

# 봉독의 젖소 유방염 유래 그람 양성 및 음성 세균별 항균효과 분석

정숙한<sup>1</sup> · 오상익<sup>1</sup> · 이한규<sup>1</sup> · 정영훈<sup>1</sup> · 허태영<sup>1</sup> · 한상미<sup>2</sup> · 백귀정<sup>3</sup> · 조아라<sup>1\*</sup>

농촌진흥청 국립축산과학원 가축질병방역과<sup>1</sup>, 농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과<sup>2</sup>, 전라북도 동물위생시험소<sup>3</sup>

## Antibacterial effect of bee venom against Gram-positive and negative bacteria isolated from mastitis in dairy cattle

Sukhan Jung<sup>1</sup>, Sang-Ik Oh<sup>1</sup>, Han-Gyu Lee<sup>1</sup>, Young-Hun Jung<sup>1</sup>, Tai-Young Hur<sup>1</sup>, Sangmi Han<sup>2</sup>, Kui-Jeong Baek<sup>3</sup>, Ara Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal Diseases and Health, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

<sup>2</sup>Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

<sup>3</sup>Jeollabuk-do Institute of Livestock & Veterinary Research, Jangsu 55632, Korea

Mastitis is an inflammatory condition of the mammary gland, most often caused by bacterial infections, resulting in significant economic losses to the dairy industry. Antimicrobial resistance has been of great concern because of the extensive clinical use of antibiotics. For this reason, the development of new compounds as an alternative treatment to bovine mastitis is needed. Bee venom has been widely used as an oriental treatment for several inflammatory diseases and bacterial infections. The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of bee venom on bacteria isolated from bovine mastitis. A total of 107 isolates from bovine mastitic milk samples collected in 2019 and 2020 in Jeonbuk province. All bacterial isolates were tested for susceptibility to bee venom of the honey bee (*Apis mellifera*). In order to obtain comprehensive antibacterial activities of the bee venom, we measured the minimal inhibitory concentration (MIC) of the bee venom against bacterial strains. Bee venom showed significant inhibition of bacterial growth of Gram-negative bacteria *Citrobacter* spp., *Escherchia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. and *Raoultella* with MIC values of 96, 81, 72, 230, and 85 µg/mL, respectively, and Gram-positive bacterial *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. with MIC values of 29, 21 and 16 µg/mL, respectively. The results indicated that the MIC values were different depending on the bacterial strains, and those of Gram-positive bacteria were lower than those of Gram-negative bacteria for bee venom. These findings suggested that bee venom could be an effective antimicrobial treatment for bovine mastitis; however, further research is necessary to evaluate the mechanism underlying the antimicrobial action, its effectiveness/safety *in vivo* and effective application for therapeutic use.

Received September 19, 2021  
Revised September 29, 2021  
Accepted September 29, 2021

Corresponding author:

Ara Cho

E-mail: aracho85@korea.kr

https://orcid.org/0000-0001-5309-7721

**Key Words:** Mastitis, Bee venom, Antimicrobial effect, Minimal inhibitory concentration (MIC), Dairy cattle

### 서 론

유방염은 젖소에서 가장 흔하게 발생하는 질병 중 하나로 우유 생산량의 감소, 유질 저하, 치료 비용 및 환축 도태 등의 이유로 낙농 산업에 큰 경제적 손실을 초래하는 질병이다(Zhao과 Lacasse 2008; Jeong 등, 2017). 유방염으로 인한 연간 경제

적 손실은 전세계적으로 350억 달러, 한국은 108억 원, 미국의 경우 약 20억 달러에 이르는 것으로 보고되고 있다(Leitner 등, 2003; Park 등, 2011). 유방염은 발생 양상에 의해서 전염성과 환경성으로 분류되며, 전염성 유방염 원인균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactia*, *Streptococcus agalactia* 등이 있고 환경성 유방염 원인균으로 *Escherichia*

*coli*와 *Streptococcus uberis* 등이 있다(Lee 등, 2007; Kim 등, 2017). 전염성 유방염 원인균은 유방의 유선에 감염되어 착유 과정을 통해 우균에 전파되어 준임상형 및 만성 유방염을 일으키는 것으로 알려져 있다. 한편 환경성 유방염 원인균은 토양, 분변 및 생식기 분비물, 깔짚, 유방 및 유두 그리고 착유기 세척에 사용되는 오염된 물 등의 주변 환경을 통해 유선 조직에 침입하여 기회 감염을 일으켜 일시적으로 임상형 유방염을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Watts 1988; Lee 등, 2007). 최근 국내 젖소 유방염에서 분리되는 원인균의 균종별 분리 빈도는 *Staphylococcus* 종이 50% 이상을 차지하며, *Streptococcus* 종이 6.8%, *Enterococcus* 종이 4.8%, *Escherichia coli* 종이 4.5% 차지하는 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 2017). 대표적인 유방염 유발 세균인 *Staphylococcus aureus*는 숙주 탐식 세포 내 기생함으로 항생제에 의해 잘 박멸되지 않으며, 재발 확률이 높고 착유 시 한 개체에서 또 다른 개체로 전염이 잘되는 특징이 있다. 그리고 *Escherichia coli*의 경우 유관을 통해 감염되어 유선 세포를 파괴하거나 내독소를 분비하여 염증을 일으킨다고 보고 되어있다(Eberhart 등, 1979; Erskine 등, 1991; Kim 등, 2011).

지난 수십년 동안, 항생제는 젖소 유방염의 예방과 치료를 위해 사용되어 왔다. 항생제의 사용이 가축의 생산성 증진에 크게 기여하였으나 이에 따른 항생제 내성균의 출현으로 인해 치료율이 저하되는 부작용이 나타나고 있다(Han 등, 2014). 뿐만 아니라 항생제 내성균으로 인한 감염을 치료하기 위하여 과량의 항생제 사용, 치료 기간이 장기화 됨에 따라 유제품 내 항생제 잔류 등의 문제로 사람의 건강에 영향을 미치게 되어 사회적인 관심과 그 중요성이 점차 커지고 있다(Kim 등, 1997; 남, 2010; Han 등, 2015). 또한 유방염은 발병 메커니즘 및 발생요인이 매우 복잡하고 그 원인균이 다양하여 특정 몇 종의 항생제로는 치료에 많은 어려움이 있어 안전하고 효과적인 젖소 유방염 치료제 개발이 절실히 요구되는 실정이다(Kang 등, 2001; Han 등, 2007). 이러한 문제를 해결하기 위해 천연물질을 이용한 유방염 치료제 연구가 활발히 진행되고 있다(Han 등, 2014).

봉독은 벌의 독낭세포에서 분비되는 액체로 독낭에 저장되었다가 외부의 자극이나 공격으로부터 종족을 보호하기 위한 방어 물질이다(Park 등, 2016). 봉독은 phospholipase A2와 hyaluronidase 등의 효소 및 melittin, apamin, adolapin, mast cell degranulating peptide와 같은 peptide 성분과 그 외 nonpeptide 성분 등 40가지의 구성성분으로 이루어져 있으며 그 중 50% 이상을 차지하는 melittin은 세포막을 파괴하고 세포막 수용체에 결합하여 용혈 작용, 항염증 작용 및 항균 작용

등의 역할을 한다고 알려져 있다(Habermann과 Reiz, 1965; Rudenko과 Nipot, 1996; Lee 등, 2015). 최근 꿀벌에서 미세 전류를 이용한 봉독 채집 장치를 이용하여 봉독을 정제하는 방법을 통하여 대량 생산되어 사람의 치료 및 화장품으로 사용되고 있다(Kim 등 2002; Lee 등 2015).

축산 분야에 있어 봉독은 가축의 성장촉진, 면역기능 증가 및 각종 질병 치료에 유효하다고 알려져 있다(Han 등, 2009; Oh 등, 2011). 젖소에서 봉독은 분만 소요시간 단축과 후산 정체를 감소 등 분만 효율을 개선하고 젖소 유방염의 경우 봉독 투여로 체세포수가 크게 감소하였으며 유방염에 걸린 젖소로부터 채취한 원유에서 분리한 균에 대한 항균력이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Han 등 2007). 젖소 유방염 질환 치료에는 10 mg/두 이하 농도의 봉독이 주사제로 이용되고 있으며(Han 등, 2009). 젖소에 봉독을 투여한 후 우유에서 봉독 성분이 검출되지 않아 천연물질인 봉독은 축산물 내에 잔류하지 않는 것으로 확인되었다(Han 등 2015). 또한 가축에 사용되는 봉독의 용량은 극소량으로 증류수와 생리식염수로 희석할 경우 균질성의 정확성과 정밀성이 모두 확보되었으며 실온에서 7일간 보관하더라도 봉독 성분의 안정성이 유지된다고 보고하였다(Han 등 2016).

본 연구에서는 젖소 유방염 주요 원인균 9종 *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Raoultella* spp. 등에 대하여 봉독의 농도에 따른 항균성을 조사하고 향후 젖소 유방염 치료를 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

시험 물질인 봉독은 전기 채집 장치를 사용하여 서양종 꿀벌 (*Apis mellifera*)로부터 채취하였다. 이후 국립농업과학원 잠사양봉소재과에서 봉독 정제를 마친 동결건조 상태의 봉독을 받아 실험에 사용하였다. 봉독은 멸균 증류수로 희석한 후 syringe filter(0.45µm)를 이용하여 무균 여과하였다.

본 연구에서 사용한 균주는 2019년부터 2020년까지 전북 젖소목장에서 유방염으로 진단된 원유 시료로부터 분리, 동정한 균주를 전라북도 동물위생시험소에서 분양 받아 사용하였으며, 그람 양성균으로는 *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. 등 3종 52개 균주와 그람 음성균 *Citrobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Raoultella* spp. 등 6종 55개 균주 총 9종 107개 균주를 Blood agar (Kisan Biotech, Seoul,

Korea) 배지에서 37°C, 호기조건으로 배양하였다.

각 균주에 대한 봉독의 항균 효과를 파악하기 위하여 액체 배지 희석법을 사용하여 최저 성장 억제 농도를 구하였다. 측정은 96-well plate에 균 배양액 Muller-Hinton broth 90 µL와 농도 별로 희석한 봉독 시료 10 µL를 차례대로 첨가하여 최종 농도를 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 µg/mL이 되도록 설정하였다. 37°C 18시간 배양 후 육안으로 균의 성장을 확인하여 증식이 일어나지 않은 농도를 최소발육저지농도로 나타내었다. 같은 종의 균주(strain) 중 최소발육저지농도에 차이가 있는 경우 최소값(Min)과 최대값(Max)를 확인하였다.

유방염 균주 최소발육저지농도 측정 결과에 대한 통계적 처리는 RStudio (RStudio Version 2.3.5033, USA)의 one-way analysis of variance (ANOVA), Duncan's multiple range test를 이용하여 처리군 간의 유의성을 검정하였으며( $P<0.05$ ), 그 결과는 평균±표준편차(mean±STD)로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

전북 젖소 농장에서 수집한 유방염 분리균에서 최소발육저지 농도를 그람 음성균과 그람 양성균으로 나누어 Table 1, 2에 각각 나타내었다.

봉독의 최소 발육 저지 농도는 그람 양성균에서 평균 22.6 µg/mL, 그람 음성균에서 평균 97.8 µg/mL로 그람 음성균에서 더 높은 MIC 수치를 확인하였다. 그람 양성균에서 균주별 비교 결과 *Enterococcus* spp.와 *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. 균에서 봉독의 최소 발육 저지 농도는 각각 29 µg/mL와, 21 µg/mL, 16 µg/mL이었으며, 그람 음성균에서 균주별 비교 결과 *Citrobacter* spp., *Escherichia*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Raoultella* 균에서 봉독의 최소 발육 저지 농도는 96 µg/mL, 81 µg/mL, 72 µg/mL, 230 µg/mL, 85 µg/mL로 그람 음성균과 비교하였을 때 그람 양성균이 더 낮은 농도에

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of the Bee Venom on bacterial mastitis pathogens isolates from dairy cows in Korea

| Gram          | Genus                      | No. of isolates | Min (µg/mL) | Max (µg/mL) | Average (µg/mL)         |               |
|---------------|----------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------------------|---------------|
| Gram positive | <i>Enterococcus</i> spp.   | 10              | 8           | 64          | 28.8±20.72 <sup>a</sup> |               |
|               | <i>E. faecalis</i>         | 6               | 16          | 64          | 40.0                    |               |
|               | <i>E. pseudoavium</i>      | 1               | 8           | 8           | 8.0                     |               |
|               | <i>E. faecium</i>          | 2               | 8           | 16          | 12.0                    |               |
|               | <i>E. casseliflavus</i>    | 1               | 16          | 16          | 16.0                    |               |
|               | <i>Staphylococcus</i> spp. | 39              | 8           | 128         | 21.5±18.91 <sup>a</sup> |               |
|               | <i>S. aureus</i>           | 31              | 16          | 32          | 19.6                    |               |
|               | <i>S. chromogenes</i>      | 5               | 8           | 128         | 36.8                    |               |
|               | <i>S. simulans</i>         | 2               | 8           | 8           | 8.0                     |               |
|               | <i>S. xylosus</i>          | 1               | 32          | 32          | 32.0                    |               |
|               | <i>Streptococcus</i> spp.  | 3               | 16          | 16          | 16.0±0.0 <sup>a</sup>   |               |
|               | <i>S. dysgalactiae</i>     | 2               | 16          | 16          | 16.0                    |               |
|               | <i>S. uberis</i>           | 1               | 16          | 16          | 16.0                    |               |
|               | Sub-total                  |                 | 52          | 8           | 128                     | 22.6±18.79    |
| Gram negative | <i>Citrobacter</i> spp.    | 4               | 64          | 128         | 96.0±36.95 <sup>b</sup> |               |
|               | <i>C. freundii</i>         | 2               | 64          | 64          | 64.0                    |               |
|               | <i>C. braakii</i>          | 1               | 128         | 128         | 128.0                   |               |
|               | <i>C. youngae</i>          | 1               | 128         | 128         | 128.0                   |               |
|               | <i>Escherichia</i> spp.    | 25              | 16          | 128         | 81.3±38.06 <sup>b</sup> |               |
|               | <i>E. coli</i>             | 25              | 16          | 128         | 81.3                    |               |
|               | <i>Klebsiella</i> spp.     | 8               | 64          | 128         | 72.0±22.62 <sup>b</sup> |               |
|               | <i>K. oxytoca</i>          | 6               | 64          | 64          | 64.0                    |               |
|               | <i>K. pneumoniae</i>       | 2               | 64          | 128         | 96.0                    |               |
|               | <i>Raoultella</i> spp.     | 3               | 64          | 128         | 85.3±36.95 <sup>b</sup> |               |
|               | <i>R. ornithinolytica</i>  | 3               | 64          | 128         | 85.3                    |               |
|               | Sub-total                  |                 | 40          | 16          | 128                     | 97.8±34.64*** |
|               | Total                      |                 | 92          | 8           | 128                     |               |

Average data are presented as mean±STD per group. Differences between multiple groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) while individual comparisons were obtained using a Duncan's Multiple Range Test (Different letters indicate significant differences,  $P<0.05$ ). Differences between Gram positive and negative group was compared using student's t-test (\*\*\*) ( $P<0.001$ ).



포주에서 봉독의 안전성 및 작용 효과 분석, 세부과제번호: PJ014298022021)의 지원 및 2021년도 농촌진흥청(국립축산과학원) 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

## CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ORCID

Sukhan Jung, <https://orcid.org/0000-0002-5821-9027>  
 Sang-Ik Oh, <https://orcid.org/0000-0003-0877-9170>  
 Han-Gyu Lee, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1971>  
 Young-Hun Jung, <https://orcid.org/0000-0002-8094-0304>  
 Tai-Young Hur, <https://orcid.org/0000-0003-3129-2942>  
 Sangmi Han, <https://orcid.org/0000-0002-6840-4509>  
 Kui-Jeong Baek, <https://orcid.org/0000-0002-1915-9439>  
 Ara Cho, <https://orcid.org/0000-0001-5309-7721>

## REFERENCES

- 남향미. 2010. 젖소 유방염에 대한 항생제 사용 지침. 대한수의사회지. 46(7): 638-644.
- Eberhart RJ, Natzke RP, Newbould FSH. 1979. Coliform mastitis-a review. J Dairy Sci 62(1): 1-22.
- Erskine RJ, Tyler TW, Riddler MG. 1991. Theory use and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. J Am Vet Med Assoc 198(6): 980-984.
- Habermann, E. and Reiz, K. G. 1965. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamine. Biochemistry 343(2): 192-203.
- Han SM, Hong IP, Woo SO, Kim SG, Jang HR. 2015. Analysis of bee venom residues in milks of dairy cattle using UHPLC with newly developed pre-processing method. Korean J Vet Serv 38(1): 25-30.
- Han SM, Kim JM, Yeo JH, Hong IP, Woo SO, Lee KG, Kweon HY. 2014. Origin and effective ingredient standards of honeybee venom as natural antibiotic ingredients. Korean J Vet Serv 37(2): 123-129.
- Han SM, Kim SG, Hong IP, Woo SO, Jang HR, Lee KW. 2016. Antibacterial effects of purified bee venom against some pathogenic bacteria isolated from dead chickens. Korean J Vet Serv 39(3): 159-166.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Jang CH, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. Am J Chin Med 37(2): 253-260.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Kim BS, Kim JM, Baek HJ, Kim ST. 2007. Antibacterial activity of the honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting dairy cows. Int J Indust Entomol 14(2): 137-142.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Woo SO, Oh BY, Lee YG, Kim BS, Baek HJ, Kim ST. 2007. Therapeutic effects of honeybee (*Apis Mellifera L.*) venom injection on bovine mastitis. Korean J Vet Serv 30(1): 115-123.
- Han SM, Woo SO, Kim SG, Jang HR, Lee KW. 2018. Antibacterial effects of purified bee venom against *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Apiculture 33(1): 9-16.
- Jeong CH, Cheng WN, Bae H, Lee KW, Han SM, Petriello M C, Lee HG, Seo HG, Han SG. 2017. Bee venom decreases LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. J Microbiol Biotechnol 27(10): 1827-1836.
- Kang HJ, Kim IC, Kim JH, Son WG, Lee DS. 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from bovine mastitic milk. Korean J Vet Serv 41(4): 511-521.
- Kim DI, Kim EK, Seong WJ, Ro YH, Ko DS, Kim NH, Kim JH, Kwon HJ. 2017. Identification of microbiome with 16S rRNA gene pyrosequencing and antimicrobial effect of egg white in bovine mastitis. Korean J Vet Res 57(2): 117-126.
- Kim J, Ochoa, MT, Krutzik, SR, Takeuchi, O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL. 2002. Activation of toll-like receptor 2 in acne trig-

- gers inflammatory cytokine responses. *J. Immunol* 169(3):1535-41.
- Kim JH, Kim BM, Ham JS, Oh MH. 2017. Detection and Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococcus sp. isolated from Dairy Cattle Milk. *J Milk Sci Biotechnol* 35(3): 162-168.
- Kim SE, Hah DY, Jang EH, Kwon HN, Jo SS, Kwon YT, Park DY, Lee KC, Kim JS. 2011. Survey of mastitis management and incidence of mastitis in high somatic cell count of bulk milk at dairy farms in the Gyeongnam. *Korean J Vet Serv* 34(4): 379-388.
- Kim ST, Hwang JY, Sung MS, Je SY, Bae DR, Han SM, Lee SH. 2006. The minimum inhibitory concentration (MIC) of bee venom against bacteria isolated from pigs and chickens. *Korean J Vet Serv* 29(1):19-26.
- Kim ST, Kim S, Kim SY, Son JK. 1997. Comparison of fatty acid composition of *Staphylococcus* sp. isolated from bovine mastitis milk. *Korean J Vet Serv* 20(1): 37-45.
- Lee DG, Shin HH. 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics: General concepts and recent advances. *Infect Chemother* 40(3): 140-147.
- Lee ES, Kang HM, Chung CI, Moon JS. 2007. Antimicrobial susceptibility and prevalence of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis. *Korean J Vet Res* 47(4): 67-75.
- Lee G, Kang HM, Chung CI, Moon JS. 2007. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis milk. *Korean J Vet Res* 47(1): 33-41.
- Lee SJ, Kim KH, Lee WR, Kim JY, An HJ, Park KK. 2015. Anti-bacterial and anti-inflammatory effect of melittin on propionibacterium acnes-induced inflammatory skin disease in vivo. *Journal of Apiculture* 30(2): 95-101.
- Leitner Gabriel, Lubashevsky, Evgenia, Glickman Anita, Winkler Marta, Saran Arthur, Trainin Zeev. 2003. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. *Vet Immunol. Immunopathol* 93(1-2): 31-38.
- Nakamura S, Kato AM, Kobayashi K. 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J Agric Food Chem* 39:647-650.
- Oh BY, Han SM, Oh YI, Kim ST. 2011. Effects of the blood chemistry of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on the Hanwoo calves. *Korean J Vet Serv* 34(1): 87-93.
- Park JK, Shen CZ, Kim CG, Kim IK. 2016. The stability comparison of purified bee venom and bee venom melittin in aqueous solution. *Anal. Sci. Technol* 29(4): 194-201.
- Park YJ, Yang DK, Han HY. 2011. Efficacy of a herd specific mastitis vaccine against *Staphylococcus aureus* in dairy cows. *Journal of preventive veterinary medicine* 35(2): 81-89.
- Rudenko SV, Nipot EE. 1996. Modulation of melittin-induced hemolysis of erythrocytes. *Biokhimiia* 61(12), 2116-2124.
- Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich and H.G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292(5820): 246-248.
- Watts, J. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 16(1): 41-66.
- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci* 86(13): 57-65.