

유즙내에서 메티실린 내성을 지닌 젖소 유방염 주요 원인균에 대한 항생제와 EDTA-Tris의 병합의 효과

유종현 · 박희명^{1*}

건국대학교 수의과대학 BK21 수의기초 · 산업동물 · 예방의학 통합네트워크 연구인력양성 사업단
*건국대학교 수의과대학 수의내과학 교실

(게재승인: 2008년 7월11일)

The Effect of Antibiotics in Combination with EDTA-Tris on the Methicillin-Resistant Major Pathogens of Bovine Mastitis in Milk

Jong-Hyun Yoo and Hee-Myung Park^{1*}

BK21 Program of Integrative Network Systems for Veterinarians in Basic Science, Industrial Animals and Preventive Medicines and
*Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, #1 Hwayang-dong Gwangjin-gu, Seoul, South Korea, 143-701

Abstract : The combined effects of EDTA-Tris and eighteen antimicrobial agents have been evaluated in eight clinically isolated methicillin-resistant bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae*) from bovine mastitis. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the minimal bactericidal concentration (MBC) for the antibiotics alone or in combination with EDTA-Tris in Mueller-Hilton broth and milk. Combined use of EDTA-Tris and antibiotics potentiated or antagonized activity of antibiotics against mastitic pathogens. Milk increased the antibiotic potency of erythromycin and spiramycin on *S. aureus*. Culture in milk changed patterns of EDTA-Tris combinational effects compared with that in standard Mueller-Hilton broth. Combined with EDTA-Tris in milk, synergic effects were observed in colistin, dihydrostreptomycin, kanamycin, erythromycin, gentamycin, oxytetracycline, streptomycin to *E. coli*, *Str. uberis*, and *Str. agalactiae*. However, significant antagonistic effects of milk on antibiotic susceptibility in combination with EDTA-Tris were noted in neomycin, streptomycin, penicillin, roxithromycin, and amoxicillin. This study indicates that combination therapy of EDTA-Tris with antibiotics in bovine mastitis should be used with caution because of the possible antagonistic effects of antibiotic combination with EDTA-Tris on mastitic pathogens. In addition, antibiotic susceptibility test in combination with EDTA-Tris in milk culture condition can be benefit in search of effective treatment regimen for some antibiotic-resistant bacteria of mastitis.

Key words : bovine mastitis, methicillin-resistant bacteria, EDTA-Tris, antibiotics.

서 론

젖소 유방염은 전세계적으로 40%의 유병률을 나타내며, 유선 실질에 손상을 주어 유량의 감소 및 체세포의 증가로 인해 목장에 막대한 손실을 주는 대표적인 질환이다(19,31). 이러한 유방염에 대한 방제 및 치료방법으로서 항생제의 사용빈도는 매우 높으며, 실제 낙농현장에서 건유기에는 유방염 예방을 목적으로, 비유기에는 유방염의 치료를 위해 사용된다(2,16). 그러나 항생제 오남용으로 인한 항생제 내성률이 높아지고 공중보건적 우려 때문에, 항생제 사용을 줄이거나

비항생제 요법을 병행하려는 노력이 계속되고 있다(22,34).

유방염 치료를 위한 항생제의 선택은 주로 일반적인 항생제 감수성검사의 결과에 따르는 경우가 많다(6). Owens 등(29)과 Constable 등(6)은 항생제 감수성 검사가 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*) 및 *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*)의 신규감염에는 유용하지만 *S. aureus*의 만성감염에서는 임상적 치료결과와 연관성을 찾기 힘들다고 보고했으며, 이 외에도 항생제감수성 검사와 임상적 치료 결과가 일치되지 않는다는 연구결과들이 보고되고 있다(4,20,33). 이렇게 감수성검사와 임상적 치료결과의 차이가 나타나는 것은 세균과 항생제가 상호작용하는 실험관적 환경과 유방내 환경이 다르기 때문이다(20). 최근 젖소유방

¹Corresponding author.
E-mail : parkhee@konkuk.ac.kr

염에서 내성 세균의 내성률이 증가함으로 보다 신뢰성 높은 항생제 선택방법의 탐색이 필요하며, 또한 내성 극복을 위한 제제 또는 치료방법의 개발이 요구되고 있다.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 2가 양이온을 킬레이트하는 특성으로 인해 그람 음성 또는 그람 양성 세균의 세포막을 손상시키고 막투과성을 증가시킴으로써(23) 살균 및 정균 작용을 나타내며, Tris (tris-[hydroxymethyl]-aminomethane)는 이러한 EDTA 효과를 강화한다(17). 특히, EDTA-Tris는 항생제와 병합 사용할 경우 항생제의 작용을 강화하고 세균의 저항성을 낮추어주기 때문에 젖소 유방염의 치료와 예방제로 널리 사용되고 있다(5).

본 연구에서는 메티실린 내성을 가지는 주요 유방염 원인균인 *S. aureus*, *E. coli*, *Str. uberis* 및 *Str. agalactiae*을 시험균주로 사용하였다. 18종의 항생제와 EDTA-Tris의 병합으로 인한 항생제 감수성의 변화를 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC)로 조사하였으며, 유방내 환경과 유사한 우유배지에서 MBC를 측정해 일반배지와 차이를 비교함으로써 유방염 세균에 대한 새로운 항생제 감수성 검사법을 제시하였다.

재료 및 방법

1) 균주

본 연구에 사용된 균주는 *S. aureus* 2주, *E. coli* 2주, *Str. uberis* 2주 및 *Str. agalactiae* 2주로서 1998년과 2003년 사이 경기도 및 충청도, 강원도의 목장에서 임상형 및 준임상형 유방염에 이환된 젖소의 우유에서 분리되었다. 분리된 균주는 시험에 사용될 때까지 10% glycerol이 함유된 trypticase soy broth (Becton Dickinson & Co., USA)에 넣어 -70°C에서 냉동 보관되었다. 이 균주를 재배양하여 항생제 감수성 검사상 oxacillin disk 저항성 및 항생제 다재내성을 보이는 균주만을 선별하였으며, 모든 균주는 유방염 균의 표준 동정방법(26)과 VITEK® system (Biomerieux Co., USA)으로 동정하였다.

2) 저온살균 우유에서의 배양

항생제와 EDTA-Tris 병합 효과를 유방내 환경과 유사한 상태에서 감수성 시험하기 위해 일반적인 시험용 배지인 Mueller-Hinton broth 대신 우유를 사용하였다. 본 연구에는 시중에 유통되는 저온살균우유(후레쉬 우유®, 파스퇴르유업)를 사용하였고, 이 제품은 63°C 30분의 저온살균과정을 거친 제품이며, 시험 전 혈액배지에 호기상태에서 배양하여 무균상태를 확인하고 사용하였다.

3) 액체배지 미량희석법에 의한 항균제 감수성 시험

유방염 원인균에 대한 항생제 및 항생제/EDTA-Tris 합제의 감수성을 시험하기 위하여 미국 National Committee for

Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 표준 시험법 중 액체배지 미량희석법 (broth microdilution method)의 시험방법(25)을 따라 MBC를 측정하였다. MBC 측정을 위해 각 항생제에 대하여 항생제 역가를 기준으로 500 µg/ml (w/v)의 희석을 만들고 이것을 2배씩 희석하여 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2, 1 µg/ml (w/v) 단계별 농도의 항생제 희석액을 준비하였다. MBC는 표준시험법에 의하여 각 희석 배수의 항생제에 각 균주배양액을 0.5 McFarland turbidity standard에 맞추어져 멸균생리식염수에 희석하여 항생제 희석액에 동량 접종하여 항생제 최종농도가 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2, 1, 0.5 µg/ml (w/v)이 되도록 하였다. 이 접종액을 37°C 24시간 배양한 후 0.01 ml를 채취하였고, 5% sheep blood agar plate에 접종하여 24시간 배양 후, 집락이 생기지 않는 농도를 최소 농도로 정하였다.

사용된 항생제는 (주)동원신약(Korea)에서 제공받은 원료의약품으로 amoxicillin, ampicillin, cephalexin, colistin, dihydro-streptomycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, neomycin, oxytetracycline, procaine penicillin G, penicillin, roxithromycin, spectinomycin, spiramycin, streptomycin, sulfamethazine 및 tylosin의 총 18종의 항생제를 사용하였다.

EDTA-Tris는 10× EDTA-Tris 원액을 미리 만들어 놓은 후, 각 항생제와 EDTA-Tris 병합 시험시에는 시험배지인 Mueller-Hinton broth나 저온살균우유에 10배 희석하여 사용하였다. 10× EDTA-Tris 원액은 2.5 M EDTA (Sigma-Aldrich, USA)와 0.5 M Tris (Sigma-Aldrich, USA)의 혼합액으로서 pH 8이 되도록 적정하였고, 121°C에서 15분간 고압멸균 후 사용하였다.

4) 항생제 감수성 시험 조건 및 항생제 효력의 판단기준

모든 균주 및 항생제에 대한 항생제 감수성을 판단하기 위해 NCCLS 표준 시험법에 따라 시험배지로 Mueller-Hinton broth를 사용하여 MBC를 측정하였고(MHB 처리군), 우유환경 내에서 항생제의 효력을 평가하기 위해 시험배지를 저온살균 우유로 바꾼 다음 MBC를 측정하였다(MILK 처리군). 항생제와 EDTA-Tris의 병합 효과를 조사하기 위해, 위와 같은 방법으로 각각 일반배지(MHB+EDTA 처리군)와 우유(MILK+EDTA 처리군)를 사용하여 감수성 시험을 시행하였다.

항생제와 EDTA-Tris의 병합 효과 또는 항생제와 우유배양 환경에서의 효과를 평가하기 위해 Hallander 등(18)의 방법에 준하여 분획살균농도(fractional bactericidal concentration, FBC)를 적용하였으며, FBC가 0.5 이하면 살균력의 증가한 것(synergic)으로 FBC가 4 이상이면 살균력의 억제된 것(anastagonistic)으로 평가하였다.

위의 FBC의 결과에 따라서 18가지의 항생제를 각 처리군 별로 유방염 세균 중 동종의 2개의 균주에 대하여 동시에 살균력이 증가한 경우와 억제한 경우로 구별하여 균종 및 처리군에 따라 구분하여 비교하였다(Table 4).

결 과

1) 우유환경에서의 항생제의 감수성

총 8주의 페티실린 내성 유방염 분리균을 대상으로 일반

배지환경과 우유환경에서 MBC를 측정한 결과, 우유환경에서 세균들에 대한 항생제 감수성의 감소를 보인 항생제는 colistin (5주), tylosin (5주) 및 cephalixin (4주)의 순으로 나타났다(Table 1). Colistin과 tylosin은 *S. aureus*과 *E. coli*에

Table 1. Minimum bactericidal concentrations ($\mu\text{g/ml}$; MBC) for antibiotics in different culture conditions (Mueller-Hinton broth [MHB] and in pasteurized milk [MILK])

Antibiotics	Culture conditions	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Str. uberis</i>		<i>Str. agalactiae</i>	
		Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2
Amoxicillin	MHB	<0.5	<0.5	0.5	62.5	3.9	1	<0.5	<0.5
	MILK	0.5	<0.5	3.9 [†]	62.5	31.3 [†]	0.5*	<0.5	2 [†]
Ampicillin	MHB	0.5	<0.5	0.5	62.5	2	1	<0.5	2
	MILK	0.5	<0.5	0.5	62.5	7.8	0.5*	<0.5	3.9
Cephalexin	MHB	<0.5	<0.5	3.9	3.9	0.5	1	<0.5	31.3
	MILK	0.5	2 [†]	7.8	15.6 [†]	2 [†]	3.9	1 [†]	15.6
Colistin	MHB	1	1	<0.5	<0.5	2	0.5	1	15.6
	MILK	7.8 [†]	7.8 [†]	1 [†]	1 [†]	7.8	3.9 [†]	1	15.6
Dihydrostreptomycin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	62.5
	MILK	<0.5	<0.5	1 [†]	0.5	<0.5	3.9 [†]	<0.5	62.5
Erythromycin	MHB	3.9	3.9	15.6	15.6	0.5	1	62.5	62.5
	MILK	<0.5*	<0.5*	7.8	15.6	2 [†]	7.8 [†]	<0.5*	125
Gentamicin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	1
	MILK	<0.5	<0.5	1 [†]	0.5	<0.5	1 [†]	<0.5*	2
Kanamycin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	>250
	MILK	<0.5	<0.5	1 [†]	0.5	<0.5	3.9 [†]	0.5	125*
Neomycin	MHB	<0.5	<0.5	>250	>250	250	7.8	0.5	>250
	MILK	<0.5	<0.5	>250	>250	>250	>250 [†]	1	>250
Oxytetracycline	MHB	<0.5	<0.5	2	2	1	2	7.8	7.8
	MILK	2 [†]	2 [†]	7.8	7.8	3.9	7.8	0.5*	>250 [†]
Procaine penicillin G	MHB	<0.5	<0.5	15.6	31.3	2	3.9	3.9	3.9
	MILK	<0.5	<0.5	3.9*	250 [†]	7.8	3.9	<0.5*	3.9
Penicillin	MHB	<0.5	0.5	7.8	>250	3.9	7.8	<0.5	2
	MILK	<0.5	<0.5*	15.6	250	7.8	7.8	<0.5	2
Roxithromycin	MHB	3.9	0.5	250	125	3.9	3.9	<0.5	250
	MILK	<0.5*	0.5	31.3*	125	7.8	7.8	<0.5	62.5*
Spectinomycin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	0.5	2	0.5	<0.5	3.9
	MILK	<0.5	<0.5	0.5	2 [†]	2	7.8 [†]	<0.5	31.3 [†]
Spiramycin	MHB	31.3	15.6	15.6	7.8	7.8	0.5	<0.5	125
	MILK	<0.5*	2*	31.3	31.3 [†]	3.9	2	<0.5	>250
Streptomycin	MHB	<0.5	<0.5	0.5	<0.5	1	<0.5	<0.5	31.3
	MILK	0.5	0.5	0.5	0.5	3.9	2 [†]	2 [†]	>250 [†]
Sulfamethazine	MHB	125	125	>250	>250	31.3	2	2	>250
	MILK	125	>250 [†]	>250	>250	31.3	62.5 [†]	15.6 [†]	>250
Tylosin	MHB	<0.5	<0.5	31.3	62.5	7.8	7.8	0.5	62.5
	MILK	31.3 [†]	62.5 [†]	125 [†]	>250 [†]	<0.5*	3.9	0.5	>250 [†]

*The combined bactericidal effect of drugs and milk culture environment is synergistic (Fractional bactericidal concentration [FBC] \leq 0.5).

[†]The combined bactericidal effect of drugs and milk culture environment is antagonistic (FBC \geq 4).

대하여 우유배지로 인한 살균력의 감소를 나타냈고, erythromycin은 *S. uberis*에 대하여, streptomycin은 *S. agalactiae*에 대하여 우유배지에서 살균력이 감소되었다(Table 1과 4).

Erythromycin과 spiramycin은 *S. aureus*에 대하여 우유환

경에서 항생제의 살균력이 증가되었다(Table 4).

2) MBC에서 항생제와 EDTA-Tris의 병합 효과

총 8주의 메티실린 내성 유방염 분리균에서 일반배지환경

Table 2. Minimum bactericidal concentrations ($\mu\text{g/ml}$; MBC) for antibiotics alone (MBH) and combination of EDTA-Tris and antibiotics (MBH+EDTA)

Antibiotics	Culture conditions	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Str. uberis</i>		<i>Str. agalactiae</i>	
		Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2
Amoxicillin	MHB	<0.5	<0.5	0.5	62.5	3.9	1	<0.5	<0.5
	MHB+EDTA	<0.5	15.6 [†]	31.3 [†]	>250 [†]	7.8	3.9	125 [†]	125 [†]
Ampicillin	MHB	0.5	<0.5	0.5	62.5	2	1	<0.5	2
	MHB+EDTA	1	<0.5	7.8 [†]	3.9 [*]	7.8	2	0.5	125 [†]
Cephalexin	MHB	<0.5	<0.5	3.9	3.9	0.5	1	<0.5	31.3
	MHB+EDTA	1 [†]	62.5 [†]	7.8	15.6 [†]	7.8 [†]	2	0.5	15.6
Colistin	MHB	1	1	<0.5	<0.5	2	0.5	1	15.6
	MHB+EDTA	7.8 [†]	250 [†]	<0.5	<0.5	1 [*]	<0.5 [*]	<0.5 [*]	<0.5 [*]
Dihydrostreptomycin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	62.5
	MHB+EDTA	3.9 [†]	>250 [†]	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	31.3 [†]	31.3
Erythromycin	MHB	3.9	3.9	15.6	15.6	0.5	1	62.5	62.5
	MHB+EDTA	0.5 [*]	250 [†]	<0.5 [*]	<0.5 [*]	1	0.5 [*]	2 [*]	2 [*]
Gentamicin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	1
	MHB+EDTA	0.5	15.6 [†]	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5 [*]	<0.5 [*]
Kanamycin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	>250
	MHB+EDTA	<0.5	62.5 [†]	<0.5	<0.5	<0.5	0.5	62.5 [†]	62.5 [*]
Neomycin	MHB	<0.5	<0.5	>250	>250	250	7.8	0.5	>250
	MHB+EDTA	0.5	<0.5	<0.5 [*]	>250	3.9 [*]	0.5 [*]	>250 [†]	>250
Oxytetracycline	MHB	<0.5	<0.5	2	2	1	2	7.8	7.8
	MHB+EDTA	<0.5	1 [†]	<0.5 [*]	<0.5 [*]	3.9	2	31.3 [†]	31.3 [†]
Procaine Penicillin G	MHB	<0.5	<0.5	15.6	31.3	2	3.9	3.9	3.9
	MHB+EDTA	0.5	0.5	2 [*]	7.8 [*]	3.9	7.8	0.5 [*]	250 [†]
Penicillin	MHB	<0.5	0.5	7.8	>250	3.9	7.8	<0.5	2
	MHB+EDTA	0.5	0.5	31.3 [†]	62.5 [*]	15.6 [†]	7.8	15.6 [†]	15.6 [†]
Roxithromycin	MHB	3.9	0.5	250	125	3.9	3.9	<0.5	250
	MHB+EDTA	1 [*]	1	<0.5 [*]	2 [*]	15.6 [†]	7.8	125 [†]	125
Spectinomycin	MHB	<0.5	<0.5	<0.5	0.5	2	0.5	<0.5	3.9
	MHB+EDTA	3.9 [†]	3.9 [†]	<0.5	0.5	3.9	0.5	125 [†]	125 [†]
Spiramycin	MHB	31.3	15.6	15.6	7.8	7.8	0.5	<0.5	125
	MHB+EDTA	7.8 [*]	7.8	2 [*]	<0.5 [*]	15.6	1	62.5 [†]	62.5
Streptomycin	MHB	<0.5	<0.5	0.5	<0.5	1	<0.5	<0.5	31.3
	MHB+EDTA	3.9 [†]	2 [†]	<0.5 [*]	<0.5	3.9	<0.5	<0.5	31.3
Sulfamethazine	MHB	125	125	>250	>250	31.3	2	2	>250
	MHB+EDTA	7.8 [*]	1 [*]	>250	>250	31.3	7.8	<0.5 [*]	>250
Tylosin	MHB	<0.5	<0.5	31.3	62.5	7.8	7.8	0.5	62.5
	MHB+EDTA	0.5	0.5	31.3	7.8 [*]	3.9	2 [*]	<0.5 [*]	2 [*]

*The combined bactericidal effect of drugs and EDTA-Tris is synergistic (Fractional bactericidal concentration [FBC] ≤ 0.5).

†The combined bactericidal effect of drugs and EDTA-Tris is antagonistic (FBC ≥ 4).

에서 항생제와 EDTA-Tris를 병합하여 MBC를 측정 한 결과, 항생제 단독으로 사용한 경우에 비해 살균력 증가를 보인 항생제는 erythromycin (6주)과 tylosin (4주)로 나타났다. Erythromycin과 oxytetracycline, roxithromycin 및 spiramycin은 *E. coli*에 대해 EDTA-Tris와 병합시 살균력이 증가 되었다(Table 4). EDTA-Tris 병합으로 인해 광범위한 살균력 감소를 보인 항생제는 amoxicillin (5주), cephalexin (4주), penicillin (4주) 및 spectinomycin (4주)로 나타났다. Cephalexin,

mycin은 *E. coli*에 대해 EDTA-Tris와 병합시 살균력이 증가 되었다(Table 4). EDTA-Tris 병합으로 인해 광범위한 살균력 감소를 보인 항생제는 amoxicillin (5주), cephalexin (4주), penicillin (4주) 및 spectinomycin (4주)로 나타났다. Cephalexin,

Table 3. Minimum bactericidal concentrations ($\mu\text{g/ml}$; MBC) for antibiotics alone (MILK) and combination of EDTA-Tris and antibiotics (MILK+EDTA) in milk

Antibiotics	Culture conditions	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Str. uberis</i>		<i>Str. agalactiae</i>	
		Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2	Strain 1	Strain 2
Amoxicillin	MILK	0.5	<0.5	3.9	62.5	31.3	0.5	<0.5	2
	MILK+EDTA	<0.5*	15.6 [†]	15.6 [†]	125	7.8*	7.8 [†]	125 [†]	125 [†]
Ampicillin	MILK	0.5	<0.5	0.5	62.5	7.8	0.5	<0.5	3.9
	MILK+EDTA	1	<0.5	15.6 [†]	31.3	7.8	7.8 [†]	0.5	125 [†]
Cephalexin	MILK	0.5	2	7.8	15.6	2	3.9	1	15.6
	MILK+EDTA	0.5	31.3 [†]	7.8	15.6	7.8	7.8	2	125 [†]
Colistin	MILK	7.8	7.8	1	1	7.8	3.9	1	15.6
	MILK+EDTA	2	62.5 [†]	<0.5*	<0.5*	7.8	7.8	0.5*	7.8
Dihydrostreptomycin	MILK	<0.5	<0.5	1	0.5	<0.5	3.9	<0.5	62.5
	MILK+EDTA	15.6 [†]	15.6	<0.5*	<0.5*	<0.5	0.5*	0.5	125
Erythromycin	MILK	<0.5	<0.5	7.8	15.6	2	7.8	<0.5	125
	MILK+EDTA	0.5	250 [†]	15.6	3.9*	0.5*	0.5*	0.5	31.3*
Gentamicin	MILK	<0.5	<0.5	1	0.5	<0.5	1	<0.5	2
	MILK+EDTA	<0.5	<0.5	<0.5*	<0.5	<0.5*	<0.5*	0.5	3.9
Kanamycin	MILK	<0.5	<0.5	1	0.5	<0.5	3.9	0.5	125
	MILK+EDTA	<0.5	62.5 [†]	<0.5*	<0.5*	<0.5	1*	0.5	>250 [†]
Neomycin	MILK	<0.5	<0.5	>250	>250	>250	>250	1	>250
	MILK+EDTA	>250 [†]	>250 [†]	>250	>250	>250	>250	0.5*	>250
Oxytetracycline	MILK	2	2	7.8	7.8	3.9	7.8	0.5	>250
	MILK+EDTA	1*	62.5 [†]	15.6	7.8	1*	>250 [†]	<0.5*	125*
Procaine penicillin G	MILK	<0.5	<0.5	3.9	250	7.8	3.9	<0.5	3.9
	MILK+EDTA	0.5	0.5	7.8	62.5*	3.9	>250 [†]	<0.5	250 [†]
Penicillin	MILK	<0.5	<0.5	15.6	250	7.8	7.8	<0.5	2
	MILK+EDTA	0.5	0.5	15.6	125	31.3 [†]	>250 [†]	<0.5	250 [†]
Roxithromycin	MILK	<0.5	0.5	31.3	125	7.8	7.8	<0.5	62.5
	MILK+EDTA	<0.5	0.4	125 [†]	<0.5*	31.3 [†]	>250 [†]	<0.5	250 [†]
Spectinomycin	MILK	<0.5	<0.5	0.5	2	2	7.8	<0.5	31.3
	MILK+EDTA	<0.5	<0.5	<0.5*	125 [†]	7.8	>250 [†]	<0.5	62.5
Spiramycin	MILK	<0.5	2	31.3	31.3	3.9	2	<0.5	>250
	MILK+EDTA	2 [†]	3.9	15.6	15.6	7.8	>250 [†]	<0.5	>250
Streptomycin	MILK	0.5	0.5	0.5	0.5	3.9	2	2	>250
	MILK+EDTA	125 [†]	62.5 [†]	<0.5	<0.5*	>250 [†]	>250 [†]	<0.5*	125*
Sulfamethazine	MILK	125	>250	>250	>250	31.3	62.5	15.6	>250
	MILK+EDTA	62.5	62.5*	>250	>250	15.6	7.8*	1*	>250
Tylosin	MILK	31.3	62.5	125	>250	<0.5	3.9	0.5	>250
	MILK+EDTA	31.3	31.3	62.5	62.5*	1 [†]	1*	0.5	250

*The combined bactericidal effect of drugs and EDTA-Tris is synergistic (fractional bactericidal concentration [FBC] ≤ 0.5).

[†]The combined bactericidal effect of drugs and EDTA-Tris is antagonistic (FBC ≥ 4).

colistin, dihydrostreptomycin, spectinomycin 및 streptomycin은 *S. aureus*에 대하여, amoxicillin은 *E. coli*에 대하여, amoxicillin과 oxytetracycline, penicillin 및 spectinomycin은 *S. agalactiae*에서 대하여 EDTA-Tris와 병합시 살균력의 감소를 보였다 (Table 2와 4).

3) **우유환경에서의 항생제와 EDTA-Tris의 병합 효과**

우유환경에서 항생제와 EDTA-Tris를 병합하여 MBC를 측정 한 결과 항생제 단독으로 사용한 경우에 비해 colistin, dihydrostreptomycin 및 kanamycin이 *E. coli*에 대하여, erythromycin과 gentamicin이 *Str. uberis*에 대하여, oxytetracycline과 streptomycin이 *Str. agalactiae*에 대하여 살균력의 증가를 나타내었다(Table 4).

그러나 우유환경에서 항생제와 EDTA-Tris의 병합시 amoxicillin (5주), roxithromycin (4주) 및 streptomycin (4주)는 메티실린 내성균에 대한 살균력의 감소를 나타내었고 neomycin과 streptomycin은 *S. aureus*에 대하여 살균력의 감소를 보였다. Penicillin, roxithromycin 및 spectinomycin은 *Str. uberis*에 대하여, amoxicillin은 *S. agalactiae*에 대하여 EDTA-Tris 병합으로 인한 살균력의 감소를 보였다(Table 3과 4). Gentamicin과 sulfamethazine은 각각 8주의 균주 중 3주에서 살균력의 상승효과를 보였고 감소는 보이지 않았다.

고 찰

본 연구는 메티실린 저항을 나타내는 유방염 세균에 대해

첫째, 일반 배지(MHB)와 우유에서의 항생제 감수성차이를 비교하였고, 둘째, 일반배지에서 항생제 단독 및 항생제의 EDTA-Tris 병합 효과를 비교하였으며, 셋째, 우유에서 이러한 병합 효과를 비교하였다. 시험 균주의 종류나 배지의 종류에 따라 살균 효력의 상승 또는 억제를 나타내는 항생제는 다양한 분포를 보였다(Table 4). 이것은 항생제와 EDTA-Tris의 작용이 세균의 종류에 따라 다양하게 나타나며, 또한 우유내 성분이 이러한 항생제 및 항생제와 EDTA-Tris의 병합 작용에 영향을 미침을 시사한다.

젖소 유방은 유방내 세균의 증식을 억제하기 위해 유방내에서는 lactoferrin 등 철결합 단백질을 분비하지만(24), 일부 세균들은 siderophore의 분비나 lactoferrin 등의 단백질을 역이용을 통해 철이 부족한 환경에서도 쉽게 증식한다(8). EDTA는 2가 양이온에 대해 강력한 킬레이팅 작용으로 세균의 철 이용을 차단함으로써 그람 음성의 세포외막인 lipopolysaccharide 구조와 그람양성 세균의 세포벽에 손상을 주어 항생제과 병합하여 사용할 시 항균능력을 상승시키는 것으로 알려져 있으며(11,39), 유방내 환경에서 세균의 철 이용을 강력하게 차단하고 항생제의 효력을 높여주는 역할을 한다(5).

최근 유방염에서도 항생제 저항성을 나타내는 세균의 출현이 증가하고 있으며, 이러한 내성 세균에 대해 항생제와 EDTA병합이 효과에 대한 가능성을 예시하는 보고들이 있다. Farca 등(11,12,14)은 β -lactam계 항생제에 저항성이 있는 *S. aureus*에 대하여 EDTA-Tris의 사용시 ampicillin, cephalixin, oxytetracycline, streptomycin 및 sulphadimethoxine의 항균

Table 4. Antibiotics showing identical synergic or antagonistic antibiotic activity on two strains of each mastitic bacteria species in milk culture, in combination of EDTA-Tris, and in combination with EDTA-Tris in milk

	Milk culture [¶]		Combination with EDTA-Tris [†]		Combination with EDTA-Tris in milk [‡]	
	Antagonistic	Synergic	Antagonistic	Synergic	Antagonistic	Synergic
<i>S. aureus</i>	colistin, oxytetracycline, tylosin	erythromycin, spiramycin	cephalexin, colistin, dihydrostreptomycin, spectinomycin, streptomycin	sulfamethazine	neomycin, streptomycin	
<i>E. coli</i>	colistin, tylosin		amoxicillin	erythromycin, oxytetracycline, procaine penicillin G, roxithromycin, spiramycin		colistin, dihydrostreptomycin, kanamycin
<i>Str. uberis</i>	erythromycin			colistin, neomycin	penicillin, roxithromycin, streptomycin	erythromycin, gentamicin
<i>Str. agalactiae</i>	streptomycin		amoxicillin, oxytetracycline, penicillin, spectinomycin	colistin, erythromycin, gentamicin, tylosin	amoxicillin	oxytetracycline, streptomycin

[¶] Antibiotic susceptibility (MBC) was compared between Muller-Hilton broth (MHB) and milk culture conditions
[†] Antibiotic susceptibility (MBC) was compared between antibiotics alone and antibiotic combination with EDTA-Tris in MHB
[‡] Antibiotic susceptibility (MBC) was compared between antibiotics alone and antibiotic combination with EDTA-Tris in milk

력이 상승되었으며, *in vivo*에서 cephaloridine 등에 저항성이 있는 그람 음성 또는 그람 양성균에 대해 cephaloridine 과 EDTA-Tris 병합 치료시 효과가 있었다고 보고하였다. 본 연구에서 MHB에서 EDTA-Tris와 항생제를 병합하였을 때 항균효과의 상승한 경우와 억제된 경우로 구별되었다. Sulfamethazine, procaine penicillin G, roxithromycin, spiramycin, erythromycin, gentamicin, neomycin 및 tylosin의 8종의 항생제는 EDTA 병합시 항균효과의 상승을 보였고, cephalixin, dihydrostreptomycin, spectinomycin, streptomycin, amoxicillin 및 penicillin은 효력이 감소되었다(Table 4). Colistin의 경우 EDTA-Tris와 병합시 *S. aureus*에 대해서는 길항작용을, *Str. agalactiae*에서는 상승작용을 나타내었다. Oxytetracycline은 EDTA-Tris 병합시 *E. coli*에 상승작용을 보였지만, *Str. agalactiae*에 대해서는 길항작용을 나타냈다. 본 연구 결과는 기존 연구자들의 결과(11,12,14)와 대부분 일치하며 cephalixin과 streptomycin이 EDTA-Tris 사용시 항생작용이 감소한다는 차이점이 보인다. 그러나 유제품 항생제와 EDTA-Tris 병용효과는 MHB에서와는 상이하게 나타났으며(Table 4), 우유가 항생제 및 EDTA의 병용작용에 영향을 줄 수 있다.

Oxytetracycline은 광범위한 항생효과로 유방염 치료에 널리 사용되는 약물로서, EDTA-Tris와 병합시 30S ribosomal subunit에 부착하여 단백질의 합성을 방해하는 작용과 EDTA-Tris의 세포벽 투과성을 높이는 효과와 ribosome의 안정성을 변질시키는 작용으로 항균능력이 상승되는 것으로 생각된다(41). Oxytetracycline과 EDTA-Tris의 병합 제제는 항생제 저항성 있는 *Proteus mirabilis*에 대하여 저항성을 반전시키기도 하며(36), *E. coli* 뿐만 아니라(38,40) *Proteus* spp., *Salmonella* spp. 및 *Aeromonas* spp.에서도 MIC의 감소효과를 나타낸다는 보고가 있다(37). 또한 *in vivo*에서도 oxytetracycline, enrofloxacin, lincomycin, spectinomycin 및 amikacin 등의 일반항생제에 치료반응이 없는 *E. coli*와 *Staphylococcus* spp.에 의한 재발성 자궁내막염에 이환된 소에 대하여 oxytetracycline과 EDTA-Tris 병합투여는 91% 이상의 개체에서 치료효과를 나타내었다(13). 본 연구에서도 *E. coli*에 대해 oxytetracycline이 EDTA-Tris와 병합하였을 때 MBC의 감소를 보여서 이전 연구와 일치하였다. 그러나 우유에서 배양시 oxytetracycline의 EDTA-Tris 합제의 항균력 증가는 관찰되지 않은 것으로 보아 대장균성 유방염 치료시 효용성이 없는 것으로 생각된다.

본 연구의 항생제와 EDTA-Tris 병합 시험에서 일반배지에서와 우유에서 감수성 결과가 크게 차이가 나는데, 항생제와 EDTA-Tris의 병합 효과로 인한 상승효과를 나타내는 항생제가 일반배지에서 13종에서 우유에서 시험할 경우 7종으로 감소하였고 항생제의 종류도 상이하였다(Table 4). 이것은 우유 즉 우유환경에서 항생제, EDTA-Tris 그리고 항생제와 EDTA-Tris의 상호작용이 크게 영향을 받았기 때문이라 생각되며, 우유가 항생제 효력을 증가 또는 감소시킨다는 여러 결과들이 보고되어 있다. Sulfadoxine-trimethoprim, macrolide,

aminoglycoside 및 oxytetracycline 같은 항생제들이 우유 내에 존재할 때 그 항균능력이 상당히 억제되고(24), Iso-Sensitest® broth (ISB)에 비해 우유를 배양매지로 사용하였을 경우 *E. coli*와 *Str. agalactiae*에 대한 sulfadoxine-trimethoprim, tetracycline, novobiocin, gentamicin 및 enrofloxacin의 항생효과는 사용할 경우 항균능력이 유의성 있게 줄어들었으나, *Str. uberis*의 경우 우유나 유청에서 항생능력의 상승을 나타내었다(10). 항생제 단독 뿐만 아니라 EDTA 병합제에서도 우유배지 조건으로 인한 항생능력의 변화를 나타내는데, Branen 등(3)은 EDTA와 nisin, lysozyme 및 monolaurin 등을 병합 사용하였을 때 *E. coli* 등의 세균에 대하여 2% 고온멸균 우유(ultra high temperature treated milk, UHT milk)에서 효과가 떨어진다고 보고하였고, nisin과 EDTA의 병합으로 인한 상승효과가 있었지만 2% UHT에서는 효과가 없었다고 하였다. 본 연구결과에서는 균주 별로 차이는 있지만, 주로 colistin, oxytetracycline, tylosin 및 streptomycin의 항생제는 우유배양 조건시 MHB 조건에 비해 현저한 살균능력의 감소를 보였고 *S. aureus*에 대해서 erythromycin 및 spiramycin은 살균능력이 상승되었다(Table 4).

항생제가 우유내에 있을 때 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 여러 가지 물질과 상호작용하여 항균력에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(16). 우유 내에 casein과 α -lactalbumin, β -lactoglobulin 등의 단백질은 항생제와 비특이적인 상호작용으로 약물의 효능에 영향을 주는데, 특히 tetracycline계열 항생제는 유단백질 특히 casein과 강하게 결합하거나 우유내 존재하는 Ca^{2+} 에 킬레이션되어 효력이 감소할 수 있다(42). 본 연구에서 oxytetracycline의 효능이 *S. aureus* 등의 세균에서 우유에서 현저하게 감소한 점도 이러한 보고들과 일치한다(Table 1). 그러나 우유조건에서 oxytetracycline과 EDTA-Tris 병합시 *S. aureus*에 대한 항생능력 저하효과는 나타나지 않았으며, *Str. agalactiae* 등의 균주에 대하여 상승효과를 나타내었고, 유방염 치료를 위해 oxytetracycline을 사용할 경우 EDTA-Tris 병합시 우유에 의한 oxytetracycline의 효력 감소를 상쇄시키는 역할을 한 것으로 생각된다.

우유내 성분 중 일부 단백질과 지방성분은 항생제의 효력에 영향을 미친다고 보고되어 있다. Lactoferrin과 lactoferricin 같은 철결합 단백질은 항생제가 *E. coli*나 *S. aureus*의 외피를 통과하는 것을 촉진시켜 항생제의 효력을 높이는 역할을 하며(27, 35), 특히 β -lactam계 항생제의 저항성이 있는 *S. aureus*에 대한 항생작용을 상승시킨다고 보고되었다(7). 반면, 우유내 fat globule은 세균이 부착하여 biofilm 유형으로 증식을 도우며, 우유가 capsule 형성과 β -lactamase의 형성을 증가시켜 포식세포의 탐식이나 항생제의 침투를 어렵게 만들어 항생제 효력을 떨어뜨린다(1,21,28,32). 그러나 우유에 함유된 lactoferrin 및 지방이나 지방산은 열처리방법에 따라 변성되어 불활화 정도의 차이를 보이는데, 고온멸균 처리보다 저온살균 처리가 훨씬 안정성이 높고 세균 억제력이나 세균부착능이 덜 영향을 미치는 것으로 보고되었다(15,30). 따라서, 유방염 원인균에 대한 항생제 감수성시험시 배양매지

로 일반배양배지에 비해 실제 유방내와 유사한 환경을 만들기 위해 우유의 사용이 권장되며, 저온살균 처리한 우유는 고온 처리한 우유에 비해 단백질 및 지방 변성이 적으므로 (15,30,32) 보다 생체내 환경과 유사한 조건에서 유효한 감수성 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

건강한 분방에서 채취한 우유와 유방염에 이환된 분방에서 채취한 우유는 항생제의 감수성 결과의 차이가 나타난다. Gentamicin과 sulfadoxine-trimethoprim는 정상 우유보다 유방염 이환 우유에서 더 항생작용이 강하였고, 우유내 내부항생물질과 상승작용이 있음을 시사한다(9). 따라서, 보다 정확한 감수성 테스트를 하기 위해서 유방염 감염 우유를 채취하여 배지로 사용하는 것이 선호되나 실제 유방염에 이환된 분방에 따라 우유의 조성의 차이가 심하기 때문에 감수성 비교 시험에 적용하기 어려울 것으로 생각된다.

본 연구에서 항생제 감수성시험 배지로 저온살균우유를 사용하였으며, 그 결과 기존의 표준방법(NCCLS)보다 유방염 원인균에 대해서 보다 실제적인 감수성 결과를 나타낼 것으로 예상된다. 유방염이 이환된 우유 상태는 시험에 사용된 저온살균우유와 조성이 다르기 때문에 저온살균 우유를 사용한 MBC나 MIC방법과 실제 유방염치료 결과와의 연관성을 찾기 위해 더 폭넓은 연구가 필요하다. 또한 EDTA-Tris와 항생제의 병합은 우유 환경에서 길항작용 또는 상승작용을 나타낼 수 있으므로, 항생제 내성을 나타내는 유방염 세균의 치료제제의 선택을 위한 EDTA-Tris 합제의 선택시 우유배지를 이용한 항생제 감수성 검사가 필수적인 것으로 사료된다.

결 론

유방염에 분리된 메티실린에 내성을 가진 병원균(*S. aureus*, *E. coli*, *Str. uberis* 및 *Str. agalactiae*)에 대하여 EDTA-Tris와 18가지 항생제의 실험관적 병합 효과에 대하여 연구하였다. 살균작용을 평가하기 위하여, 배지로 Mueller-Hilton broth와 저온살균한 우유를 사용하여 항생제 단독 또는 항생제와 EDTA-Tris (EDTA 250 mM, Tris 50 mM)의 병합시 최소살균농도를 측정하였다. 항생제/EDTA-Tris 합제의 종류와 균주에 따라 항생제의 살균력 증가 및 감소 효과가 다르게 나타났다. 우유배지에서 살균효과를 측정한 결과 일반액체배지의 조건에 비해 erythromycin 및 spiramycin은 *S. aureus*에 대하여 살균력이 증가하였다. EDTA-Tris와 항생제의 병합효과는 우유배지 조건과 Mueller-Hilton broth 조건간의 현저한 차이를 나타내었다. 우유배지조건에서 EDTA-Tris와 병합하였을 때, colistin, dihydrosterptomycin, 및 kanamycin이 *E. coli*에 대하여, erythromycin과 gentamycin이 *Str. uberis*에 대하여, oxytetracycline과 streptomycin이 *Str. agalactiae*에 대하여 살균력이 증가하였다. 그러나 neomycin, strepto-mycin, penicillin, roxithromycin, 및 amoxicillin은 EDTA-Tris 병합시 살균력이 감소하였다. 본 연구의 결과, 젖소 유방염 원인균에 항생제와 EDTA-Tris의 병

합시 일부 항생제의 경우 EDTA-Tris에 의해 길항되는 경우도 있으므로 주의해서 처방하여야 하며 또한 항생제 저항을 보이는 유방염세균의 치료제로서 EDTA-Tris 합제를 선택할 때 우유 배지 환경에서 감수성 검사가 반드시 필요할 것이라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ali-Vehmas T, Westphalen P, Myllys V, Sandholm M. Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin-G. *J Dairy Res* 1997; 64: 253-260.
2. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* 2006; 89: 1877-1895.
3. Branen JK, Davidson PM. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 63-74.
4. Cattell MB, Dinsmore RP, Belschner AP, Carmen J, Goodell G. Environmental gram-positive mastitis treatment: in vitro sensitivity and bacteriologic cure. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2036-2043.
5. Chew BP, Tjoelker LW, Tanaka TS. In vitro growth inhibition of mastitis causing bacteria by phenolics and metal chelators. *J Dairy Sci* 1985; 68: 3037-3046.
6. Constable PD, Morin DE. Treatment of clinical mastitis. Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003; 19: 139-155.
7. Diarra MS, Petitclerc D, Lacasse P. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1141-1149.
8. Diarra MS, Petitclerc D, Lacasse P. Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2141-2148.
9. Fang W, Pyörälä S. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. *J Dairy Sci* 1996; 79: 76-82.
10. Fang W, Vikerpuur M. Potency of antibacterial drugs in milk as analysed by beta-glucuronidase-based fluorometry. *J Vet Pharmacol Ther* 1995; 18: 422-428.
11. Farca AM, Nebbia P, Re G. Potentiation of antibiotic activity by EDTA-tromethamine against three clinically isolated gram-positive resistant bacteria. An in vitro investigation. *Vet Res Commun* 1994; 18:1-6.
12. Farca AM, Nebbia P, Re G. Potentiation of the in vitro activity of some antimicrobial agents against selected gram-negative bacteria by EDTA-tromethamine. *Vet Res Commun* 1993; 17: 77-84.
13. Farca AM, Nebbia P, Robino P, Re G. Effects of the combination antibiotic-EDTA-Tris in the treatment of chronic bovine endometritis caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Pharmacol Res* 1997; 36: 35-39.
14. Farca AM, Piroalli G, Maffei F, Re G. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. *J Small*

- Anim Pract 1997; 38: 243-245.
15. Fidler N, Sauerwald TU, Koletzko B, Demmelmair H. Effects of human milk pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid composition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 27: 317-322.
 16. Gehring R, Smith GW. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. J Vet Pharmacol Ther 2006; 29: 237-241.
 17. Goldschmidt MC, Wyss O. The role of tris in EDTA toxicity and lysozyme lysis. J Gen Microbiol 1967; 47:421-431.
 18. Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. Antimicrob Agents Chemother. 1982; 22: 743-752.
 19. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management. Vet Q. 2007; 29: 18-31.
 20. Hoe FG, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. J Am Vet Med Assoc 2005; 227: 1461-1468.
 21. Jung DS, Bodyfelt FW, Daeschel MA. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J Dairy Sci 1992; 75: 387-393.
 22. Knight CH, Fitzpatrick JL, Logue DN, Platt DJ. Efficacy of two non-antibiotic therapies, oxytocin and topical liniment, against bovine staphylococcal mastitis. Vet Rec 2000; 146: 311-316.
 23. Leive L. A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. Proc Natl Acad Sci USA 1965; 53:745-750.
 24. Louhi M, Inkinen K, Mylly V, Sandholm M. Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. Zentralbl Veterinarmed B 1992; 39: 253-262.
 25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from animal: Approved Standard M31-A2, 2th ed. PA: NCCLS. 2002.
 26. National Mastitis Council. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Arlington: National Mastitis Council, Inc. 1999: 11-108.
 27. Nonnecke BJ, Smith KL. Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth. J Dairy Sci 1984; 67: 606-613.
 28. Opdebeeck JP, O'Boyle DA, Frost AJ. Encapsulated *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. Aust Vet J 1988; 65: 194-195.
 29. Owens WE, Ray CH, Watts JL, Yancey RJ. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J Dairy Sci 1997; 80: 313-317.
 30. Paulsson MA, Svensson U, Kishore AR, Naidu AS. Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. J Dairy Sci 1993; 76: 3711-3720.
 31. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Mastitis. In: Veterinary Medicine; A Testbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses, 8th ed. London: Baillière Tindall. 1994: 563-577.
 32. Sandholm M, Kaartinen L, Pyörälä S. Bovine mastitis--why does antibiotic therapy not always work? An overview. J Vet Pharmacol Ther 1990; 13: 248-260.
 33. Shpigel NY, Winkler M, Ziv G, Saran A. Relationship between in vitro sensitivity of coliform pathogens in the udder and the outcome of treatment for clinical mastitis. Vet Rec 1998; 142: 135-137.
 34. Vaarst M, Bennedsgaard TW, Klaas I, Nissen TB, Thamsborg SM, Østergaard S. Development and daily management of an explicit strategy of nonuse of antimicrobial drugs in twelve Danish organic dairy herds. J Dairy Sci 2006; 89: 1842-1853.
 35. Vorland LH, Osbakk SA, Perstølen T, Ulvatne H, Rekdal O, Svendsen JS, Gutteberg TJ. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Scand J Infect Dis 1999; 31: 173-177.
 36. Wooley RE, Blue JL, Campbell LM. Attempted reversal of oxytetracycline resistance of *Proteus mirabilis* by EDTA-tromethamine lavage in experimentally induced canine and feline cystitis. Am J Vet Res 1975; 36: 1533-1535.
 37. Wooley RE, Gilbert JP, Shotts EB Jr. Antibacterial action of combinations of oxytetracycline, dimethyl sulfoxide, and EDTA-tromethamine on *Proteus*, *Salmonella*, and *Aeromonas*. Am J Vet Res 1982; 43: 130-133.
 38. Wooley RE, Gilbert JP, Shotts EB Jr. Inhibitory effects of combinations of oxytetracycline, dimethyl sulfoxide, and EDTA-tromethamine on *Escherichia coli*. Am J Vet Res 1981; 42: 2010-2013.
 39. Wooley RE, Jones MS, Gilbert JP, Shotts EB Jr. In vitro effect of combinations of antimicrobial agents and EDTA-tromethamine on certain gram-positive bacteria. Am J Vet Res 1983; 44: 2167-2169.
 40. Wooley RE, Jones MS. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. Vet Microbiol 1983; 8: 271-280.
 41. Yuan D, Shen V. Stability of ribosomal and transfer ribonucleic acid in *Escherichia coli* B/r after treatment with ethylenedinitrilotetraacetic acid and rifampicin. J Bacteriol 1975; 122: 425-432.
 42. Ziv G, Rasmussen F. Distribution of labeled antibiotics in different components of milk following intramammary and intramuscular administrations. J Dairy Sci 1975; 58: 938-946.