

젖소 乳房由來 葡萄球菌에 관한 研究 : III. 分離菌株에 대한 Penicillins 및 Gentamicin의 抗菌效果

朴 清 圭
慶北大學校 農科大學 獸醫學科
(1984. 8. 10 接受)

Studies on Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis: III. Activity of Penicillins and Gentamicin to Isolates

Cheong-kyu Park

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongbuk National University

(Received August 10, 1984)

Abstract: The *in vitro* activity of penicillins (penicillin G, ampicillin, carbenicillin, methicillin and cloxacillin) and gentamicin to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples was determined. The growth of all isolates of staphylococci tested was inhibited by cloxacillin and methicillin at a concentration of 0.78 $\mu\text{g/ml}$ and by gentamicin at a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1.56 $\mu\text{g/ml}$.

Of the 140 strains of *Staphylococcus aureus* isolated, 99 (70.7%) gave positive reactions for penicillinase on the starch-iodine test. Of 121 isolates of coagulase-negative staphylococci, 58 (47.9%) showed penicillinase production, but all the *Staph. xylosus* lacked the ability to produce penicillinase. MIC of penicillin G of the penicillinase-positive strains was 0.2 $\mu\text{g/ml}$ or more.

The combination of cloxacillin with gentamicin showed a synergistic effect by inhibiting regrowth of the tested organism.

緒 論

젖소의 急性 또는 慢性乳房感染症에 있어 *Staphylococcus aureus*는 分離頻도가 높아 主要原因菌으로서 크게 問題視되고 있으며^{14, 16, 17, 22, 24, 29, 32)}, coagulase陰性 staphylococci는 一般的으로 非病原菌으로 看做되었으나 潜在性 내지는 慢性乳房炎 發症에 관여하여 乳汁分泌기능을 저하시킴이 報告^{3, 6, 10, 17, 28)}된바 있고, 또한 未經産牛의 乳房炎 原因菌^{3, 4)}으로도 重要視되고 있어, 이 菌의 臨床의 意義도 주목되고 있다.

penicillin G는 이들 菌에 대한 높은 抗菌作用과 生體에 대한 낮은 毒性을 지닌 抗生物質로서 젖소 乳房炎 治療에 많이 使用되어 왔으나, 近年 乳房炎發症分房으로부터 penicillin G에 대한 耐性 *staph. aureus*의 높은 分離率이 報告^{7, 12, 15, 19, 25)}되어 이들 耐性菌株에 의한 感染은 치료에 중대한 問題가 되고 있다.

葡萄狀球菌의 penicillin G에 대한 耐性은 주로 penicillinase의 産生에 의하며, 이 酵素의 産生能이 없는 菌株은 penicillin G에 대한 높은 感受性を 나타내고 있다^{1, 5, 21)}. 한편, gentamicin은 大腸菌을 비롯한 Gram

陰性桿菌에 대한 抗菌作用이 강한 藥劑임이 報告된 바 있다^{9, 25, 26, 31}).

이 研究에서는 젖소 乳房炎由來 staphylococci 菌株에 대해 penicillin 群 抗生物質 (penicillin G, ampicillin, carbenicillin, cloxacillin 및 methicillin) 과 gentamicin의 最少發育阻止濃度 測定과 이들 菌株의 penicillinase 產生能을 調査하여 *Staph. aureus*와 coagulase 陰性 staphylococci 사이에 感受性的 差異를 比較檢討하였고 또한 penicillinase에 耐性인 cloxacillin과 gentamicin의 混合에 따른 抗菌效果에 대해서 實驗하여 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

供試菌株 : 1981년부터 1982년 사이에 大邱近郊에서 사육하고 있는 젖소의 急性 또는 慢性乳房炎發症例에서 分離한 *Staph. aureus* 140株과 coagulase 陰性 staphylococci 121株를 使用하였다.

供試藥劑 : penicillin 群 抗生物質로서 penicillin G (조화), ampicillin (종근당), carbenicillin (Pfizer), cloxacillin (영진) 및 methicillin (한올) 과 gentamicin (Schering)을 供試하였으며 penicillin 群 抗生物質은 phosphate buffer (pH 6.5)를 溶媒와 稀釋液으로, 그리고 gentamicin은 증류수를 稀釋液으로 使用하였다.

藥劑感受性試驗 : 寒天平板稀釋法에 의하여 檢査하였다. 즉 供試藥劑를 2배 段階稀釋하여 각 稀釋別로 添加한 Mueller-Hinton 平板培地 (Difco)를 調製하였다. 供試菌을 nutrient broth (Difco)에 18時間 培養한 후, 생리식염수로 100배 稀釋한 것을 Steers 등²⁰의 接種器로 藥劑含有培地에 接種, 37°C에 24時間 培養한 다음 菌發育 有無를 보아 最少發育阻止濃度 (MIC)를 測定하였다.

penicillinase 產生能檢査 : 分離菌株의 penicillinase 產生能은 Workman 및 Farrar²¹의 starch iodine法에

따라 檢査하였다.

cloxacillin과 gentamicin의 混合에 따른 影響檢査 : trypticase soy broth (TSB, BBL)에 一定濃度の 藥劑를 含有한 各各의 培地를 準備하였다 (Table 4 참조). 供試菌을 TSB에 18時間 培養한 다음 생리식염수로 100배 稀釋하여 그 0.5ml를 9.5ml의 供試培地에 接種하고 즉시 菌數를 計算한 다음 37°C에 培養하면서 時間의 經過에 따라 菌數를 計算하였다.

細算 : 細菌接種直後와 培養後 그 內容物을 各各 攪 混合한 다음 0.1ml를 취하여 細菌繁殖程度에 따라 各當히 稀釋한 것을 0.1ml씩 nutrient agar (Difco)에 均等히 塗末培養하여 나타나는 集落數를 計算하여 原液中的 細菌數를 算出하였다.

結 果

分離한 *Staph. aureus* 140株의 penicillin 群 抗生物質과 gentamicin에 대한 感受性的 程度를 보았던 바, 그 成績은 Table 1에서와 같다. penicillin G와 ampicillin의 供試菌株에 대한 MIC의 分布는 多樣하였고, 이들 藥劑의 全供試菌株에 대한 MIC는 100µg/ml이었다. 그러나 cloxacillin과 methicillin은 0.8µg/ml에서 그리고 gentamicin은 1.6µg/ml 濃度에서 全菌株가 發育阻止를 보여 이들 藥劑는 供試菌株에 대해 作用이 강한 抗菌劑였다.

coagulase 陰性 staphylococci 121株의 供試藥劑에 대한 感受性を 보면 (Table 2), penicillin G, ampicillin 및 carbenicillin은 全供試菌株에 대한 MIC가 25µg/ml 이었고, cloxacillin 과 methicillin은 0.8µg/ml에서 그리고 gentamicin은 0.4µg/ml 濃度에서 全菌株가 發育阻止를 보였다.

젖소 乳房炎由來 葡萄狀球菌의 penicillinase 產生能을 보면 Table 3에서와 같이 penicillin G의 MIC는 0.2 µg/ml 또는 그 以上인 全菌株가 penicillinase 產生 陽

Table 1. Susceptibility of 140 *Staph. aureus* to penicillins and gentamicin

Drug	MIC** in µg/ml of Agar											
	≤0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100
Penicillin G	41		18*	6*	18*	12*	3*	5*	6*	18*	1*	12*
Ampicillin	18	23		25		36	2	6	5	12	1	12
Carbenicillin			13	23		41	25	24	12	2		
Methicillin			7	49	84							
Cloxacillin		6	96	37	1							
Gentamicin			18	31	67	24						

* : Penicillinase producing strains. ** : Minimal inhibitory concentrations.

Table 2. Susceptibility of 121 coagulase-negative staphylococci to penicillins and gentamicin

Drug	MIC** in $\mu\text{g/ml}$ of Agar									
	≤ 0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25
Penicillin G	38	25	10*	12*	11*	6*	10*		3*	6*
Ampicillin	37	21	21	6	15	9		3	3	6
Carbenicillin	1	14	4	20	28	23	9	14	8	
Methicillin			2	38	81					
Cloxacillin		21	46	40	14					
Gentamicin	49	37	21	14						

* : Penicillinase producing strains, ** : Minimal inhibitory concentrations.

Table 3. Production of penicillinase from *Staph. aureus* and coagulase-negative staphylococci

Species	No. of strains	Penicillinase	
		Positive	%
<i>Staph. epidermidis</i>	29	20	69.0
<i>Staph. saprophyticus</i>	5	3	60.0
<i>Staph. xylosum</i>	22	0	0.0
<i>Staph. simulans</i>	17	5	29.4
<i>Staph. haemolyticus</i>	20	14	70.0
<i>Staph. cohnii</i>	6	4	66.7
<i>Staph. hyicus</i>	4	2	50.0
<i>Staph. warneri</i>	2	0	0.0
Unidentified	16	10	62.5
Total	121	58	47.9
<i>Staph. aureus</i>	140	99	70.7

성株로서 *Staph. aureus*에서는 140株中 99株인 70.7%의 菌株가 이 酵素를 産生하였다. coagulase陰性 staphylococci는 121株中 58株(47.9%)가 penicillinase産生能이 있었고 이것을 菌種別로 보면 *Staph. epidermidis*에는 69.0%, *Staph. hemolyticus*는 70.0% 그리고 *Staph. simulans*는 29.4%의 菌株가 陽性이었으나 *Staph. xylosum* 22株中에서는 penicillinase産生株가 인정되지 않았다.

供試藥劑中 cloxacillin과 gentamicin의 混合藥劑가 *Staph. aureus* M24株에 대한 抗菌效果를 보았던 바 (Table 4), cloxacillin 0.16 $\mu\text{g/ml}$ 과 gentamicin 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 各各 單獨濃度에서는 供試菌株가 接種後 6時間까지는 약간의 菌數의 減少를 보이다가 다시 增殖을 하여 24時間 培養에서는 10⁸/0.1ml 以上の 菌數를 보였다. 그러나 이 두 藥劑의 混合에 依해서는 接種後 時間이 經過함에 따라 菌數의 減少가 현저하여 24時間後에는 완전히 殺菌되는 抗菌作用의 相乘效果가 인정되

Table 4. Growth of *Staph. aureus* M24 in trypticase soy broth with cloxacillin alone, or in combination with gentamicin and the latter alone

Incubated at 37°C(hrs)	0	1	3	6	24
Antibiotics	Viable Cell*				
Cloxacillin(0.16 $\mu\text{g/ml}$)	114 $\times 10^3$	115 $\times 10^3$	87 $\times 10^3$	15 $\times 10^3$	185 $\times 10^6$
Gentamicin(2.0 $\mu\text{g/ml}$)	114 $\times 10^3$	116 $\times 10^3$	106 $\times 10^3$	8 $\times 10^3$	5,400 $\times 10^6$
Cloxacillin(0.16 $\mu\text{g/ml}$) + Gentamicin(2.0 $\mu\text{g/ml}$)	114 $\times 10^3$	61 $\times 10^3$	23 $\times 10^3$	0.3 $\times 10^3$	0
Control	114 $\times 10^3$	142 $\times 10^3$	3,200 $\times 10^3$	1,560,000 $\times 10^3$	204,000 $\times 10^6$

* : Number of cells/0.1ml.

었다.

考 察

*Staph. aureus*는 젖소의 乳房炎에 있어 主要原因菌일 뿐만아니라 近年에 와서 藥劑耐性株의 分離頻도가

높아 問題視되고 있어^{2,7,12,17,23}, 大邱近郊에서 1981년부터 1982年 사이에 젖소의 臨床型 乳房炎으로부터 分離한 staphylococci에 대하여 penicillin群 抗生物質과 gentamicin의 抗菌效果를 檢討하였다.

*Staph. aureus*는 供試한 penicillin群 抗生物質中 pen-

icillinase에 抵抗性인 cloxacillin의 0.4 μ g/ml 濃度에서 大部分의 菌株가 發育阻止를 보여 이 藥劑에 높은 感受性을 보인 것은 McDonald 및 Anderson¹⁵⁾, Jones 등¹²⁾과 堂本 등³³⁾의 報告成績과 一致하였다. 또한 이들 菌株가 methicillin과 gentamicin에 대해서도 높은 感受性을 나타냈으며 methicillin이 分離菌株에 대해 강한 抗菌作用을 보인 點은 Frost 및 O'Boyle⁷⁾의 成績과는 一致된 所見이었으나, McDonald 및 Anderson¹⁵⁾은 그들 菌株의 58.8%만이 이 藥劑에 感受성이었음을 報告한 成績과는 差異가 인정되었다. coagulase陰性 staphylococci의 供試藥劑에 대한 感受性は 藥劑의 種類에 따라 多少 차이는 있으나 대체로 *Staph. aureus*에 비해 더 感受性인 傾向이었으며, 特히 gentamicin의 0.4 μ g/ml 濃度에서 全分離菌株가 發育이 阻止되어 coagulase陰性 staphylococci의 이 藥劑에 대한 感受性は 높았다. 이와같은 結果로 보아 葡萄狀球菌性 젖소乳房炎治療를 위해 cloxacillin, methicillin 및 gentamicin은 선택될 수 있는 效果的인 藥劑라 思料된다.

penicillinase를 產生하는 葡萄狀球菌은 penicillin G에 感受性인 菌株와는 一般的으로 區別된다. 이 成績에서 penicillin G는 MIC가 0.2 μ g/ml 또는 그 以上인 全分離菌株가 이 酵素를 產生하여 *Staph. aureus*의 70.7%가 penicillin G에 耐性이었다. 그러나 1974년에 美國에서 House 및 Manley¹¹⁾는 *Staph. aureus*의 47%가 penicillin G에 耐性임을 報告했고, 1980年 西獨에서 Sabolic 등¹⁸⁾은 44.9%, 1981年 濠洲에서 Frost 및 O'Boyle⁷⁾는 62%, 1976年 日本에서 堂本 등³³⁾은 42% 그리고 國內에서 1975년에 孫 등³⁰⁾은 *Staph. aureus*의 57.4%의 菌株가 penicillin G에 耐性임을 各各 報告하였다. 이와 같이 供試한 *Staph. aureus*의 penicillin G에 대한 耐性株의 分離頻度에 있어 현저한 差異가 인정되는 것은 이 藥劑의 屢번한 使用에 따른 penicillinase產生變異株가 選擇된 結果라고 추측되며 따라서 *Staph. aureus*에 기인된 乳房炎에 penicillin G를 使用하여서는 좋은 治療效果를 기대하기 어려울 것으로 생각된다. coagulase陰性 staphylococci의 penicillinase陽性株의 分離頻度は *Staph. aureus*에 비해 현저히 낮아 47.9%였고, 이들 菌株를 Kloos 및 Schleifer¹³⁾의 分類에 따른 菌種別 差異를 보면 *Staph. xylosus*에서는 이 酵素의 產生株가 인정되지 않아, 이 菌種의 penicillinase陽性 變異株의 出現頻度は 극히 낮을 것으로 推定된다. Gedek 및 Kleinschroth⁹⁾은 그들이 分離한 coagulase陰性 staphylococci의 penicillinase陽性率은 40%였음을 報告하였다.

供試한 penicillin群 抗生物質中 penicillinase의 作用

을 받지않은 cloxacillin과 젖소 乳房炎由來 Gram陰性 桿菌에 강한 抗菌力을 나타낸 바 있고^{9, 25, 26, 31)}, 또한 이 研究에 供試된 葡萄狀球菌에도 作用이 강한 gentamicin의 混合劑는 分離菌株에 대해 抗菌作用의 相乘效果가 있음을 인정할 수 있었다. 이 混合劑의 臨床應用에 있어 얻어질 수 있는 다른 長點으로는 藥劑耐性變異株의 出現頻度を 줄일수 있다는 點과 混合感染된 例에서 뿐만 아니라 時急한 治療를 要求하고, 또한 原因菌의 藥劑에 대한 感受性檢査를 실지 하지못할 경우에 있어 우선 治療藥劑로 선택할 수 있는 것으로 生覺된다.

結 論

젖소의 急性 또는 慢性乳房炎으로부터 分離한 *Staphylococcus aureus* 140株와 coagulase陰性 staphylococci 121株에 대한 penicillin群 抗生物質(penicillin G, ampicillin, carbenicillin, cloxacillin 및 methicillin)과 gentamicin의 抗菌效果를 試驗하였다.

供試한 penicillin群 抗生物質中 penicillinase의 作用을 받지않은 cloxacillin과 methicillin은 0.8 μ g/ml 濃度에서 그리고 gentamicin은 1.56 μ g/ml의 濃度에서 全分離菌株가 發育阻止를 보여 抗菌作用이 강한 抗菌劑였다.

Staph. aureus 140株中 99株(70.7%)가 penicillinase 產生 陽性이었다. coagulase陰性 staphylococci 121株에서는 58株(47.9%)가 penicillinase 產生陽性이었고, *Staph. xylosus*에서는 이 酵素의 產生株가 인정되지 않았다. penicillinase產生株에 대한 penicillin G의 MIC (最少發育阻止濃度)는 0.2 μ g/ml 또는 그 以上이었다. cloxacillin과 gentamicin의 混合에 依해서 分離菌에 대한 抗菌作用의 相乘效果가 인정되었다.

參 考 文 獻

1. Adams, A. P., Barr, A. L. and Benner, E. J.: A simple, rapid test to differentiate penicillin-susceptible from penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Inf. Dis. (1970) 122 : 544.
2. Bishop, J. R., Bodine, A. B. and Janzen, J. J.: Sensitivities to antibiotics and seasonal occurrence of mastitis pathogens. J. Dairy Sci. (1980) 63 : 1134.
3. Brown, R. W.: Intramammary infections produced by various strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus*. Cornell, Vet. (1973) 63 : 630.
4. Brown, R. W., Sandvik, O., Scherer, R. K.

- and Rose, D.L.: Differentiation of strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine udders. J. Gen. Microbiol. (1967) 47 : 273.
5. Duma, R.J. and Kunz, L.J.: Simple test for identifying penicillinase-producing staphylococci. Appl. Microbiol. (1968) 16 : 1261.
 6. Forbes, D. and Hebert, C.N.: Studies in the pathogenesis of staphylococcal mastitis. Vet. Rec. (1968) 82 : 69.
 7. Frost, A.J. and O'Boyle, D.: The resistance to antimicrobial agents of *Staphylococcus aureus* isolated from the bovine udder. Aust. Vet. J. (1981) 57 : 262.
 8. Gedek, W. and Kleinschroth, E.: Verbreitung penicillinase bildender Staphylokokken und Mikrokokken in Milchviehherden. Tierärztl. Umschau (1979) 34 : 474.
 9. Hennessey, P.W., Kohn, F.S., Bickford, S.M. and Loy, J.I.: *in vitro* Activity of gentamicin against bacteria isolated from domestic animals. Vet. Med. Small Ani. Cli. (1971) 66 : 1118.
 10. Holmberg, O.: *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk: biochemical properties, phage sensitivity and pathogenicity for the udder. Acta Vet. Scand. Suppl. (1973) 45 : 1.
 11. House, J.A. and Hanley, H.: Antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* from bovine milk. Cornell Vet. (1974) 64 : 584.
 12. Jones, A., Higgs, T.M., Neave, F.K. and Smith, A.: The sensitivity of bovine staphylococci, streptococci and corynebacteria to cloxacillin and various other antibiotics. J. Dairy Res. (1967) 34 : 249.
 13. Kloos, W.E. and Schleifer, K.H.: Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. J. Cli. Microbiol. (1975) 1 : 82.
 14. McDonald, J.S.: Relationship of hygiene, milking machine function and intramammary therapy to udder disease. J. A. V. M. A. (1969) 155 : 903.
 15. McDonald, J.S. and Anderson, A.J.: Antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from infected bovine mammary glands. Cornell Vet. (1981) 71 : 391.
 16. Neave, F.K., Dodd, F.H. and Kingwill, R.G.: A method for controlling udder disease. Vet. Rec. (1966) 78 : 521.
 17. Newbould, F.H.S.: Epizootiology of mastitis due to *Staphylococcus aureus* J. A. V. M. A. (1968) 153 : 1683.
 18. Sabolic, M., Wonka, W. and Gerlach, R.: Zum Vorkommen penicillinase bildender Staphylokokken und Mikrokokken im Euter bei Milchviehherden. Tierärztl. Umschau (1980) 35 : 671.
 19. Sharma, V.K., Bhattanagar, A. and Rajani, H.B.: Chemotherapeutic sensitivity of microorganisms isolated from bovine udder. Indian J. Anim. Sci. (1971) 41 : 96.
 20. Steers, E., Flotz, E.L. and Graves, B.S.: An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. (1959) 2 : 307.
 21. Workman, R.G. and Farrar, W.E.: Activity of penicillinase in *Staphylococcus aureus* as studied by the iodometric method. J. Inf. Dis. (1970) 121 : 433.
 22. 金洪洙, 洪淳國, 蘇景宅, 韓弘栗: 忠南地域 乳牛乳房炎에 感染率 및 原因菌에 관한 研究. 大韓獸醫學會誌 (1974) 14 : 91.
 23. 金鳳煥, 金晉龜, 崔尙龍: 慶南地方에서 發生한 젖소의 慢性乳房炎에 대한 研究. 大韓獸醫學會誌 (1983) 23 : 205.
 24. 羅鎮洙, 康炳奎: 全南地域 乳牛乳房炎의 疫學的 調査研究, 1. 原乳中の 細菌數 및 乳房炎檢診. 大韓獸醫學會誌 (1975) 15 : 83.
 25. 朴清圭: 젖소乳房炎由來 Gram陰性桿菌의 藥劑感受性. 大韓獸醫學會誌 (1980) 20 : 53.
 26. 朴清圭: 젖소 乳房炎由來 腸內細菌의 藥劑耐性 및 R. Plasmids. 大韓獸醫學會誌 (1981) 21 : 25.
 27. 朴清圭: 젖소乳房炎由來 葡萄球菌에 관한 研究, I. *Staphylococcus aureus*의 生化學的 特性. 大韓獸醫學會誌 (1982) 22 : 15.
 28. 朴清圭, 趙鏞煥: 젖소 乳房炎由來 葡萄球菌에 관한 研究, II. coagulase陰性 staphylococci의 分類 및 生化學的 特性. 大韓獸醫學會誌 (1983) 23 : 165.
 29. 石瑚峰, 李光源, 吳成龍: 成歡地域의 乳牛乳房炎에 관한 研究, 1. 乳房炎의 發生實態와 그 原因菌

- 調査. 大韓獸醫學會誌(1981) 21 : 161.
30. 손봉환, 김효민, 한응주, 정홍환, 김수장 : 京畿道 지역의 乳牛乳房炎에 관한 調査, 4. 乳牛乳房炎에서 分離한 *staphylococcus*와 *streptococcus*의 抗菌劑에 대한 感受性試驗. 大韓獸醫學會誌(1975) 15 : 101.
31. 李且秀, 朴清圭 : 젖소 乳房炎으로부터 Gram陰性桿菌의 分離 및 藥劑感受성에 관한 研究. 大韓獸醫學會誌(1980) 20 : 79.
32. 久米常夫, 平棟考志, 村瀨信雄 : 牛의 臨床型および 潛在性乳房炎と乳汁의 細菌叢. 家畜衛生研究報告, 日本(1970) 61 : 37.
33. 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. 家畜衛生研究報告, 日本(1976) 73 : 14.
-