

젖소 유방염 유래 *Staphylococcus aureus*의 Coagulase Gene 유전형 분석에 의한 감염경로 규명

문진산¹, 이애리¹, 임숙경, 주이석, 강현미, 김종만, 김말남¹

국립수의과학검역원, 상명대학교¹

(게재승인: 2003년 2월 19일)

Epidemiological Investigation of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis Based on the Polymorphism of Coagulase Gene

Jin-San Moon¹, Ae-Ri Lee¹, Suk-Kyung Lym, Yi-Seok Joo, Hyun-Mi Kang, Jong-Man Kim, Mal-Nam Kim¹

National Veterinary Research and Quarantine Service,

Department of Biology, Sangmyung University¹

(Accepted: February 19, 2003)

Abstract: Because *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) has variable number of short sequence repeat region in coagulase gene, it has been used to investigate the relatedness of *S. aureus* isolates. In this study, we isolated *S. aureus* strains from 20 dairy farms with bovine mastitis from September 2000 to August 2001. PCR-RFLP analysis of coagulase gene revealed 10 different patterns. Most of the *S. aureus* isolates showed only one coagulase gene RFLP pattern per farm. However, there were several *S. aureus* clones spreading between dairy farms. All the farms showed poor management conditions of milking machine and milker, indicating that managements for mastitis control program include use of proper milking matching, premilking sanitation, and segregation in the *S. aureus* infection herd. Our data suggest that PCR-RFLP analysis of coagulase gene might be applicable for the epidemiological investigations of *S. aureus* isolated from bovine mastitis cows.

Key words: cow, mastitis, *Staphylococcus aureus*, coagulase gene

서 론

유방염은 젖소 자체의 유전, 생리 및 해부학적 요인과 목장 사양관리나 사육환경 등의 요인이 서로 복합적으로 작용하여 유방 주변에 상존하는 미생물이 유방내에 침입하여 유선내 염증을 형성하는 것으로서 유방염의 원인균에는 80여종이 있으며, 그로 인한 경제적 손실은 막대하다^{1,2}. 유방염 원인균 중 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)는 전염성 균으로서 젖소의 체내에 상재하면서 유두를 통해 유방 내에 침입하여 유즙내의 백혈구에 의해 탐식되더라도 백혈구 내에서 계속 생존하며, 유선조

직 내에서 섬유조직으로 캡슐화된 다양한 크기의 미세 농양을 형성함으로써 한번 감염되면 약물 침투가 불가능하여 고질적인 감염 양상을 나타낸다^{3,4}. 또한, *S. aureus*에 이환된 유방염 감염우로부터 생성된 enterotoxins 이 치즈, 버터의 오염원으로 작용하여 식중독의 원인으로 인식되면서 공중보건학적 측면에서도 원유의 위생적인 관리가 매우 중요하게 평가되고 있다^{5,6,7}.

그 동안 사람이나 동물에서 유행하는 병원체에 대한 유전적 다양성이나 구조 등에 관한 연구 결과에 의하면 대부분의 질병 발생은 전체 유전형 중 적은 부분을 차지하는 clone에 의해 발생되고 이러한 역학조사에 대한

* Corresponding author: Jin-San Moon

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, 480, Anyang 6-Dong Anyang Kyunggido, 430-016, Korea.
Tel: 031-467-1767, Fax: 031-467-1778, E-mail: Moonjs@nvrs.go.kr

연구를 수행하는데 있어 균주간 아형의 분류(typing)는 균주 간의 동일여부를 판정하는데 중요한 기준이 되는 것으로 보고되었다^{8,9}.

국내에서는 유방염 유래 *S. aureus*에 대한 항균제 내성 양상, 생화학적 성상 비교 등 표현형을 이용한 역학적 연구는 있었지만^{10,11,12}, 유전형에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다. 하지만 효과적인 유방염 관리를 위해서는 감염경로 규명을 위한 다양한 역학적 연구가 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 *S. aureus*의 병원성과 관련이 있는 것으로 알려진 coagulase gene의 3' coding 부분이 81 base pair (bp)의 반복 단위를 포함하고 있어 크기와 제한효소 절단부위가 서로 다른 polymorphism^{4,14}을 이용한 PCR-RFLP를 수행하여 유전형을 조사하고 목장별 균주들간의 유전적인 연관성과 유전형들의 특성을 조사하여 감염경로 규명 등을 실시하여 유방염 방제 전략을 세우는 기초자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

대상 목장 및 공시 재료

2000년 9월부터 2001년 8월까지 전국의 목장에서부터 무작위로 개체별 우유를 채취하여 냉장 운반한 다음 시료채취 과정에서 오염된 세균으로부터의 가양성 유방염을 제거하기 위하여 체세포수 검사를 실시하여 체세포수가 50만 이상의 시료에서 유방염 원인균 분리를 시도하였다. 유방염 조사 목장 중 *S. aureus* 균주가 분리되고, 역학조사표에 의하여 역학조사를 실시한 20개 목장을 실험 대상 목장으로 선정하였다.

체세포수 검사

체세포수 검사는 Milkoscan 4000 series (Foss Electric Co. Denmark) 기기를 이용하여 실시하였다. 체세포수 측정 검사장비의 정확한 결과를 얻기 위하여 직접현미경법¹⁵에 의해서 각각 측정된 3종의 결과치에 의하여 기기를 주기적으로 보정하여 사용하였다.

유방염 관련 역학조사

유방염 발생과 직·간접적으로 관련되어 있는 항목들에 대하여 역학조사를 실시하기 위하여 설문지를 작성하여 농가에 직접 방문조사 하였다. 조사항목으로는 목장규모, 유방염 발생상황, 착유시설 상태, 착유방법 및 착유위생 상태, 최근 1년 동안의 외부소 구입 여부 등을 조사하였다. 착유시설의 적정여부는 착유기 점검기구(SAC Co. Denmark)를 이용하여 국제표준기구(International Organization for Standardization)¹⁶와 미국 착유기 제조협

회(Milking Machine Manufacture Council)¹⁷의 권장기준에 의하여 판정하였다.

S. aureus 분리 동정

*S. aureus*는 Roberson 등(1992)¹⁸의 방법에 의하여 분리하였다. 먼저 유즙을 혈액배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 의심되는 집락은 그람염색, coagulase 응집 시험, Baird-Parker 배지 배양, DNase 시험, Voges-Proskauer 시험, mannitol 발효능 등을 실시하여 *S. aureus*로 동정하였다. 동정된 균주는 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

PCR-RFLP

DNA 추출은 Hookey 등(1998)¹⁹의 방법을 변형하여 사용하였으며, primer는 Hookey 등(1998)¹⁹과 Kaida 등(1989)¹⁴이 보고한 coagulase gene 중 Table 1과 같이 variable 부분이 포함되지 않으면서 3' repeat unit가 포함되도록 하여 (주)바이오니아에 의뢰하여 제작하였다.

Table 1. The oligonucleotide sequence of primers used in this study

Gene	Sequence	bp
coa	5'-ATA GAA ATG CTG GTA CAG G-3'	620~
	5'-GCT TCC GAT TGT TCG ATG C-3'	809

PCR 반응 조건은 5 μ l의 10 \times PCR buffer (Promega, USA), 6 μ l의 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mixture, 각 primer 쌍 100 pmol, 2 μ l DNA template, DMSO 2.5 μ l 및 2 unit의 Taq polymerase의 혼합액에 증류수를 최종 50 μ l가 되도록 첨가하여 thermal cycler (Perkin Elmer 2400, USA)에서 증폭시켰다. 증폭산물은 1% agarose gel에서 100V의 조건으로 약 1시간 전기영동한 후 자외선을 이용하여 밴드를 확인하였다. PCR-RFLP는 PCR 증폭산물 10 μ l에 2 unit의 Alu I (Promega, U.S.A) 제한효소를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2.75% agarose gel에 loading하여 ethidium bromide (0.5 μ g/ml)로 염색한 후 자외선 하에서 band를 확인하였다.

결 과

*S. aureus*의 coagulase gene을 이용한 유전형 분포도

S. aureus 표준균주를 비롯하여 20개 목장에서 분리한 약의 분리균 128주의 genomic DNA를 분리한 후 coa gene primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 Fig 1과 같이 620 bp와 809 bp사이에서 1개의 증폭산물을 얻을 수

있었다. PCR 증폭산물을 *Alu* I 제한효소로 처리한 결과 1개에서 4개의 분절을 보유하는 10가지의 PCR-RFLP 양상을 나타내어 A~J형으로 명명하였다 (Fig 2). A형은 620 bp의 증폭산물이 약 310 bp에서 분절되어 하나의 band로 나타났으며, D형은 제한효소 인식부위가 존재하지 않아 분절되지 않았으며, 나머지 유전형은 3~4개의 band를 보유하고 있었다. A에서 J까지의 10개의 유전형 중 B, D, I 유전형이 많은 목장에 분포하는 것으로 나타났다.

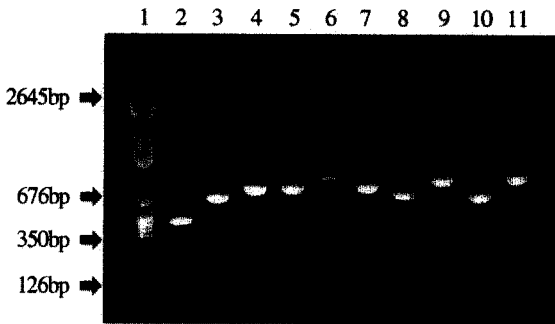


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction amplified coagulase genes. *S. aureus* isolated from bovine mastitis showed 10 different types. Lane 1 : pGEM DNA marker ; Lanes 2-11 : *S. aureus* isolates.

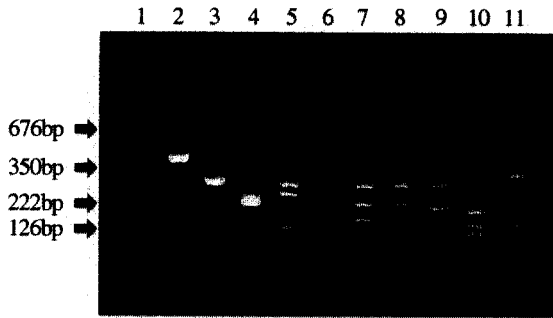


Fig 2. PCR-RFLP patterns. Coagulase gene was amplified and digested with *Alu* I restriction enzyme digestion of PCR amplified coagulase gene product of *S. aureus*. Lane 1: pGEM DNA marker, Lane 2: pattern A, Lane 3: pattern B, Lane 4: pattern C; Lane 5: pattern D; Lane 6: pattern E; Lane 7: pattern F; Lane 8: pattern G; Lane 9: pattern H; Lane 10: pattern I; Lane 11: pattern J.

유전형 분석에 의한 감염경로 규명

S. aureus 감염목장에 대하여 유전형을 분석하고, 목장 규모 및 체세포수 현황, 착유시설 및 착유위생 상태, 그리고 최근 1년 동안의 외부 소 구입여부 등에 대하여 역

학조사를 실시하였으며, 그 결과는 Table 2와 Table 3과 같다. 전체 조사 목장 20개 목장 중 B, H, J, T, U의 5개 목장을 제외하고 대부분의 목장에서는 오직 한 개의 유전형을 보유하고 있는 것으로 조사되어 최초 감염된 소에 의하여 목장내에 *S. aureus*가 상재하고, 부적절한 착유위생 및 착유기 사용으로 인하여 다른 소로의 전파 감염원으로 작용하는 것으로 나타났다. 또한, B, E, G, L의 4개 목장에서는 외부로부터 *S. aureus*에 감염된 소의 도입이 있었던 것으로 나타났으며, 이 목장에 대한 유방염 발생 순서 및 감염 양상에 대한 역학분석 내용과 유전형 분석에서 모두 동일한 유전형으로 조사되어 외부 구입 소에 의하여 목장내 다른 소에 전파된 것으로 나타났다 (Fig 3). 하지만 B, T, U의 3개 목장은 외부로부터 구입한 소는 없었으나 서로 다른 2개의 유전형이 상재하고 있는 것으로 나타났으며, 이 목장의 경우에는 진공압 누수, 낮은 진공압 사용 등 착유기 운용에 문제가 있는 것으로 조사되었다.

고 찰

세균의 분류, 특징 규명, 역학조사의 방법으로 최근에 분자생물학적 기법이 많이 이용되고 있다. 이중 비교적 초기에 이용된 restriction fragment length polymorphism (RFLP)은 band 수가 많고 각 band 사이의 해상도가 낮아 결과의 비교분석이 어렵다는 단점이 있다²⁰. 이를 극복하기 위하여 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 및 ribotyping 등을 이용하였는데, 이들 역시 시간과 비용이 많이 드며, band pattern을 판독하는데 어려움을 가지고 있다^{21,22,23}. 따라서 최근에는 변별력과 재현성이 PFGE에 비하여 약간 떨어지나 비교적 다른 형별보다 우수하고 시간이 적게 소요되며 다량의 균주를 단시간에 검사할 수 있는 polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)이 *S. aureus* 형별 분석에 많이 이용되어 왔다^{24,25,26}.

국내의 경우 젖소에서 *S. aureus*에 의한 유방염 발생율은 계속해서 줄지 않고 있어 분자생물학적 기법을 이용한 유전형 분석을 실시하여 감염경로 규명 등을 위한 다양한 역학적 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 *S. aureus*의 병원성과 관련이 있는 것으로 알려진 coagulase 유전자는 계대 후에도 안정하고 *Alu* I 제한효소 처리 후 다양한 RFLP 양상을 나타내기 때문에^{27,28,29} 이를 이용한 형별 분석 방법을 *S. aureus*에 감염된 20개 목장에서 분리한 128주에 대하여 실시하였다. 그 결과 620 bp와 809 bp 사이에 *coa* gene 1개의 증폭산물을 얻을 수 있었다(Fig 1). 이러한 결과는 본 실험과 동일한

Table 2. Distribution of coagulase gene types and actual situation on milking machine management at *S. aureus* infection farm

Herd	Size of herd	BTSCC* ($\times 10,000$)	<i>S. aureus</i> isolates	Coagulase gene types	Condition of milking machine management
A	27	35	9	D(9)	Adequate
B	17	38	4	E(4)	Leak of air from cock
C	33	70	32	B(20), I(12)	Short of pump capacity
D	18	70	5	B(5)	Adequate
E	25	60	7	B(7)	Overmilking
F	28	40	6	E(6)	Adequate
G	42	37	2	E(2)	Adequate
H	40	35	6	D(3), E(3)	Short of vacuum capacity
I	35	47	8	D(8)	Adequate
J	34	59	15	A(2), H(13)	Improper of milk unit
K	23	55	5	D(5)	High of vacuum level
L	20	50	4	B(4)	Adequate
M	27	10	2	C(2)	Adequate
N	19	22	3	F(3)	Overmilking
O	23	40	3	G(3)	Adequate
P	16	40	3	J(3)	Overmilking
Q	45	55	6	F(6)	Low of vacuum level
R	26	37	2	E(2)	Overmilking
S	36	65	5	D(4), J(1)	Low of vacuum level
T	33	56	7	A(5), B(2)	Short of vacuum capacity

* BTSCC : Bulk tank somatic cell counts.

Table 3. Current management situations of dairy farms with *S. aureus* infection

Herd	Introduction of infected cows	Hygiene of cows	Condition of milking hygiene			
			Hygiene of milker	Premilking	Individual udder washing	Segregation
A	No	○	△	Yes	No	No
B	Yes(4 heads)	△	△	Yes	No	No
C	No	○	○	No	No	Yes
D	No	△	△	Yes	No	Yes
E	Yes(1 head)	×	×	No	No	No
F	No	△	△	No	No	No
G	Yes(2 heads)	○	○	Yes	Yes	No
H	No	△	○	Yes	No	No
I	No	△	○	Yes	Yes	No
J	No	△	○	Yes	No	No
K	No	△	○	Yes	No	Yes
L	Yes(1 head)	△	×	No	No	Yes
M	No	△	△	Yes	No	Yes
N	No	△	△	No	No	No
O	No	×	△	Yes	No	No
P	No	△	△	Yes	No	No
Q	No	○	○	Yes	Yes	No
R	No	△	△	Yes	Yes	Yes
S	No	○	○	Yes	Yes	Yes
T	No	○	○	Yes	Yes	Yes

* ○ : Excellent, △ ; Good, × : Bad

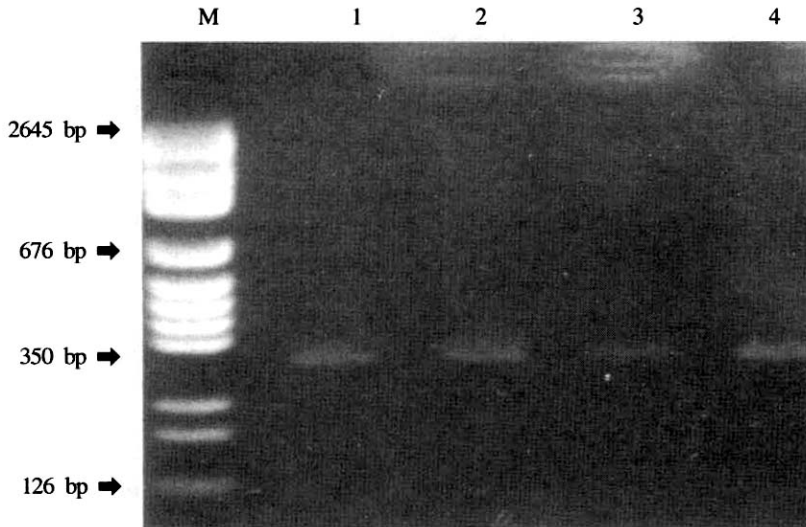


Fig. 3. Analysis of RFLP pattern(type B) of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in herd L. M : pGEM marker, Lane 1 : 2157 Lane 2 : 111, Lane 3 : 30, Lane 4 : 58(cow number).

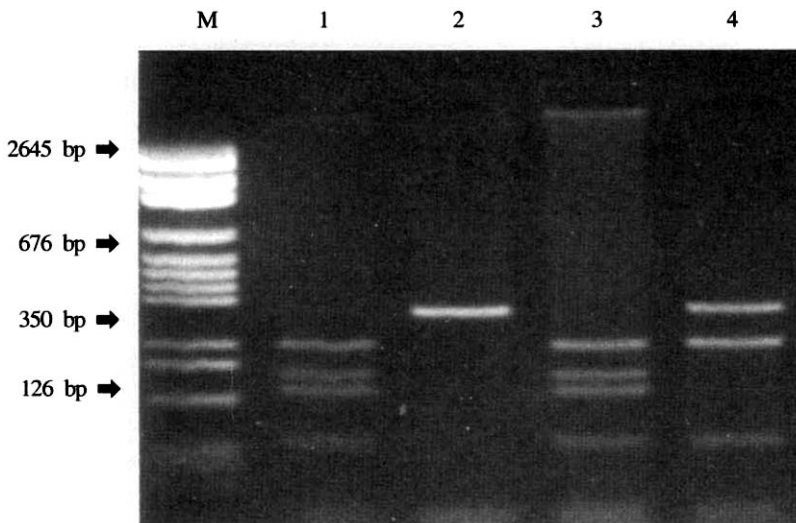


Fig. 4. Analysis of RFLP pattern of *S. aureus* isolates from bovine mastitis in herd B (M: pGEM marker, Lanes 1 and 3; I type, Lane 2: B type, Lane 4: D type).

primer를 사용한 Hookey 등(1998)¹⁹이 547 bp와 875 bp 사이에 1개의 PCR 증폭산물을 보였다는 보고와는 약간의 차이를 나타내었으며, 이러한 요인은 균주에 따라 반복 단위가 다르기 때문으로 생각된다²⁸. 하지만 본 연구에서 *S. aureus*으로부터 coagulase gene의 검출을 확인할 수 있다는 것은 유전형 분석에 의한 역학적 분석의 큰 실마리가 될 수 있음을 의미한다.

한편, 본 실험에서 사용한 primer는 다른 연구자들의 유방염 유래 *S. aureus*의 유전형 분석에 사용한 것과 다르기 때문에 다른 나라의 유방염 유래균들과의 상관성을 비교하는 것은 불가능하였다. 그리하여 본 연구에서는 국내 *S. aureus* 감염목장에 대하여 PCR-RFLP pattern을 조사하였다. 그 결과 1개에서 4개의 분절을 보유한 10가지의 PCR-RFLP 양상을 나타내어 A~J형으로 명명

하였다(Fig 2). 10개의 유전형 중 B, D, E 유전형이 많은 목장에 분포하고 있었으며, 조사 대상 20개 목장 중 B, H, J, T, U의 5개 목장을 제외한 나머지 목장은 오직 한 개의 단일 유전형을 보유하고 있는 것으로 조사되어 최초 감염된 소에 의하여 목장내에 *S. aureus*가 상재하고, 부적절한 착유위생 및 착유기 사용으로 인하여 다른 소로의 전파 감염원으로 작용하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Raimundo 등(1999)³⁰이 호주의 7개 목장에 대해 조사한 결과, 대부분의 목장이 1개 내지 2개의 유전형을 보유하고 있는 것과 유사한 결과를 나타내었다. 한편, 본 연구에서 목장별 유전형 분포의 차이를 나타내는 요인으로는 숙주, 사양관리, 근접한 지역 내에서의 소 구입 및 환경에 따라 특정 유전형이 잘 생존할 수 있는 조건 등에 의한 것으로 사료된다. 하지만 무엇보다도 국내의 경우 목장간 거리가 지리적으로 가까운 곳에 위치해 있으며, 소 구입과 사람이나 차량의 잦은 왕래 등으로 지역 또는, 목장간에 전파가 쉽게 이루어짐으로 인하여 좀더 다양한 유전형을 보유하고 있을 것으로 판단된다. 실제적으로 본 연구에서 20개의 조사 목장에서 10개의 서로 다른 유전형을 보유하고 있는 것으로 조사되어 위의 사실을 뒷받침해주는 결과로 사료된다.

본 연구에서 *S. aureus* 유전형 분석에 의한 감염경로를 조사하기 위하여 *S. aureus* 감염목장에 대하여 착유 시설 및 착유위생 상태, 그리고 외부 소 구입여부 등에 대하여 역학조사를 실시하였다. 그 결과, B, E, G, L의 4개 목장에서는 외부로부터 *S. aureus*에 감염된 소의 도입이 있었던 것으로 나타났으며(Table 3), 이 목장에 대한 유방염 발생 순서 및 감염 양상에 대한 역학분석 내용과 유전형 분석에서 모두 동일한 유전형으로 조사되어 외부 구입 소에 의하여 부적절한 착유위생으로 인하여 목장내 다른 소에 전파된 것으로 확인할 수 있었다(Fig 3). 또한, 외부로부터 감염된 소의 구입없이 단일 유전형을 보유하고 있는 *S. aureus*의 목장의 경우에는 착유시설 및 착유위생에 문제가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 잘못된 착유기의 사용은 유두끝 유두팔 약근의 손상으로 자연방어기전이 파괴되어 젖소 주변에 상존하고 있는 *S. aureus*와 착유시에 착유자의 손을 통하여 감염되었을 것으로 판단된다. 하지만 B, T, U의 3개 목장은 외부로부터 구입한 소는 없었으나, 서로 다른 2개의 유전형이 상재하고 있는 것으로 나타났으며, 이 목장의 경우에는 진공압 누수, 낮은 진공압 사용 등 착유기 운용에 문제가 있는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 과거 6개월 이전에 외부로부터의 소 구입 여부, 차량 및 사람에 의한 전파여부, 젖소 숙주에 대한 항생제 사용에 따른 내성 여부 등 다양한 감염경로에 의한 전

파가 있었을 것으로 사료된다.

이상의 결과에 비추어 볼 때 *S. aureus* 감염목장의 경우 부적절한 착유기 사용과 외부로부터 *S. aureus*에 감염된 소를 구입한 것이 주요 감염경로이며, *coa* gene 유전형을 이용한 multiplex PCR를 수행한 결과 대부분의 목장에서 유전자가 동일한 균주를 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 앞으로 체계적인 유방염 관리를 위해서는 본 연구에서 확인된 *S. aureus* 유전형의 분포 및 특성에 기초하여 *S. aureus*의 감염경로 추정 및 특정 유전형에 대한 격리 또는, 도태 등 적극적인 관리를 실시한다면 유방염 방제에 효과적일 것으로 판단된다.

결론

유방염 원인균 중 *S. aureus*는 전염성균으로 다양한 병원성 인자로 인해 한번 감염되면 치료가 어려워 고질적인 감염 양상을 나타낸다. *S. aureus*의 병원성과 관련이 있는 것으로 알려진 coagulase gene의 검출은 *S. aureus*를 쉽고 정확하게 동정해 낼 수 있으며 coagulase gene의 polymorphism을 이용한 PCR-RFLP 방법을 통해 유전형 및 유전적 연관성을 조사할 수 있다. 본 연구에서는 2000년 9월부터 2001년 8월까지 20개 목장으로부터 분리한 *S. aureus* 128균주를 실험 대상으로 하였으며 genomic DNA를 분리한 후 *coa* gene primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 *Alu* I 제한 효소로 처리하여 유전형을 분석하고 목장규모, 체세포수 현황, 착유시설과 착유위생 상태 및 최근 1년 동안의 외부 소 구입 여부에 대한 역학조사를 실시하였다. PCR-RFLP 분석 결과 1개에서 4개의 분절을 보유한 A~J의 10가지 유전형 양상을 나타내었고, B, D 및 E의 유전형이 많은 목장에 분포하는 것으로 조사되었으며 대부분의 목장이 한가지 유형의 유전형을 보유하고 있다. 또한 *S. aureus*의 감염목장의 경우 부적절한 착유기 사용과 외부로부터의 감염 소의 구입이 주요 감염경로로 조사되었다. 앞으로 체계적인 *S. aureus* 유방염 관리를 위해서는 본 연구의 유전형 분포 및 특성에 기초하여 *S. aureus*의 감염경로 추정 및 특정 유전형에 대한 적극적 관리가 요구된다.

참고문헌

- Gilmour A, Harvey J. Staphylococci in milk and milk products. A review. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 19:147~166, 1990.
- Musser JM, Schlievert PM, Chow AW, et al. A single

- clone of staphylococcus causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Proc Natl Acad Sci*, 87:225~229, 1990.
3. Shingawa K, Tanabayashi K, Kogure Y, et al. Incidence and population of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk from milking to milk plant. *Nippon Juigaku Zasshi*, 50:1060~1064, 1988.
 4. Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, et al. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4 sequence analysis and virulence of site-specific coagulase deficient mutants. *Mol Microbiol*, 4:393~404, 1990.
 5. Mor H, Vincentie HM. Staphylococci in cheese made from raw milk. *Tijdschr Diergeneeskd*, 100:991~994, 1975.
 6. Bergdoll MS. Enterotoxins. P559-598. In C.S.F. Easmon and C. Adlam(ed.), *Staphylococci and staphylococcal infections*. Academic Press, London, 1983.
 7. Gogov I, Peeva T, Slavchev G, et al. Enterotoxin staphylococci in the milk of cows and sheep with mastitis. *Vet Med Nauki*, 21:86~92, 1984.
 8. Selander RK, Musser JM, Caugant DA, et al. Population genetics of pathogenic bacteria. *Microb Pathogen*, 3: 1~7, 1987.
 9. Whittam TS. Genetic population structure and pathogenicity in enteric bacteria. In: Baumberg S, Young JPW, Wellington EMH Saunedrers JR eds. *Population genetics of bacteria*. Cambridge University Press, 217~245, 1997.
 10. 나진수, 강병규. 전남지역 유우 유방염의 역학적 조사. *대한수의학회지*, 15:83~91, 1975.
 11. 박청규. 젖소 유방염 유래 포도구균에 관한 연구. *대한수의학회지*, 22:15~21, 1982
 12. 윤장원. Development of multiplex PCR for toxin typing of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, E, and TSST-1. *서울대학교 수의과대학 석사학위논문*, 1998.
 13. 강호조, 최홍근, 송원근, 등. 생유유래 *Staphylococcus aureus*의 coagulase형과 enterotoxin 산생. *한국수의공중보건학회지*, 14:15~19, 1990.
 14. Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, et al. Nucleotide and deduced amino acid sequence of coagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Res*, 17:8871, 1989.
 15. IDF 148A. Milk enumeration of somatic cells. 1995.
 16. International Organization for standardization. *Milking machine installations-construction and performance*. ISO 6690 Manual. 1997.
 17. Milking Machine Manufactures Council. *Maximizing the Milk Harvest*. 1993.
 18. Roberson, JR, Fox LK, Hancock DD. Evaluation methods for differentiation of coagulase positive staphylococci. *J Clin. Microbiol*. 30:3217~3219. 1992.
 19. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene. *J. Clin Microb*, 36:1083~1089, 1998.
 20. Tsen HY, Yu GK, Hu HH. Comparison of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. *J Appl Microbial*, 82:485~493, 1997.
 21. Tonover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates. *Nippon Juigaku Zasshi*, 45:355~362, 1983.
 22. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, et al. Pulsed field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus* *J Clin Microbiol*. 33:551~555, 1995.
 23. Cookson BD, Aparicio P, Depland A, et al. Inter-centre comparison of pulsed field gel electrophoresis for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 44:179~184, 1996.
 24. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphism. *J Clin Microbiol*. 30:1642~1645, 1992.
 25. Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM, et al. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing mastitis. *Can J Vet Res*, 59:124~128, 1995.
 26. van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Review J Clin Microbiol*, 46:222-232, 1997.
 27. Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, et al. Nucleotide and deduced amino acid sequence of coagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Res*, 17:8871, 1989.

28. Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, *et al.* The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4 sequence analysis and virulence of site-specific coagulase deficient mutants. *Mol Microbiol*, 4:393~404, 1990.
29. Su C, Herbellin C, Frieze N, *et al.* Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol Infect*, 122:329~336, 1999.
30. Raimundo O, Deighton M, Capstick J, *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol*, 66:275~284, 1999.