

生乳에서 分離된 葡萄球菌의 藥劑耐性

金 鍾 冕
全北大學校 文理科大學

宋 熹 鍾
全北大學校 農科大學

郭 澤 勳
全羅北道 家畜保健所

緒 論

葡萄球菌 菌種中에서 病原性과 가장 관계가 깊은 것은 Coagulase 陽性菌株로 알려져 있다.^{1,2)} 近年에 이르러 各種抗生物質이 널리 應用되고 있어서 疾病治療에 效果를 보고 있기는 하지만 野外에서는 여전히 乳房炎이 多發하고 있고 藥劑耐性菌은 增加一路에 있으며, 특히 藥劑耐性 *Staphylococcus aureus*의 plasmid 伸介^{3,4)}, 또는 藥劑不活化酵素의 生産 및 合成으로서 投與한 藥劑에 대하여 耐性を 갖는 것은 臨床治療面에 있어서 重大한 問題로 擡頭되고 있는 실정이다.⁵⁾

우리나라에서 젖소 乳房炎의 중요한 原因菌中, 金 郭⁶⁾에 의하면 臨床症狀이 없는 乳牛에서 *Staph. aureus*가 11%를 차지하고 있었으며⁶⁾, 臨床型으로 看做된 乳牛에서 分離도는 송 등⁷⁾은 19.2%, 손 등⁸⁾은 26%로서 葡萄球菌에 의한 乳房炎의 發生率이 높아지고 있음을 보여주고 있다.

한편, 乳房炎의 主된 原因菌인 *Staph. aureus*는 分離頻도가 높고, 일단 乳房內에 定着되면 菌의 根絶이 어려운 것으로 알려져 있다.^{9,10)} 이와 같이 乳房炎이나 食中毒에 關係가 깊은 *Staph. aureus*가 藥劑에 대하여 어느 정도 耐性を 가지고 있는 가를 알아보기 위하여 著者 등은 全州市 所在 牛乳處理場에 入荷되는 生乳를 材料로 하여 몇 가지 生物學的 檢査에 의해 分離固定된 *Staph. aureus*에 대하여 各種藥劑에 대한 耐性度를 寒天平板稀釋法으로 調査한바 뜻있는 成績을 얻었기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材料: 1977年 10月 全州市 所在 乳處理場에 入荷되는 各牧場別 牛乳輸送罐 26個로부터 試料를 採取하였다.

菌株의 分離同定: 各牛乳輸送罐으로부터 滅菌된 試尿管에 5ml의 生乳를 採取하고 얼음 箱子에 넣어 즉시 實

驗室로 搬入하였다. *Staph. aureus*의 分離同定은 Wilson 및 Miles¹¹⁾의 記述과 大塚 및 小林의 方法¹¹⁾에 準하였다. 簡記하면 *Staphylococcus* Medium No. 110 (BBL)에 各試料를 10倍로 系列稀釋液하여 0.2ml씩 接種, 37°C에서 18~20時間 培養한 後, 室溫에서 一夜放置하여 7.5% 食鹽에 耐鹽하는 葡萄球菌集落의 色調 및 形態를 觀察하고, 各培地에서 任意로 10~15個의 集落을 鈎取하여 Gram 染色을 施行, 葡萄球菌임을 確認함과 동시에 普通寒天培地(pH 7.2)에 再接種, 37°C에서 18時間 培養한 後, 試驗管法에 의한 coagulase 產生能 mannitol 分解能, 嫌氣의 培養에 의한 glucose 分解能 및 catalase 產生能 등의 檢査로서 *Staph. aureus*를 分離同定하였다.

藥劑 및 藥劑耐性檢査: 이 檢査는 分離菌株中 coagulase 陽性株에 限하여 寒天平板稀釋法으로 施行하였으며, 使用한 藥劑의 濃度는 Frankel 등¹²⁾의 基準과 Wolf 등¹³⁾의 基準을 補正하여 使用하였다. 즉, streptomycin(SM; 韓獨藥品) 10μg/ml; chloramphenicol(CP; 鍾根堂) 30 μg/ml; penicillin(PC; 槿花製藥) 1 IU; tetracycline(TC; 柳韓洋行) 10μg/ml; kanamycin(KM; 永進藥品) 10μg/ml; ampicillin(Ap; 鍾根堂) 10μg/ml; nalidixic acid(NA; Sterling-Winthrop Lab) 50μg/ml; gentamicin(GM; 鍾根堂) 10μg/ml; lincomycin(LM; 韓國 Upjohn) 2μg/ml; 및 novobiocin(NB; 성경製藥) 10μg/ml 등이다.

藥劑耐性檢査는 普通寒天培地에 繼代培養한 對數增殖期의 分離株를 nutrient broth에 18時間 培養하여, 上記한 各種 藥劑中 1劑를 添加하여 만든 抗菌劑加普通寒天培地에 分離株를 接種 37°C에 48時間 培養한 다음 發育하면 耐性으로, 發育하지 않으면 感受性으로 判定하고 同時에 供試菌의 耐性類型도 判別하였다.

成 績

分離菌株의 生物學的의 性狀: 葡萄球菌 選擇培地에서 發育된 分離株中 任意로 選擇한 360株를 供試菌으로 하여

Table 1. Biological Properties of 360 Isolates of *Staphylococcus* from Raw Cow Milk

Biological Property	Positive		Negative	
	No.	%	No.	%
7.5% Salt Resistance	360	100	0	0
Mannitol Fermentation	326	91	34	9
Coagulase Production	198	55	162	45
Catalase Production	360	100	0	0
Glucose Fermentation	360	100	0	0

Table 2. Relationships between Coagulase Production and Mannitol Fermentation of *Staphylococcus* Isolates

Total Isolates	Coagulase Positive Isolates			Coagulase Negative Isolates		
	No. of Isolates	Mannitol Fermentation		No. of Isolates	Mannitol Fermentation	
		Positive No. (%)	Negative No. (%)		Positive No. (%)	Negative No. (%)
360	198	186 (94)	12 (6)	162	140 (86)	22 (14)

Table 3. Drug Resistance of 198 Isolates of Coagulase Positive *Staphylococci*

Drugs *	Concentration (mg/ml)	Resistant	Isolates
		No.	%
SM	10	90	45.4
CP	30	2	1.0
PC	1**	23	11.6
TC	10	46	23.2
KM	10	10	5.0
AP	10	12	6.0
NA	50	164	82.8
GM	10	40	20.2
LM	2	188	94.9
NB	10	50	25.2

* Abbreviations ; SM, streptomycin; Cp, chloramphenicol; PC, penicillin; TC, tetracycline; KM, kanamycin; AP, ampicillin; NA, nalidixic acid; GM, gentamicin; LM, lincomycin; NB, novobiocin

** IU(International Unit)

몇 가지 生物學的의 性狀을 檢査한바, 그 成績은 第1表와 같다. 即, 7.5% 耐鹽性, catalase 產生能 및 glucose 嫌氣의 分解能 檢査結果는 供試한 全分離菌株가 陽性 (100%)으로 나타났으며, coagulase 試驗에서는 55% (198株), mannitol 分解試驗에서는 91% (326株가) 陽性으로 나타났다.

供試分離菌株에 대한 coagulase 產生能과 mannitol 分解能과의 關係를 比較하여 보면 第2表와 같이 coagulase 陽性株 198株中 94.6% (186株)가 mannitol을

分解하였고, 6% (12株)가 分解能이 없었으며, coagulase 陰性株 162株中 86% (140株)가 mannitol을 分解하였으며, 14% (22株)가 分解하지 못하였다.

藥劑耐性株의 分布率 : 供試한 分離菌株中 coagulase 陽性인 198株에 대하여 10種의 藥劑에 대한 耐性檢査를 實施한 結果는 第3表와 같다. 즉 LM이 99.4% (188株)로서 가장 높았으며, NA에는 82.8% (164株)로서 高度의 耐性을 보였고, SM에 대해서는 45.4% (90株)로서 中等度의 耐性을 나타내었다. 또한 NB, TC, GM, 및

Table 4. Resistant Patterns of 198 Isolates of Coagulase Positive *Staphylococci*

No*	Number of Drugs Showing Resistance to Isolates					
	1	2	3	4	5	6-7
1	LM**9	NA IM 39	SM NA IM 27	SM TC NA LM 7	SM GM NA LM NB 7	SM PC AP NA LM NB 1
2	NA 4	SM LM 8	TC NA LM 13	GM NA LM NB 5	SM PC TC NA LM 4	SM PC TC AP NA LM 1
3	SM NA 3	NA LM NB 6	TC NA LM NB 4	GM TC NA LM NB 3	SM PC GM NA LM NB 1	
4	TC LM 2	GM NA LM 3	SM NA LM NB 3	SM TC AP NA LM 2	SM KM GM NA LM NB 1	
5	TC NA 2	PC NA LM 3	SM GM LM NB 3	SM PC GM LM NB 2	SM KM GM AP NA LM 1	
6	GM LM 1	AP NA LM 3	SM GM LM NA 2	SM TC NA LM NB 1	GM CP TC NA LM NB 1	
7	LM NB 1	SM GM LM 2	SM PC NA LM 2	KM TC NA LM NB 1	SM PC CM TC NA LM NB 1	
8	PC LM 1	KM LM NB 1	KM NA LM NB 1	SM GM AP LM NB 1	SM PC GM TC AP NA LM 1	
9				SM AP NA LM 1	SM LM GM TC NB 1	SM PC KM GM NA LM NB 1
				PC NA LM NB 1	PC TC NA LM NB 1	
				PC TC NA LM 1	SM KM GM LM NB 1	
				SM PC GM LM 1	SM KM AP NA LM 1	
				SM KM NA LM 1	PC GM NA LM NB 1	
				SM CP NA LM 1	SM KM TC NA LM 1	
1	13	57	58	33	27	9
(0.5)	(6.6)	(28.8)	(29.3)	(16.7)	(13.6)	(4.5)

* Drug free

** See note to Table 3.

() Percentage

PC에 대해서 각각 25.2% (50株), 23.2% (46株), 20.2% (40株) 및 11.6% (23株)로서 比較的 낮은 耐性을 보였으며, AP, KM 및 CP에 대해서는 각각 6.0% (12株), 5.0% (10株) 및 1% (2株)로서 낮은 耐性率을 보여 주었다.

藥劑耐性類型的 分布率: 分離菌株의 藥劑耐性類型은 第4表와 같이 單劑耐性類型으로부터 7劑耐性類型으로까지 總55個의 耐性類형을 나타내고 있었으며, 그 중 2劑 및 3劑耐性類型이 각각 8個型으로서 28.8% (57株) 및 29.3% (58株)로서 全體의 58.1% (115株)를 차지하였다. 다음으로는 4劑 및 5劑耐性類型이 각각 14個型으로서 16.7% (33株) 및 13.6% (27株)이었고 單劑耐性類型이 2型으로서 6.6% (13株), 6 및 7劑耐性類型이 9型으로 4.5% (9株)의 順으로 나타났다. 그리고 供試한 全藥劑에 대하여 전혀 耐性을 보이지 않은 菌株은 단 1株(0.5

%) 밖에 없었다.

耐性類型에 따른 菌株의 分布를 보면, 2劑耐性類型인 NA-LM類型이 19.6% (39株)로서 가장 高頻度로 나타났으며, SM-NA-LM型 및 TC-NA-LM型이 각각 13.2% (27株) 및 6.5% (13株)로서 다음의 頻度로 나타났었다. 기타 LM型이 9株, SM-LM型이 8株, SM-TC-NA-LM型 및 SM-GM-NA-LM-NB型이 각각 7株, NA-LM-NB型이 6株, GM-NA-LM-NB型이 5株, NA, TC-NA-LM-NB型 및 SM-PC-TC-NA-LM型이 각각 4株, SM-NA, GM-NA-LM, PC-NA-LM, AP-NA-LM, SM-NA-LM-NB, SM-GM-LM-NB 및 GM-TC-NA-LM-NB型에서 각각 3株, TC-LM, TC-NA, SM-GM-LM, SM-GM-LM-NA, SM-PC-NA-LM, SM-TC-AP-NA-LM 및 SM-PC-GM-LM-NB型에서 각각 2株이었고,

나머지 29型에서는 각각 1株의 順으로 나타났었다.

考 察

獸醫診療의 領域에서 化學療法劑가 가장 많이 사용되고 있는 分野는 역시 젖소의 乳房炎治療라고 할 수 있다. 乳牛의 乳房炎 原因菌으로서 많은 菌種이 있음이 報告되고 있다^{6,9,14-16}. 乳房炎의 原因菌中 連鎖球菌屬의 菌種은 抗生物質로서 쉽게 抑制되기 때문에 점차 減少의 傾向을 나타내어 크게 問題視되지 않으나, 藥劑에 대하여 쉽게 耐性を 획득하는 경향이 있는 *Staph. aureus*는 主된 原因菌으로서 중요시되고 있다. ^{6,14,17} 이와 같은 現實에 비추어, 著者 등은 潜在的으로 乳房內에 存在하고 있을 것으로 생각되는 경우와, 牛舍와 牛體에 常在하여 搾乳時에 牛乳에 混入되었을 것으로 생각되는 葡萄球菌을 牛乳輸送罐으로부터 360株를 分離하고, 몇 가지 生物學的의 性狀을 實驗한 結果 7.5% 耐鹽性인 360株는 catalase 產生能과 glucose의 嫌氣的 醱酵性이 모두 100%이었으나 mannitol 分解能이 326株로서 91%이었으며, 病原性과 가장 관련성이 깊은 coagulase 產生能檢査에서는 陽性이 198株로서 全分離菌株의 55%에 不過하였다. 大塚 및 小林¹¹에 의하면 DNase活性試驗과 coagulase 產生能과의 연관성이 아주 높다는 사실을 감안하여 이 實驗에서도 coagulase 陽性株만을 病原性株로 推定, 各種 藥劑에 대한 耐性的의 樣狀을 檢査하였었다. 그리고 coagulase 陽性菌이 病原性과 관련성이 있다고 하는 mannitol 分解能에 관해서 檢査한 結果는 第2表에서 보는 바와 같이 coagulase 陽性 198株中 94%(186株)가 mannitol을 分解하였는데 이는 大塚 및 小林¹¹의 coagulase 陽性인 全菌株가 mannitol을 分解하였다는 報告와는 多少 差異가 있었으며, 陰性菌 162株中 86%(140株)가 mannitol을 分解하였는데, 이는 遺傳的變異로 인하여 coagulase-陽性菌이 mannitol의 分解能이 缺與될 수도 있으나² 陰性菌株의 86%가 mannitol을 分解하고 있는 點은 注目할만 하다. 特히 大塚 및 小林¹¹가 coagulase 陽性인 *Staph. aureus*의 全供試菌株가 醱酵型이었다는 사실을 고려할 때 食品衛生上 매우 注目할만 한 點이다.

coagulase 陽性株에 限하여 藥劑耐性檢査를 實施한 바로는 最少發育抑制濃度(MIC)를 測定하지 않고 Wolf 등¹³의 方法과 Frankel 등¹²의 基準值를 使用하였기 때문에 他的 報告와 比較하기는 어려울 것이나 이 實驗의 藥劑濃度로 換算하여 比較하여 보면 SM의 경우 이 實驗結果의 45.4%에 대하여 韓 鄭¹⁵은 23.2%, 日本의 堂本 등¹⁷은 42%로서 相互間에 큰 差異를 보여주고 있어

地域과 菌株에 따라서 耐性程度에 差異가 있음을 보여 주고 있었다. 堂本 등¹⁷은 人由來나 牛乳房炎由來의 *Staph. aureus*에 있어서는 물론, 地域 혹은 牧場에 따라서도 耐性率에 差異가 있음을 말하고 있어, 供試한 菌에 대해서도 牛體表 혹은 乳汁中の 傳播樣式에서 생각한다면 充分히 생각할 수 있는 문제이다.

藥劑耐性檢査의 對象으로 提供한 coagulase 陽性株에 대하여 10種의 藥劑中 耐性率(耐性頻度)이 높았던 藥劑는 LM이 94.9%, NA가 82.8%, 그리고 SM이 45.4%이었으며, 흔히 많이 사용되고 있는 PC가 11.6%로 豫想보다 低率을 나타내고 있었다. 그리고 CP가 1%, KM이 5%, AP가 6%로서 앞으로 藥劑選擇에 있어서 크게 參考가 될 것으로 思料되었다.

一般的으로 많이 使用되는 藥劑인 SM, PC 및 TC에서 他藥劑에 比하여 높은 耐性的의 경향을 보여주고 있음은 韓 및 鄭¹⁵의 結果와 같다고 본다.

使用한 藥劑中 1劑에서 6~7劑까지의 多劑耐性類型으로 본 各菌株의 比率는 2劑(28.8%)와 3劑(29.3%)가 58.1%(115株)를 占하고 있어 全體의 半數를 超過하였으며, 다음으로 4劑(16.7%), 5劑(13.6%)로서 使用된 藥劑의 種類는 研究者에 따라 一致하지는 않았지만, 多劑耐性菌株의 增加는 손 등⁸이 直接 乳房의 乳汁에서 分離한 菌株에서의 報告와 비슷한 경향을 나타내고 있어 乳房炎 原因菌種이 多劑耐性化한다는 點은 重要視되어야 할 問題라고 생각된다.

結 論

1977년 10月中에 全州市 所在 牛乳處理場에 入荷되는 牛乳輸送罐 26個를 對象으로 하여 7.5% 食鹽抵抗性과 몇 가지 生物學的의 性狀檢査로서 360株의 葡萄球菌株를 分離하고, coagulase 陽性菌株에 대해서는 藥劑耐性を 檢査하였으며, 아울러 多劑耐性類型도 判別하였다. 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. coagulase 陽性分離株中 99.5%(197株)가 1劑以上の 藥劑에 대하여 耐性を 보였다.
2. 使用한 各種藥劑에 따른 coagulase 陽性株의 耐性率은 lincomycin이 188株(94.8%)로서 가장 높았고, nalidixic acid 164株(82.8%)와 함께 高度의 耐性を 보였다. streptomycin이 90株(45.4%)로서 中等度의 耐性を 나타내었다. 또한 novobiocin, tetracycline, gentamicin 및 penicillin이 各各 50株(25.2%), 46株(23.2%), 40株(20.2%) 및 23株(11.6%)로서 比較的 낮은 耐性を 보였으며, ampicillin, kanamycin 및 chloramphenicol이 各各 12株(6.0%), 10株(5.6%) 및 2株(0.5

%)로서 낮은 耐性率을 나타내고 있었다.

3. 耐性類型으로 보면 2劑 以上の 多劑耐性株가 92.9% (184株)로서 單劑耐性株 6.6% (13株)보다 월등히 높았으며, 53個의 耐性類型이 觀察되었다. 한편, 13個 單劑耐性類型中 LM類型이 9株로서 가장 많았으며, 반면에 多劑耐性類型에서는 NA-LM, SM-NA-LM, TC-NA-LM, SM-LM, SM-TC-NA-LM 및 SM-GM-NA-LM-NB類型들이 相當한 頻度로 觀察되었다.

參 考 文 獻

1. Baird-parker, A.C.: Gram positive cocci, In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), Berg-ey's manual of determinative bacteriology. 8 ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974) p. 478—490.
2. Wilson, G.S. and Miles, A.: Principles of bacteriology, virology and immunity. 6 ed., Edward Arnold Co., London (1975) p. 764—801.
3. Lacey, R.W.: Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bact. Rev. (1975) 39(1): 1.
4. Wood, D. O., Carter, M.J. and Best, G.K.: Plasmidmediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 12(4): 513.
5. Porthous, A., Brown, D.F.J., Smith, R.G. and Rogers, T.: Gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. Lancet (1976) 3: 20.
6. 金鍾冕, 郭澤勲: 全北地方 젖소의 異常乳 發生狀況과 原因菌에 관한 研究. 大韓獸醫學會誌 (1975) 15: 315.
7. 송기홍, 조중현, 홍순중: 경기도 지역의 유우 유방염에 관한 조사. 3. 한수이남 지방의 젖소유방염 발생실태. 大韓獸醫學會誌 (1975) 15: 109.
8. 손봉환, 김효민, 정홍환, 김수장: 京畿道地域의 乳牛 乳房炎에 관한 調査. I. 乳房炎의 疫學的 調査. 大韓獸醫學會誌 (1975) 14: 99.
9. 久米常夫: Enterobacteriaceaeによる 牛의 乳房炎. 畜産의 研究 (1977) 31: 15.
10. 清水龜平次, 小野 齊: 乳牛의 乳房炎. 第2版, 明文書房, 東京 (1974) p. 77—78.
11. 大塚義一, 小林嘉一: フドウ球菌의 生乳力의 分離頻度とその 藥劑耐性. 日獸會誌 (1977) 30: 143.
12. Frankel, S., Reitmann, S. and Sonnenwirth, A.C.: Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis: A textbook on laboratory procedures and their interpretation. 7 ed., London, C.V. Mosby Company (1970) p. 1400—1413.
13. Wolf, P.L., Russell, B. and Shimoda, A.: practical clinical microbiology and mycology: Techniques and interpretations. John Wiley & Sons, New York (1975) p. 185—209.
14. 鄭昌國, 韓弘栗, 鄭吉澤: 우리나라 젖소 乳房炎 原因菌의 疫學的 調査 및 治療에 관한 研究. 大韓獸醫學會誌 (1970) 10(1): 39.
15. 韓弘栗, 鄭吉澤: 乳牛 乳房炎源 *Staphylococcus aureus*의 각종 化學療法劑에 대한 感受性試驗. 大韓獸醫學會誌 (1972) 12(1): 85.
16. 石湖峰, 李鉉洙: Lancefield grouping에 의한 乳房炎 由來 *Streptococcus*의 同定과 抗生物質에 대한 感受性調査, 大韓獸醫學會誌 (1975) 15: 69.
17. 堂本憲司, 浜田義雄, 久米常夫: 牛의 乳房炎乳汁 由來 *Staphylococcus aureus*의 藥劑耐性. 家畜衛生試驗場研究報告 (1976) 73: 14.
18. 金拱珠, 洪淳國, 蘇景宅, 韓弘栗: 忠南地域 乳牛 乳房炎의 感染率 및 原因菌에 관한 研究. 大韓獸醫學會誌 (1974) 14: 91.

Drug Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates from Raw Cow Milk

Jong-Myeon Kim, D. V. M., M. S., Ph. D.

Department of Biology, College of Liberal Arts and Sciences, Jeonbuk National University

Hee-Jong Song, D. V. M.

Department of Animal Science, College of Agriculture, Jeonbuk National University

Taik-Hoon Kwak, D. V. M., M. S.

Iri Branch of Jeonlabugdo Domestic Animal Health Center

Abstract

A total of 360 *Staphylococcus* isolates from 26 raw cow milk sample in milk plants of Jeonju district during October 1977, identified by 7.5% salt resistant reaction and other biological properties. Antibiotic sensitivity test was also performed in coagulase positive *Staphylococci*. In addition to this, the rate of multiple resistance patterns were analysed.

The results obtained in this work were summerized as follows:

1. Among 198 coagulase positive *Staphylococcus* isolates, 99.5% (197 strains) were resistant to antibacterial agents such as streptomycin (SM), chloramphenicol (CP), penicillin(PC), tetracycline(TC), kanamycin(KM), ampicillin(AP), nalidixic acid(NA), gentamicin(GM), lincomycin(LM), and novobiocin(NB), singly or in combination.
2. The coagulase positive *Staphylococcus* isolates were more resistant to LM(94.8%) and NA (82.8%), than other drugs such as SM(45.4%), NB(25.2%), TC(23.2%), GM(20.2%), PC (11.6%), AP(6.0%), KM(5.6%) and CP(0.5%).
3. The multiple resistant isolates(92.9%) were more than those of singly resistant isolates (7.1%) and 53 different drug resistant patterns were observed. Among the 13 singly resistant isolates, LM pattern (9 strains) was the commest. While among the 184 multiple resistant isolates, NA LM, SM NA LM, TC NA LM, SM LM, SM TC NA LM and SM GM NA LM .NB patterns were frequently observed.