

꽃사슴의 *Clostridium perfringens* A형에 의한 장독혈증 발생 보고

이청산¹, 한성태, 곽학구, 박경재, 현공율, 조우영, 이종인, 배유찬*, 진영화*

충청북도축산위생연구소, 국립수의과학검역원*
(접수 2002. 4. 2, 게재승인 2002. 5. 6)

Enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type A in Formosan deer

Cheong-San Lee¹, Sung-Tae Han, Hak-Koo Kwak, Kyung-Jae Park,
Gong-Yul Hyun, Woo-Young Cho, Jong-In Lee, You-Chan Bae*, Yong-Hwa Jean*

¹Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute
National Veterinary Research and Quarantine Service*
(Received 2 April 2002, accepted in revised form 6 May 2001)

Abstract

The case reports for *clostridium perfringens* type A enterotoxemia in Formosan deer have rarely been reported. This paper describes a natural case of type A enterotoxemia in farmed Formosan deer in Cheongwon-gun. A dead, male 10-month-old Formosan deer was submitted to Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, March 24, 2001 and examined. That deer was fed with assorted grain feed, oak leaves, acorn and bean curd. Grossly there was no visible external change. Despite of the carcass being examined within 12 hours of death, there was a quite degree of postmortem decomposition. There was severe hemorrhage in the serosa of abomasum and small intestine. Much blood tinged and watery contents were contained in those organs. Also there were severe swelling of spleen, some red foci in hepatic parenchyma. Microscopically there were severe congestion and hemorrhage in mucosa, submucosa, muscular layer, and serosa of abomasum and small intestine. Also spleen and pancreas showed severe congestion and hemorrhage.

There were multifocal hemorrhage with hepatic necrosis in periportal area and focal mononuclear cell deposition in sinusoid. In bacterial culture for small intestine, *Cl perfringens*

¹Corresponding author
Phone : 043-220-5611, Fax : 043-220-5619
E-mail : les3002@hanmail.net

was isolated. By toxin typing for the strain, that had α -toxin belonged to type A. In electronmicroscopy for feces, no virus particle was detected. Considering clinical signs, gross lesions, microscopic lesions, bacterial culture, and toxin typing of the isolate, this case was diagnosed as enterotoxemia by *Cl perfringens* type A.

Key words : *Clostridium perfringens*, Enterotoxemia, Formosan deer, PCR, α -toxin

서 론

옛부터 우리나라는 녹용과 사향을 영약으로 여겨 왔으며 이를 채취하기 위하여 양록업이 시작되었다. 요즘에는 국민경제의 성장으로 애완동물로 사슴을 사육하는 형태와 녹용, 녹혈 및 고기를 생산할 목적으로 사육하는 양축농가가 늘고 있으며 전업농으로서 자리를 잡아 가고 있다.

장독혈증은 1892년 처음으로 보고된 이래 소뿐만 아니라 사람과 양, 말, 돼지 등의 가축에 문제가 되고 있는 질병중 하나이다. 병원균인 *clostridium perfringens*는 혐기성, 아포형성, 그람양성 간균으로 독성주(toxogenic strains)가 A형부터 E형까지 나누어져 있으며 여기서 생산되는 독소는 알파, 베타, 엡실론, 이오타독소가 있다^{1,2)}. 알파독소는 *Cl perfringens* 다섯 가지형 모두에서 생산되며 사람에게는 가스괴저, 동물에게는 괴사성장염 및 면양의 "yellow lamb disease"를 일으킨다³⁾. *Cl perfringens* B, C형에서 생산되는 베타독소는 송아지, 면양, 자돈에서 구토, 복부통증, 혈변 등을 동반한 괴사성 장염을 일으킨다^{4,5)}. 엡실론 독소는 *Cl perfringens* B, D형에서 생산되는 독신으로 송아지, 자돈 등에서 뇌조직 괴사를 유발하므로 후구강직, 선회운동 등의 신경증상을 보인다^{6,7)}. *Cl perfringens* E형에서 생산되는 이오타독소는 송아지 및 면양의 장독혈증을 일으킨다⁸⁾.

외국 및 국내의 순록에서 *Cl perfringens* A형에 의한 장독혈증 사례는 발표되었으나 꽃사슴에서의 *Cl perfringens* A형 장독혈증 사례에 대한 보고는 드문 상태이다.

본 연구에서는 청원군 소재 사슴목장에서 산발적으로 꽃사슴의 폐사가 발생하여 이에 대한

역학조사 및 폐사 꽃사슴에 대한 질병진단을 실시한 바 *Cl perfringens* A형 장독혈증으로 판명되었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

역학조사

축사 및 운동장의 위생상태, 초지 및 사료 급여 상태, 기후, 과거 발생 상황, 동거 가축의 건강상태 등을 조사하였다.

공시동물 및 균주

2001년 3월 24일 충청북도 청원군 소재 꽃사슴 목장으로부터 질병진단을 의뢰한 10개월령, 수컷, 꽃사슴 1두에 대한 검사를 하였다.

국립수의과학검역원에서 분양 받은 *Cl perfringens* type A, B, C, D, E의 표준균주를 사용하였다.

병리조직학적 검사

일반적인 술식에 의거 부검하여 육안적 병리소견을 관찰한 다음 각종 실질장기를 채취하여 10% 중성포르말린용액으로 고정시켜 파라핀포매 후 조직 절편을 만들고 hematoxylin and eosin (H&E)염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

미생물학적 검사

부검된 꽃사슴의 소장과 비장을 혈액한천배지(Komed Co)에 배양하였다. 이 혈액배지를 37°C 24시간 혐기배양하고 집락형태, 용혈성상, 그람염색성, 균형태 등을 확인한 후 Bergely법에⁹⁾ 따라 생화학검사를 실시하였다.

PCR를 이용한 특이 유전자 검출

1) DNA 분리

분리 동정한 균주에 대한 독소형을 파악기 위하여 증합효소연쇄반응(PCR)법을 적용하였다. 국립수의과학검역원에서 분양 받은 *C. perfringens* A, B, C, D, E형을 cooked meat medium(Difco Co)에 접종하여 다음과 같이 Murray와 Thompson방법에 의하여 DNA를 추출하였다¹⁰⁾. Cooked meat medium에 24시간 증균한 후 6,000×g에서 10분간 원심 분리하여 펠렛을 TEbuffer로 2회 세척하고 이를 다시 TEbuffer 567μl로 재부유시켰다. 30μl 10% sodium dodecylsulfate(Sigma Co), 3μl proteinaseK(20mg/ml, Promega Co)를 넣은 후 37℃ 1시간 반응시켰다. 100μl 5M NaCl과 80μl CTAB(10% CTAB, 0.7M NaCl)를 혼합하여 65℃에서 10분간 반응시킨 후, 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25 : 24 : 1, Sigma Co)을 첨가하여 12,000×g(4℃)에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 수거하고, absolute ethanol(Sigma Co)을 상층액의 2~3배 첨가하여 -70℃ 1시간 정치시켰다. 12,000×g(4℃)에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 건조시킨 후 100μl의 TEbuffer로 부유시켜 4℃에 보관하면서 사용하였다.

가검체로부터 분리한 균주의 DNA 추출을 위하여 Boiling 법을 사용하였다¹¹⁾. 혈액평판 배지상에서 이중 용혈성을 보이는 집락 4~5개를 멸균 면봉으로 채취하여 멸균증류수 500μl로 부유시킨 후 12,000×g에서 5분간 원심 분리하였다. 침전물을 멸균증류수 200μl로 부유시킨 다음 100℃ 끓는 물에 10분간 담근 후 얼음상자에 20분간 정치시켜 DNA를 유리하였다. 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액 150μl을 수거하여 -20℃에 보관하면서 template DNA로 사용하였다.

2) PCR 분석

특이유전자 검출을 위해 본 실험에 사용한 primer는 Table 1에 나타낸 바와 같이 GenBank(National Institute of Health)의 자료를 참고로 TaKaRa Biomedica에 합성 의뢰하여 사용하였다. PCR mixture는 10×PCR buffer(5μl), 25mM MgCl₂(4μl), primers(100 pmol), 10mM deoxynucleoside triphosphate mixture(1μl), template DNA(100ng), Taq polymerase(1μl)를 사용하였으며, template로서 총 50μl가 되도록 멸균 증류수를 넣어 사용하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation시킨 후, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분, 94℃에서 1분씩 총 30cycles를 TaKaRa

Table 1. Nucleotide sequences of primers

Primer	Nucleotide sequence	Size(bp) of amplified products
CPA(alpha toxin)		
Forward	5'-GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG-3'	402
Reverse	5'-CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC-3'	
CPB(beta toxin)		
Forward	5'-ACTATACAGACAGATCATTCAACC-3'	236
Reverse	5'-TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC-3'	
CPE(epsilon toxin)		
Forward	5'-ACTGCAACTACTACTCATACTGTG-3'	541
Reverse	5'-CTGGTGCCCTTAATAGAAAGACTCC-3'	
CPI(iota toxin)		
Forward	5'-GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC-3'	317
Reverse	5'-GGTATATCCTCCACGCATATAGTC-3'	

Thermal Cycler MP에서 수행하였다. 1kb step ladder(Sigma Co)를 분자량 마커로 사용하였으며, PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에 10 μ l loading하여 40분간 전기 영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 증폭산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

우리나라에서 사슴의 사육환경은 완전 방사식 사육방법이 불가능하므로 철조망을 이용하여 울타리를 설치하고, 사육장내에는 사료통과 물통이 있으며 청초나 건초 급여대가 설치되어 있는 정도이다. 사료급여 형태는 사육장이 좁고 시설이 미비하여 배합사료와 나뭇잎, 야초 등을 적당히 혼합 급여하는 것이 대부분이다. 4월은 햇쑥, 칩뿌리, 버들개비 등을 주로 급여하며, 5-6월은 갈잎, 잡목순, 아카시아잎을 급여하고, 7-8월은 칩넝쿨, 갈잎, 아카시아잎, 싸리잎 그리고 11월부터 다음해 3월은 각종 건초와 콩깍지, 땅콩잎, 옥수수과 산열매 또는 수입 건초를 먹이고 있으며, 배합사료는 계절에 관계없이 급여를 하고 있는 실정이다¹²⁾.

질병진단을 의뢰한 사슴목장을 현지 방문하여 역학조사를 실시한 바, 목장의 구조는 야산을 개간하여 운동장 및 축사가 2동씩 분리되어 있고, 운동장은 배수 상태가 불량하고 농가와 50m 떨어진 곳에 위치하고 있었으며 주변의 농경지와 인접해 있었다. 급여사료는 삼양사제품 배합사료와 중국산 수입건초(떡갈잎), 도토리 비지를 급여하고 있었으며 지하수를 음수로 사용하고 있었다. 2000년도에 6~7개월령 꽃사슴 2두와 2001년 2월 초순 경 1두가 원인으로 급사하여 매몰 조치한 사례가 있었다.

장독혈증의 원인균인 *Cl perfringens* A형의 알파독소는 창상감염을 통해 사람의 가스괴저와 포유동물의 출혈성, 괴사성 장염을 일으키고 독혈증으로 급성 폐사에 이르게 하며 이 질병으로 인한 병리조건과 임상조건은 원인균이 산출하는 특이한 독소의 영향에 따라 크게 달라지고, 증상의 경과기간에 따라 병변의 정도와 범위가 개체별로 큰 변화가 있다.

본 발생예에서의 육안적 부검소견으로는 기관지점막의 암적색 발적이 관찰되었으며, 비장은 27×16cm로 종대되었고 표면에는 다수의 적색반점이 산재해 있었다(Photo 1). 간의 표면에 크기가 다양한 다수의 적색 반점이 관찰되었으며, 4위와 소장의 장막이 심하게 발적되고 내강에 혈액성 수양성 내용물로 충만되어 있었다(Photo 2).

병리조직학적 소견으로는 비장의 심한 충출혈과 4위 및 소장의 점막, 점막하직, 근층, 장막에서도 심한 충출혈이 관찰되었으며, 간의 다병소성 괴사와 출혈, 단핵세포의 침윤이 관찰되었다(Photo 3, 4). 간의 괴사와 출혈은 *Cl perfringens* A형독소에 의한 것으로 사료된다. *Cl perfringens* A형에 감염된 갓 태어난 말에서 백혈구의 침윤이 없이 고유층, 점막하직과 장막하의 심한 충출혈과 출혈이 관찰되었다는 보고 내용과 본 연구에서 확인된 병변과는 매우 유사함을 확인하였다¹³⁾. 반면 본 연구에서 관찰된 병변은 순록의 *Cl perfringens* A형 장독혈증 예에서 관찰된 급성세뇨관 신증, 피질의 광범위한 출혈, 심근의 변성과 출혈과는 상이하였다¹⁴⁾. 이는 *Cl perfringens* A형이 사슴의 품종에 따라 다양한 병변을 유발하기 때문인 것으로 사료된다.

소장에 대한 세균분리검사 결과 *Cl perfringens*가 분리되었으며, 분리균은 혈액평판 배지상에서 이중 용혈을 보였고 그림양성 간균이었다. 생화학검사에서 운동성이 없었고 lecithinase 생산 양성, salicin 분해 음성, raffinose 분해 양성을 보였다.

분리동정한 균주에 대한 독소형을 파악키 위하여 PCR을 실시한 결과 402bp에서 특이적인 증폭산물이 나타나 분리 균주가 *Cl perfringens* A형임을 확인하였다(Photo 5).

결 론

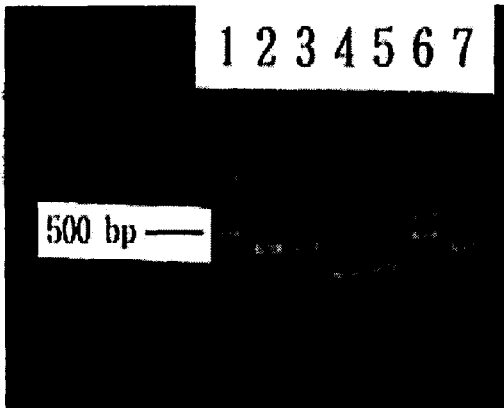
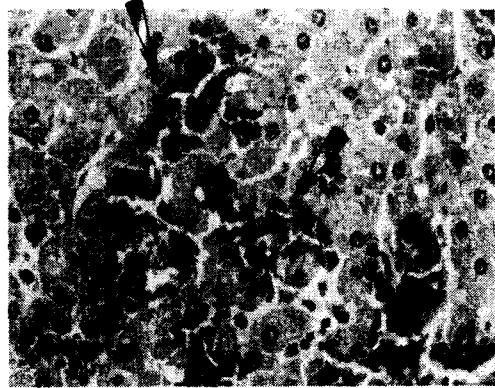
꽃사슴에서 *Cl perfringens* A형에 의한 장독혈증예에 대한 보고는 매우 드물다. 이 논문은 국내산 꽃사슴에서 발생한 *Cl perfringens* A형의 장독혈증 예에 대한 보고이다.

이 사슴은 배합사료, 떡갈잎, 도토리비지로 사육되었으며 외관적으로 특이한 소견은 없었으며, 사후 12시간 이내에 부검하였으나 사후 변화가 상당히 진행되어 있었다. 부검소견은 4위와 소장점막에 심한 출혈이 있었고 다량의 혈액양 수양성 내용물이 이들 장기 내강에 들어 있었다. 그밖에 비장의 심한 종대와 간실질에 적색 반점이 수개소 관찰되었다. 병리조직소견으로는 4위와 소장의 점막, 점막하직, 근층과 장막층에 심한 출혈과 출혈이 관찰되었다. 또한 간문맥 부위에 다병소성 괴사와 출혈이 관찰되었으며, 동양모세혈관에 국소적으로 단핵세포침윤이 있었다. 소장의 세균분리 검사에서 *Cl perfringens*가 분리되었고, PCR을 이용한 독소검사 결과 알파 독소를 검출함으로써 이균은 *Cl perfringens* type A임을 확인하였다. 분변의 전자현미경 검사에서 바이러스 입자는 관찰되지 않았다.

임상증상, 육안병변, 조직병변, 세균분리 및 분리균에 대한 독소검사를 종합한 결과 *Cl perfringens* A형에 의한 장독혈증으로 진단되었다.

Legends for Photos

- Photo 1. Severe swelling of spleen. Red foci on the surface.
- Photo 2. Reddening of small intestine.
- Photo 3. Congestion, hemorrhage in abomasum.
- Photo 4. Hepatic hemorrhage and necrosis.
- Photo 5. PCR for *Clostridium perfringens* isolate.
- 1 : Marker(1000bp)
- 2 : *Cl perfringens* type A(isolate). alphatoxin(402bp)
- 3 : *Cl perfringens* type A(control). alphatoxin(402bp)
- 4 : *Cl perfringens* type B. alphatoxin (402bp), beta(236bp), epsilon(541bp)
- 5 : *Cl perfringens* type C. alphatoxin (402bp), beta(236bp)
- 6 : *Cl perfringens* type D. alphatoxin (402bp), epsilon(541bp)
- 7 : *Cl perfringens* type E. alphatoxin (402bp), iota(317bp)



참고문헌

1. 이방환. 1983. 최신 가축임상진료학. 가림인쇄소, 전주 : 598~603.
2. Hatheway CL. 1990. Toxigenic *clostridia*. *Clin Microbiol Rev* 3 : 66~98.
3. Alouf J E. 1988. Purification of alphatoxin from *Clostridium perfringens*. *Methods Enzymol* 165 : 91~94.
4. Taylor DN. 1987. Enteritis necroticans among Khmer children at an evacuation site in Thailand. *Lancet ii* : 496~500.
5. Lawrence G. 1984. An affinity technique for the isolation of *Clostridium perfringens* type C for man and pigs in Papua New Guinea. *J Appl Bacteriol* 57 : 333~338.
6. Batty I, Glenny AT. 1947. Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxin and antitoxins. *BRJ EXP Pathol* 28 : 110~126.
7. Kelly DC. 1992. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60 : 102~110.
8. Lawrence G. 1980. Experimental necrotizing enteritis due to *Clostridium welchii* type E in guinea pig. *Br J Exp Pathol* 61 : 261~271.
9. George WL, Finegold SM. 1986. Genus *Clostridium*, Bergey's manual of systemic bacteriology. The Williams & Wilkins Co : 1141~1182.
10. Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8 : 4321~4325.
11. Strockbine NA. 1993. PCR detection of heat-stable, heat-labile and shiga like toxin genes in *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*. Washing DC : 333~341.
12. 김찬규. 1995. 사슴의 사양관리. 오성출판사, 서울 : 188~191.
13. Jubb KVF, Palmer PC. 1993. Pathology of Domestic Animals. Academic Press 2 : 238~247.
14. Kummeneje K, Bakken G. 1972. *Clostridium perfringens* enterotoxemia in Reindeer. *Nord Vet Med* 25 : 196~202.