여 외국에 비하여 국내에서 분리된 유방염 유래 병원균이 내성율이 높다 [7].

본 연구에서 디스크 확산법에 의한 17종 항생제에 대한 그람음성균의 감수성 시험에서 ampicillin(41.9%), cephalothin(9.9%), streptomycin(39.9%) 및 tetracycline (46.7%)의 항생제가 50% 이하의 낮은 감수성을 보였다. 이러한 결과는 손 등 [3]과 강 등 [1]이 보고한 내성율에 대한 분포도와 크게 다르지 않았고, 다른 항생제의 경우에도 그람음성균에 대한 내성율이 증가하고 있는 추세에서 제외되지 않는 것으로 나타났다.

또한, 본 연구에서 cephem계열의 cephalothin, aminoglycoside계열의 streptomycin과 tetracycline계열의 tetracycline 항생제에 대해 MIC에 의한 내성율에서 각각 96.1%, 99.5%와 96.8%로 매우 높게 나타났으며, 각 항생제에 대한 고도내성(≥ 256 -64 µl/ml) 균주가 각각 79.6%, 38.9%,

46.3%로 조사되어 항생제별로 내성 정도에 있어서도 차이가 있었다. 특히 cephalothin의 경우에는 고도내성이 점차적으로 증가하고 있는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 국내에서 손 등 [3]과 강 등 [1]이 유방염 유래 그람음성균에서 tetracycline에 대한 내성율이 각각 52.3%와 52.9%, 그리고 streptomycin에 대한 내성율은 각각 81.6%와 100%로 보고한 성과와 유사한 양상을 나타내었다. 이렇게 3종의 항생제에 대해 높은 내성을 보이는 원인으로 한국동물약품협회에서 보고한 연도별 항생제 생산현황과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. 즉, 1980년 이후 국내의 aminoglycoside 및 tetracycline 계열의 사료 첨가제용 항생제, 주사제 및 유방염 주입제 등의 동물용 항생제 사용의 증가와 cephalosporin의 경우 1990년 이후에 비유기 및 건유기 유방염 주입제로서 널리 사용한 결과에 의한 것으로 사료된다.

그람음성 원인균별 항생제 내성을 비교에서 coliforms에 속한 모든 원인균이 약간의 차이가 있기는 하지만 대체적으로 cephalothin과 rifampin에 대해 높은 내성을 보였고, Non-coliforms균주들도 유사한 양상을 보였으나, 2003년부터 분리되기 시작한 *Sphingomonas* spp.의 감수성은 모두 50% 이상으로 높게 조사되어 출현시기가 최근이라서 아직 내성이 많이 형성되지 않은 것으로 사료된다.

독일에서 Wallmann [35]은 젖소의 급성 유방염에서 분리한 *E. coli*에 대한 cephalosporin 계열 항생제에 대한 감수성 조사에서 cefoperazone, cefotaxim, ceftiofur 3종 항생제의 내성율을 각각 9.3%, 0%, 0.8%로 보고하였다. 이에 반하여 Lira [22]등은 브라질의 젖소 유방염에서 분리한 shiga toxin-producing *E. coli*에 대한 cephalothin과 tetracycline의 내성율이 각각 86.3%와 63.6%로 보고하였다. 또한, Erskine 등 [18]이 미국에서 1994년부터 2000년까지 7년 동안 임상형과 준임상형 유방염 감염우로부터 분리한 4종의 그람음성균으로부터 디스크 확산법에 의하여 ampicillin, cephalothin, gentamycin, tetracycline 등 6종에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 그 결과 ampicillin에 대하여 감수성이 있는 *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas auruginosa* 균주가 각각 84.3%, 84.3%, 18.9%, 0%로, 그리고, cephalothin에 대해서는 각각 74.5%, 95.8%, 1.3%, 1.9%로, 그리고 tetracycline에 대해서는 각각 66.8%, 67.0%, 2.5%, 3.8%로 나타났다. 이와 같이 항생제 감수성 양상에서 유럽과 미주에 있어서 큰 차이를 나타내었으며, 이것은 건유기 유방염 예방을 위한 건유전 모든 분방에 건유기 항생제를 주입하는 사양관리 방법 등 국가별 유방염 및 항생제 관리 정책의 차이에 의한 것으로 사료된다 [8, 34].

이와 같이 본 연구에서 cephalothin, streptomycin과 tetracycline 항생제에 대하여 고도내성을 나타내는 그람 음성균의 분리율이 높게 나타났다. 따라서 항생제의 내성균 출현을 예방하기 위하여 다양한 대책들이 필요한 실정이다. 특히, 항균제 선택의 근거가 되는 항생제 감수성 검사를 주기적으로 수행해야 할 것이다. 향후 그람 음성균에 의한 효과적인 유방염 치료 및 예방관리를 위해서 국내에서 가장 문제시되는 *E. coli*를 비롯하여 다양한 균주의 감염경로 규명 및 생체에서의 항생제 치료 반응 효과 등에 대한 체계적인 조사가 이루어져야 할 것이다.

결론

본 연구에서 젖소 유방염 감염우로부터 그람음성균의 분리율과 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 406주 (21.8%)의 그람음성균이 2001년부터 2004년에 걸쳐 전국의 241개 목장의 1,865분방으로부터 분리되었다. coliforms 중 *E. coli*와 *Enterobacter* spp.가 각각 22.7%와 16.3%, 그리고 Non-coliforms 중 *Pseudomonas* spp.와 *Serratia* spp.가 각각 10.3%와 7.9%로 조사되었다. 디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 조사에서 piperacillin, cefepime, amikacin과 gentamicin 등에 대해서는 각각 86.7%, 94.6%, 85.5%와 87.7%로 높은 감수성을 나타낸 반면, ampicillin, cephalothin, streptomycin과 tetracycline에 대해서는 각각 41.9%, 9.9%, 39.9%, 46.7%로 50% 이하의 감수성을 나타내었다. 그리고 cephalothin, streptomycin과 tetracycline에 대한 최소발육억제농도를 조사한 결과, 각각 96.1%, 99.5% 그리고 96.8%로 높은 내성을 나타내었다. 특히, cephalothin에 대한 고도내성 ($\geq 256\text{-}64 \mu\text{l/ml}$)이 매우 심각한 것으로 조사되었다.

참고문헌

1. 강희정, 김익천, 김진희, 손원근, 이두식. 젖소의 원인균 분리 및 약제 감수성 검사. 대한수의학회지 2001, **41**, 511-521.
2. 김충희, 김곤섭, 허정호, 정명호, 김국현, 조명희, 이국천, 류재두, 하대식, 김종수. 경남 남부지방에서 임상형 유방염의 원인균 분리 및 약제 감수성 시험. 한국임상수의학회지 2003, **20**, 177-184.
3. 손봉환. 유방염 감염 조사 및 예방대책에 관한 연구: 최근 3년간(91-93) 유방염 발생 실태에 관한 최종 결과 보고서. 한국가축위생학회, 서울, 1994.
4. 이정치, 이채용, 김상기, 이정길, 서국현. Holstein 유우의 유즙에서 분리한 유방염 원인균의 항균제 감수성. 한국임상수의학회지 2003, **20**, 166-171.
5. 이차수, 박정규. 젖소 유방염으로부터 Gram 음성간

- 균의 분포 및 약제감수성에 관한 연구. 대한수의학회지 1980, **20**, 79-84.
6. 정창국, 한홍을, 정길택. 우리나라 젖소 유방염 원인균의 역학적 조사 및 치료에 관한 연구. 대한수의학회지 1970, **10**, 39-45.
 7. 한홍을, 박선일, 유종현. 항생제 내성에 관한 수의학 적 고찰. 대한수의사회지 1998, **34**, 483-489.
 8. Aarestrup FM, Jensen NE. Development of penicillin resistance among Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. Microb Drug Resist 1998, **4**, 247-256.
 9. Anon. Veterinary Investigation Surveillance Report. Veterinary Laboratories Agency, London, 2001.
 10. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. J Dairy Sci 1998, **81**, 411-419.
 11. Bauer AW, Kirby WMJC, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966, **45**, 493-496.
 12. Blowey R, Edmondson P. Mastitis Control in Dairy Herds. p. 29, Farming Press, Ipswich, 1995.
 13. Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J 2002, **164**, 116-128.
 14. Britten AM. Delivering mastitis control systems to your clients. Large Anim Pract 1998, **19**, 14-21.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2nd ed Vol 22, NCCLS, Pennsylvania, 2002.
 16. Daly M, Power E, Bjorkroth J, Sheehan P, O'Connell A, Colgan M, Korkeala H, Fanning S. Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. Appl Environ Microbiol 1999, **65**, 2723-2729.
 17. Erskine RJ, Tyler JW, Riddell MG Jr, Wilson RC. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. J Am Vet Med Assoc 1991, **198**, 980-984.
 18. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J Dairy Sci 2002, **85**, 1111-1118.
 19. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting Somatic cell counts. J Dairy Sci 1994, **77**, 2103-2112.
 20. Jain NC. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J Dairy Sci 1979, **62**, 128-134.
 21. Leigh JA. Streptococcus uberis: a permanent barrier to the control of bovine mastitis. Vet J 1999, **157**, 225-238.
 22. Lira WM, Macedo C, Marin JM. The incidence of Shiga toxin-producing Escherichia coli with mastitis in Brazil. J Appl Microbiol 2004, **97**, 861-866.
 23. McDonald JS. Effect of milking machine design and function on new intramammary infection. J Milk Food Technol 1975, **38**, 44-51.
 24. McDonald JS, McDonald TJ, Anderson AJ. Antimicrobial sensitivity of aerobic gram-negative rods isolated from bovine udder infections. Am J Vet Res 1977, **38**, 1503-1507.
 25. National Mastitis Council. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Madison, 1999.
 26. Novick, RP, Richmond MH. Nature and interactions of genetic elements governing penicillinase synthesis in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 1965, **90**, 467-480.
 27. Pyorala SH, Pyorala EO. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). J Am Vet Med Assoc 1998, **212**, 407-412.
 28. Roberson JR, Warnick LD, Moore G. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. J Dairy Sci 2004, **87**, 583-592.
 29. Shpigel NY, Winkler M, Ziv G, Saran A. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. Prev Vet Med 1998, **35**, 1-9.
 30. Smith KL, Hogan JS. Environmental mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1993, **9**, 489-498.
 31. Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J Dairy Sci 1985, **68**, 1531-1553.
 32. Stang AM. Pharmacologic principles of systemic and intramammary mastitis therapy. J Am Vet Med Assoc 1977, **170**, 1180-1181.
 33. Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. Serratia species isolated from bovine Intramammary infections. J Dairy Sci 1991, **74**, 1860-1865.
 34. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen, JE. Association between phage types and antimicrobial

- resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol* 2003, **95**, 133-147.
35. **Wallmann J.** Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int Med Microbiol* 2006, **296 Suppl 41**, 81-86.
36. **Watts JL.** Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 1988, **16**, 41-66.