

시베리안 호랑이의 만성설사 분변에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 항생제 감수성

나기정¹ · 이완규 · 양만표
충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated from feces of Siberian Tiger with Chronic Diarrhea

Ki-jeong Na¹, Wan-kyu Lee and Mhan-pyo Yang
College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine

Abstract : The purpose of this study was to investigate the cause of chronic diarrhea from anaerobic bacteria isolated from Siberian tiger with chronic diarrhea. Major anaerobic bacteria isolated from feces were *Clostridium perfringens* and their population was 6×10^8 cfu/g feces. Antibiotic sensitivity test against *Clostridium perfringens* was performed using 6 antibiotic drugs including colistin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, amikacin, enrofloxacin and penicillin. *Clostridium perfringens* were sensitive to amikacin, enrofloxacin and penicillin while they were resistant to colistin, gentamicin and trimethoprim/sulfamethoxazole. And we found that chronic diarrhea of Siberian tiger was treated successfully with penicillin. These results suggested that *Clostridium perfringens* may be a cause of chronic diarrhea in Siberian tiger.

Key words : *Clostridium perfringens*, tiger, diarrhea, antimicrobial sensitivity

서 론

Clostridium perfringens(*Cl. perfringens*)는 토양, 거름, 그리고 가축의 장내에 상재하는 혐기성 세균으로 잘 알려져 있으며⁷, 돼지와 염소, 그리고 소에서도 장독혈증을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 장독혈증을 일으키는 동물들의 특징은 급작스런 폐사로써 1980년대 초반까지만 해도 산업동물들에서 발생한 장독혈증에 대한 보고와 연구가 많이 이루어졌다. 최근, 10년을 전후하여 식육목 동물인 개와 고양이에서도 *Cl. perfringens*에 대한 보고 및 연구가 많이 이루어졌다. 개에서 *Cl. perfringens*에 의한 장출혈이 발생하여 폐사한 보고뿐만⁸ 아니라, 개와 고양이에서도 설사를 나타낼 때 분변속에서 *Cl. perfringens*를 분리한 결과 각각 77.9%와 65.6%를 나타냈다는 보고도 있다¹⁰.

식육목 동물로서 고양이과에 속하는 호랑이는 전세계적으로 최대 7500여 마리로 추정되고 있으며, 호랑이 보호를 위해서 세계적인 노력이 이루어지고 있다.

그 숫자가 비교적 많은 벵갈호랑이 대한 자료는 혈액학 및 혈청화학적 자료가 축적되어있지만² 시베리안 호랑이에 대한 체계적인 자료의 축적은 미흡한 상태이다. 특히, 고양이에서와 마찬가지로 *Cl. perfringens*에 의한 장독혈증성 급성 폐사가 벵갈 호랑이에서 보고되어있지만² 만성적인 설사에 대한 보고 및 연구는 전무한 상태이다.

본 연구는 만성 설사가 *Cl. perfringens*에 의한 것으로 인정된 시베리안 호랑이의 분변에서 분리한 *Cl. perfringens*에 대한 항생제 감수성 검사를 실시함으로써 그 효과를 *in vivo*에서 직접 검증하는데 목적이 있으며, 더 나아가서는 호랑이의 만성적인 설사가 *Cl. perfringens*에 의해서도 발생할 수 있음을 밝히는데 있다.

증 례

재료 및 방법

공시동물 : 만성적으로 설사를 나타내는 시베리안 호랑이의 분변에서 균을 분리하였다. 호랑이는 8년령

¹Corresponding author.

Table 1. Complete blood count in Siberian tiger with chronic diarrhea

Item	Unit	Value
RBC	$\times 10^4/\mu\text{l}$	754
WBC	$/\mu\text{l}$	14,200
Lymphocyte	%	16
Monocyte	%	1
Neutrophil	%	78
Eosinophil	%	5
Basophil	%	0
PCV	%	42
Hemoglobin	g/dl	12.6
MCV	fl	55.7
MCHC	g/dl	30

의 암컷으로 체중은 약 350 kg이었다. 만성적인 설사는 3개월 이상 neomycin, gentamicin 등을 투여하였으나 변화를 나타내지 않았었다. 채혈을 위하여 xylazine 50 mg과 ketamine 350 mg을 근육주사하여 진정을 시키고 스퀴즈케이지를 이용하여 보정하였다. 채혈된 혈액은 전혈과 혈청으로 구분하여 전혈구계산과 혈청화학검사를 실시하여 Table 1과 2의 결과를 얻었다. 설사의 원인을 감별하기 위하여 분변검사와 젤라틴 튜브법을 이용한 외분비성 췌장기능부전에 대한 검사를 실시하여 모두 음성의 결과를 얻었다. 혈액상의 검사결과는 맹갈 호랑이에서 조사된 참조값과² 비교하였을 때 약간씩의 차이는 보였으나 만성적인 설사를 유발시킬 수 있는 특별한 이상은 발견되지 않았다.

시료채취 : 청주 동물원의 호랑이로부터 채취된 분변은 혐기적인 상태로 수송하기 위하여, Brain Heart Infusion broth³(BHI, Brain heart infusion 37 g, Yeast extract 5 g, 0.1% resazurin 1 ml, 0.1% hemin 0.1 ml, Bacto agar 0.7 g/L)인 수송배지(transport medium)에 넣어, 냉장 상태로 실험실로 운반하여 *Clostridium*속 세균분리에 사용하였다.

배양 및 분리 : 실험에 사용한 배지는 *Clostridium* 선택배지인 Nagler-Neomycin³(NN, Bacto peptone 40 g, Na_2HPO_4 5 g, KH_2PO_4 1 g, NaCl 2 g, MgSO_4 0.1 g, Glucose 2 g, Agar 25 g/L) 배지를 고압멸균 후에 50% egg yolk solution 100 ml와 2% neomycin sulfate solution 10 ml를 첨가하여 사용하였다.

실험실로 운반된 BHI 수송배지의 무게를 측정하여 분변의 무게를 계산하고 회석액 A(KH_2PO_4 4.5 g,

Table 2. Serum chemistry in Siberian tiger with chronic diarrhea

Item	Unit	Value
ALT	U/L	149
AST	U/L	42
r-GT	U/L	0
Total bilirubin	mg/dl	0.64
Triglyceride	mg/dl	70.2
Uric acid	mg/dl	0.6
Glucose	mg/dl	131.4
Total protein	g/dl	8.29
Albumin	g/dl	3.58
Globulin	g/dl	4.71
A/G ratio		0.8
Alkaline phosphatase	U/L	43
Lipase	U/L	167
Amylase	U/L	1049
BUN	mg/dl	45.4
Creatinine	mg/dl	1.95
Cholesterol	mg/dl	185.3
Creatinine Kinase	U/L	392
Ca	mg/dl	9.62
P	mg/dl	5.13

Na_2HPO_4 6 g, L-cysteine HCl 0.5 g, Tween 80 0.5 g, Bacto agar 1 g/L)를³ 사용하여 10배 단계희석을 실시한 후, NN배지에 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 회석액 A 0.05 ml을 무균적으로 접종하고, 37°C에서 48시간 동안 Steel wool method⁶를 사용한 혐기배양을 실시하였다. 배양 후, NN배지에 나타난 집락 주위의 원형 백색침전인 Lecithinase 양성을 나타내는 Gram 양성의 간균을 *Clostridium perfringens*로 동정하였다(Fig 1).

항생제 감수성 검사 : 분리균주에 대한 항생제 감수성검사는 BBL-항생제 디스크(Becton Dickinson, USA)를 사용하여 Modified Kirby-Bauer method⁵에 따라 실험하였다. 분리된 균주의 colony를 백금으로 떼어내어 4 ml의 Muller Hinton broth(MHB)에 현탁시키고 0.5 McFarland standard(0.048 M BaCl_2 0.5 ml+0.18 M H_2SO_4 99.5 ml)에 해당하는 O.D(Optical Density)를 측정 후 멸균된 면봉을 균주가 현탁된 MHB에 적셔서 배지표면 전체에 균일하게 도말하였다. 건조 후 amikacin(10 μg), colistin(10 μg), erythromycin(15 μg), enrofloxacin(5 μg), gentamicin(10 μg), penicillin

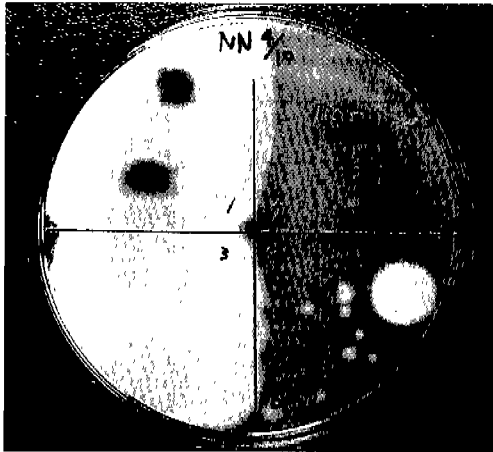


Fig 1. *Clostridium perfringens* isolated from feces of Siberian tiger with chronic diarrhea



Fig 2. Antimicrobial susceptibility test against *Clostridium perfringens*

(10 IU), tetracycline(30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole(1.25 µg/23.75 µg) 등의 항생제 디스크를 떨어 뜨리고, 37°C에서 48시간 동안 Steel wool method에 의한 혐기배양을 실시하였다. 배양 후 저해환(inhibition zone)의 지름(mm)을 측정하여 항생제 디스크의 판정기준표와 비교하고, Resistant, Intermediate, Sensitive로 구분하여 항생제 감수성을 판정하였다.

In vivo에서 항생제 적용 : *Cl. perfringens*에 대한 항생제 감수성 결과에 따라서 항생제는 penicillin을 선택하여 투약하였다. 투약한 항생제는 야생동물의 특성을 고려하여 지속형 항생제로 Penicillin G가 주성분인 타도마이오셀콤프 III(바이엘, 한국)를 5 ml씩 3일 간격으로 7회 근육주사를 하였다. 마지막 항생제를

적용할 때는 혈액채취를 하여 검사를 실시하고 분변에서 *Cl. perfringens*의 분리도 실시하였다.

결 과

***Cl. perfringens* 분리 :** 시베리안 호랑이의 분변에서 분리해낸 *Cl. perfringens*의 수는 6×10^8 cfu/g feces였다.

***Cl. perfringens*의 항생제 감수성검사 :** 항생제 감수성검사 결과 호랑이의 분변에서 분리된 *Cl. perfringens*는 Table 1에서와 같이 colistin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해서는 내성을 나타내었고, amikacin, enrofloxacin, penicillin에서는 감수성을 나타내었다. erythromycin, tetracycline에 대해

Table 3. Result of antibiotics sensitivity test for *Clostridium perfringens* isolated from the feces of Siberian tiger with chronic diarrhea.

Antibiotics (Disc potency)	Inhibition zone (mm)	Zone diameter			standard(mm)	Identification
		Resistant	Intermediate	Sensitive		
Amikacin (10 µg)	44	28 ≥	-	29 ≤	Sensitive	
Colistin (10 µg)	0	8 ≥	9-10	11 ≤	Resistant	
Erythromycin (15 µg)	20	13 ≥	14-22	23 ≤	Intermediate	
Enrofloxacin (5 µg)	28	17 ≥	18-22	22 ≤	Sensitive	
Gentamicin (10 µg)	0	12 ≥	13-14	15 ≤	Resistant	
Penicilin (10 IU)	39	28 ≥	-	29 ≤	Sensitive	
Tetracycline (30 µg)	16.5	14 ≥	15-18	19 ≤	Intermediate	
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (1.25 µg/23.75 µg)	0	13 ≥	11-15	16 ≤	Resistant	

Table 4. Complete blood count after antimicrobial treatment in Siberian tiger with chronic diarrhea

Item	Unit	Value
RBC	$\times 10^9/\mu\text{l}$	865
WBC	$/\mu\text{l}$	9,000
Lymphocyte	%	14
Monocyte	%	2
Neutrophil	%	83
Eosinophil	%	1
Basophil	%	0
PCV	%	45
Hemoglobin	g/dl	13
MCV	fl	52.0
MCHC	g/dl	28.9

서는 중등도의 감수성을 나타내었다(Fig 1, Table 3).

In vivo에서의 항생제 적용 : 항생제를 투여한 지 15일째부터는 설사증상이 사라졌으며 식욕도 정상으로 회복되었다. 항생제 적용 19일째 채혈하여 검사한 결과 백혈구수치의 감소이외는 별다른 차이는 발견되지 않았다(Table 4). 혈청화학적 검사에서도 급격한 변화는 관찰되지 않았다(Table 5).

In vivo에 항생제 투여 후 균분리 : *Cl. perfringens*에 대한 항생제 감수성 검사성적에 근거하여 항생제를 투여한 다음 세균수의 변화를 관찰하였다. 이때, *Cl. perfringens*의 수는 4×10^7 cfu/g feces로 초기의 세균수와 비교하였을 때 10배 가량 감소하였다(Fig 3).

고 찰

혈액학적 검사 및 혈청화학적 검사, 그리고 분변 검사와 체장기능의 검사를 통하여 뒷받침하고, 분변에서 *Cl. perfringens*의 분리가 이루어짐으로써 공시동물인 호랑이의 만성적인 설사가 *Cl. perfringens*에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 항생제 감수성검사를 실시하여 호랑이에서 분리된 *Cl. perfringens*에 대한 효과적인 항생제가 amikacin, enrofloxacin, penicillin 등 있었음을 확인하였으며, 이러한 결과는 개와 고양이에서 *Cl. perfringens*에 대한 항생제 감수성 검사를 실시하여 제시된 자료와도 일치하는 것이었다⁹. 특히, 항생제 감수성 검사를 통하여 *Cl. perfringens*에 대하여 효과가 있는 것으로 확인된 Penicillin을 사용하였을 경우 분변내의 *Cl. perfringens* 숫자가 감소하고 동시에 식

Table 5. Serum chemistry after antimicrobial treatment in Siberian tiger with chronic diarrhea

Item	Unit	Value
ALT	U/L	139
AST	U/L	49
r-GT	U/L	9
Total bilirubin	mg/dl	0.53
Triglyceride	mg/dl	69.6
Uric acid	mg/dl	0.6
Glucose	mg/dl	148.3
Total protein	g/dl	8.29
Albumin	g/dl	3.71
Globulin	g/dl	4.58
A/G ratio		0.8
Alkaline phosphatase	U/L	47
Lipase	U/L	216
Amylase	U/L	1120
BUN	mg/dl	49.9
Creatinine	mg/dl	1.49
Cholesterol	mg/dl	185.3
Creatinine Kinase	U/L	344
Ca	mg/dl	9.47
P	mg/dl	6.01

욕 및 설사 증상이 개선되었다. 이것은 항생제 감수성 검사의 결과를 뒷받침해주고, 호랑이에서 *Cl. perfringens*가 만성적인 설사를 일으킬 수 있다는 사실을 입증해 주는 것이다.

최근에는 개와 고양이에서 *Cl. perfringens*에 의한 설사 발생율이 높은 것으로 조사보고 되고 있다. 장독혈증을 일으키는 주된 type은 D형으로 알려져 있으며, 만성적인 설사의 경우에는 A형으로 알려져 있다⁸. 만성적인 설사에 *Cl. perfringens*가 관여되는 경우는 type A의 독소에 의해서 장관 용모의 상피세포내에 있는 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate(cAMP)가 증가됨으로써 장관내의 분비가 촉진되어 설사가 유발되는 것이다¹. 호랑이에서 분리해낸 혐기성 세균에 대한 type을 결정하기 위한 실험은 실시하지 않았지만 *Cl. perfringens*의 독소의 작용을 고려할 때 type A인 것으로 추정된다. 그러나, *Cl. perfringens* type A에 감염된 개가 출혈성 설사를 하다가 급작스런 폐사를 한 보고가² 있는 것을 감안할 때 이러한 판단은 신중해야 할 것으로 사료된다.

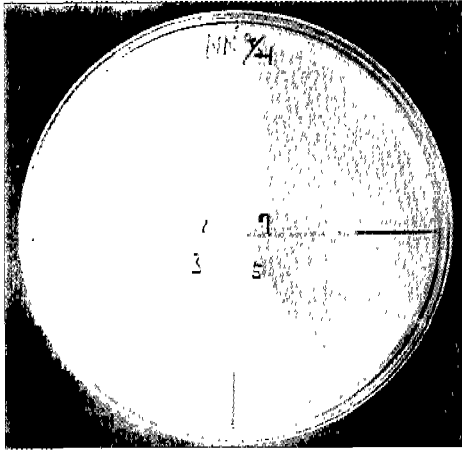


Fig 3. *Clostridium perfringens* isolated from feces of Siberian tiger after antimicrobial treatment

설사의 원인은 다양할 수 있고 미생물 감염에 의한 경우는 몇 종류가 관여하는 경우가 있다. 이런 경우에 *Cl. perfringens*의 복합 감염은 설사를 심하게 만들고 만성적인 경과를 가져온다¹⁰. 동물원에서 사육되는 호랑이는 소고기, 돼지고기, 그리고 닭고기를 주식으로 한다. 이들 음식물 중 닭고기에서 *Cl. perfringens*에 대한 공중위생학적 측면이 중요시되고 있는 점을 감안할 때 호랑이에서도 마찬가지로의 고려가 있어야 할 것이다. 개와 고양이를 대상으로 하여 분변중에서 *Cl. perfringens*를 분리해냈을 때 설사하는 동물과 하지 않는 동물에서 각각 10^4 - 10^{10} cfu/g feces와 10^4 - 10^8 cfu/g feces를 나타냈다¹⁰. 호랑이에서 만성적인 설사를 나타내는 때의 *Cl. perfringens*의 수는 6×10^8 cfu/g feces 이었고, 치료 후의 숫자는 4×10^7 cfu/g feces 이었다. *Cl. perfringens*가 $\times 10^7$ 의 비교적 높은 수에서도 임상증상이 소실되는 반면 $\times 10^8$ 에서 만성적인 설사와 식욕부진 등을 나타내었다. 사료나 동물의 생리적 환경변화에 따라 쉽게 증가할 수도 있는 *Cl. perfringens*은 동물원의 호랑이처럼 좁은 활동공간으로 인해서 스트레스가 심할 수도 있는 경우에는 각별한 주의가 필요할 것으로 예상된다.

결 론

시베리안 호랑이의 만성적인 설사의 원인을 규명하기 위하여 분변 중에서 세균분리를 실시하였다. 분리해낸 *Cl. perfringens*는 6×10^8 cfu/g feces 일때 시베

리안 호랑이에 만성적인 설사를 유발하였다. 그리고, 이 세균에 대한 항생제 감수성 시험결과 colistin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해서는 내성을 나타내었고, amikacin, enrofloxacin, penicillin에는 감수성을 나타내었다. Erythromycin, tetracycline에 대해서는 중등도의 감수성을 나타내었다

감사의 글

도움을 주신 청주동물원의 여종택 원장님과 이오형 선생님. 그리고 청주애견동물병원의 고철환 원장님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Craig EG. Gastrointestinal and intra-abdominal infections. In: Infectious diseases of the dog and cat, 1st ed. Philadelphia: Saunders. 1987: 125-145.
2. Joel DW, William JB. Felidae In: Diseases of exotic animals. 1st ed. Philadelphia: Saunders. 1983: 345-403.
3. Mitsuoka T. The world of anaerobic bacteria In: A color atlas of anaerobic bacteria, 1s ed. Tokyo: Sobun Press. 1980: 13-65.
4. Murray EF. Felidae. In: Zoo and wild animal medicine. 2nd ed. Philadelphia: Saunders. 1986: 831-841.
5. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Antimicrobial Agents. In: Clinical Veterinary Microbiology, 1st ed. London: Wolfe Publishing, 1994: 95-117.
6. Parker CA. Anaerobiosis with iron wool. Aust J Exp Biol Med Sci 1955; 33:33-38.
7. Robert EP, Cleon K. Commercial lamb fecedlot management. In: Current veterinary therapy I : Food animal practice, 1st ed. Philadelphia: Saunders. 1981: 184-198.
8. Sasaki J, Goryo M, Asahina M, Makara M, Shishido S, Okada K. Hemorrhagic enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in a dog. J Vet Med Sci 1999; 61(2):175-177.
9. Steven WD. Anaerobic infections. In: Infectious diseases of the dog and cat, 1st ed. Philadelphia: Saunders. 1987: 530-537.
10. Werdeling F, Amsberg G, Tewes S. The occurrence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in the feces of dogs and cats. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1991; 104(7):228-233.