

## 소와 돼지의 도체에서 *Clostridium perfringens*의 분리와 특성

채희선<sup>1</sup>, 김연하, 김주영, 김종화, 김규현, 최태석, 신방우, 이덕주, 이정학

서울특별시 보건환경연구원  
(접수 2006. 4. 12, 게재승인 2006. 6. 2.)

### Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* on bovine and porcine carcass

Hee-Sun Chae<sup>1</sup>, Youn-Ha Kim, Ju-Young Kim, Jong-Hwa Kim, Gyu-Hyeon Kim, Tae-Seok Choi, Bang-Woo Shin, Duck-Joo Lee, Jung-Hark Lee

Seoul Metropolitan Health & Environment Research Institute, Seoul, 137-734, Korea  
(Received 12 April 2006, accepted in revised from 2 June 2006)

#### Abstract

A total of 1,848 samples was taken from bovine and porcine from January 2003 to November 2005. They were examined for the presence of *Clostridium perfringens*. The properties of the isolates were characterized for Gram staining, biochemical features and enterotoxin production. Forty-one strains (2.2%) of *C. perfringens* were isolated from the 1,848 bovine and porcine carcass using selective media. 30 (3.2%) *C. perfringens* were isolated from the 925 of bovine carcasses, and 11 (1.2%) were isolated from the 923 of porcine carcasses. In TSC agar, all isolates showed lecithinase activity. The isolation rate was higher in spring and summer than in autumn and winter. Among 41 isolates, only 1 isolate detected the *cpe* gene in PCR. The PCR amplified band was observed 233 bp.

**Key word** : *Clostridium perfringens*, enterotoxin, PCR, *cpe* gene.

---

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : 02-570-3437, Fax : 02-570-3206

E-mail : heedoogy@hanmail.net

## 서 론

*Clostridium perfringens*는 1892년 처음 *Bacillus aerogenes capsulatus*로 처음 보고된 이래로 사람과 동물에서 질병을 일으키는 세균으로 분류되었다<sup>1)</sup>. 이 세균은 그람양성, 혐기성의 간균으로 아포를 형성하며, 토양과 동물의 위장관에 광범위하게 위치하고 있다. 또한 강력한 exotoxin들을 생산하는 능력을 가지고 있어서 가축과 사람에서 조직 독성과 위장관 질병의 중요한 원인으로 확인되었다<sup>2,3)</sup>.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  그리고  $\iota$  toxin은 *C perfringens*가 생성하는 주요 독소이며, 이 독소는 여러 가지의 세포외독소와 더불어서 세균의 병원성과 밀접하게 연관되어 있다<sup>4,5)</sup>.

*C perfringens*의 형별은 A - E까지 5 type으로 분류한다. 형별을 분류하는 가장 보편적인 방법은  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$  라는 4종의 독소를 생성하는 능력에 따라 동정하는 것이다<sup>1,6)</sup>. 그 중 사람에서 식중독을 일으키는 것은 주로 A형 균이며, 보통 1g당  $10^5$  cfu 이상의 생균을 섭취하거나, 장관내에서 enterotoxin을 생성하여 식중독을 야기한다<sup>6,7)</sup>. Enterotoxin을 검출하는 방법은 면역학적 기법으로서 reversed passive latex agglutination assay (RPLA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 등이 있으며, 분자생물학적 기법으로는 polymerase chain reaction (PCR), amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis 등이 있다<sup>1,8)</sup>.

본 연구에서는 축산물의 위생관리 및 안전성을 보다 향상시키고 관내 도축되는 소와 돼지의 도체표면으로부터 *C perfringens*를 검색, 조사하여 균 오염도의 기초자료로 활용하고자 하였고, 분리주를 대상으로 PCR을 이용하여 enterotoxin을 생성하는 *cpe* gene을 검출하였다.

## 재료 및 방법

### 시료채취

2003년 1월부터 2005년 11월까지 서울시 소재 도축장에서 소와 돼지 도체 925건 및 923건을 대상으로 도체표면을 easy swab (Komed, Korea)으로 swabing하여 균 분리 재료로 사용하였다.

### 균분리

증균배양 : Easy swab으로 채취한 검사시료액 1 ml를 10 ml의 cooked meat medium의 아랫부분에 접종하여 37 °C에서 18 - 20 시간 혐기 배양하였다.

분리배양 : 증균된 균액을 50% egg yolk TSC agar에 도말하여 37°C에서 18 - 24시간 혐기 배양하고, H<sub>2</sub>S를 생성하여 흑색을 나타내며 lecithinase를 분해하는 집락을 선택하여 blood agar에 도말하였다. 혈액배지상에서 용혈능을 확인한 집락에 대하여 생화학적 성상 검사를 실시하였다.

### 생화학적 성상검사

TSC agar (Merck, Germany)에서 순수 분리된 집락을 Blood agar (Merck, Germany)에 계대하고 단독집락을 채취하여 suspension medium (Biomerieux, France)에 McFarland No. 3 탁도로 조정하였다. 이 현탁액을 API 20A 키트 (Biomerieux, France)에 접종하고 37°C에서 24시간 혐기배양한 후 판독하였다. 이 과정을 통해 glucose 외 19종에 대한 분리균의 당분해능과 효소활성능 그리고 기질생산능 등에 대한 생화학적 성상을 검사하였다.

### PCR을 이용한 enterotoxin 검출

*C perfringens*의 enterotoxin을 encoding하는 *cpe* gene을 검출하기 위하여 바이오니아사 (Chungbuk, Korea)에 의뢰하여 primer *cpe1* (5' - GGAGATGGTTG - GATATTAGG - 3')와 *cpe2* (5' - GGACCA -

GCAGTTGTAGATA-3')을 제작하였다<sup>9,10)</sup>. 표준균주는 *C perfringens* ATCC 12912를 사용하였으며, DNA는 G-spin genomic DNA Extraction Kit (Intron, Korea)를 이용하여 추출하였다.

PCR 반응조건은 다음과 같이 10X PCR buffer, 2.5 U Taq polymerase (Takara, Japan), 1  $\mu$ M의 각각 primer, 1  $\mu$ l의 template DNA를 넣어 총 20  $\mu$ l가 되게 조정하였다. 94  $^{\circ}$ C에서 2분간 pre-denaturation, 94  $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 55  $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72  $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 과정을 30 cycles 실시하였으며 마지막 extension 과정을 10분간 실시하였다. PCR product는 3% agarose gel에서 100 V, 30 분간 전기영동 후 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)로 염색하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

*C perfringens* type A에 의한 식중독은 살모넬라에 이어 유럽과 미국에서 가장 흔한 식중독에 하나로 알려져 있다. 이 균에 의한 식중독의 원인물질은 *cpe* (*C perfringens* enterotoxin)로 불리는 이열성 (heat labile) 장독소이며, *C perfringens*는 sporulation 동안에 enterotoxin을 다량 생산하여 식중독을 일으킨다. 대부분의 균주는 enterotoxin을 생성하지 않는 것으로 알려져 있으나, 분리주 중 6%만이 enterotoxin을 가지고 있다고 한다.

본 연구에서는 2003년 1월부터 2005년 11월까지 서울시 도축장에서 도축되는 소와 돼지의 도체표면에서 시료를 채취하여 *C perfringens*의 분리를 시도하였다. 총 1,848두 중 41주 (2.2%)를 분리하였으며, 이 분리주에 대하여 그람염색상, 생화학적 특성 그리고 enterotoxin 유전자의 유무를 확인하였다. 소 도체에서는 925건 중 30건 (3.2%)가 검출되었으며 돼지 도체에서는 923건 중 11건 (1.2%)이 검출되어 소 도체에서 돼지 도체에서보다 검출률이 2.6배 높게 검출되었으며

(Table 1).

Table 1. Isolation of *Clostridium perfringens* from bovine and porcine carcass

Source	No. of Samples	No. of isolates	Rate (%)
Bovine	925	30	3.2
Porcine	923	11	1.2
Total	1,848	41	2.2

이러한 검출률의 차이는 Bemier et al<sup>11)</sup>이 균의 배양조건 특성상 *C perfringens*가 아데닌과 우라실의 풍부한 소고기와 닭고기에서 더 발육이 잘된다는 보고와 일치하는 것이다. 우리나라에서 *C perfringens*의 분리보고는 장독혈증에 이환된 돼지에서 66두 중 14두 (21.2%), 장독혈증이 걸린 소에서 9두 3두 (33.3%)가 분리되어 분리율이 본 조사에서보다 높게 나타났으나<sup>12)</sup>, 이는 건강한 소와 돼지의 도체표면을 시료로 하여 검사하였기 때문에 분리율이 상대적으로 낮게 나타났다고 사료된다.

계절별 분리된 분포를 살펴보면 전체 분리주 중 59%가 여름철에 검출되었으며, 24%는 봄에 검출되었고, 가을과 겨울보다 더 높게 나타났다 (Fig 1). 월별 그래프를 살펴보면 4월과 8월에 분리가 많이 되었다는 것을 확인할 수 있다 (Fig 2).

분리주 모두 Gram 염색에서 spore를 형성하지 않은 보라색의 간균으로 관찰되었으며, 난황을 첨가한 TSC agar에서 H<sub>2</sub>S를 생성하여 검은색을 나타내며, lecithinase 양양성반응을 나타냈다 (Fig 3). Gubash는 *C perfringens*가 공통적으로 가지고 있는 독소  $\alpha$ 라 불리는 lecithinase C가 난황이 첨가된 배지에서 난황을 분해하여 유백색으로 나타나게 함으로써 균의 분리동정을 용이하게 할 수 있다고 한다<sup>13)</sup>.

분리주에 대하여 API 20A kit (Biomereux, France)를 이용한 생화학 검사 결과 gelatin, glucose, lactose, maltose를 분해하는 전형적인 *C perfringens*임을 확인하였다.

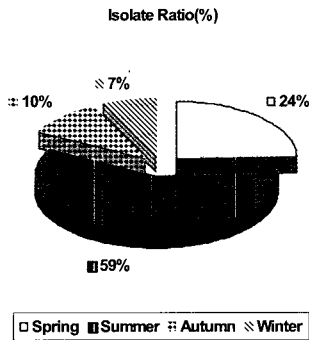


Fig 1. Ratio of *C perfringens* isolates according to seasons

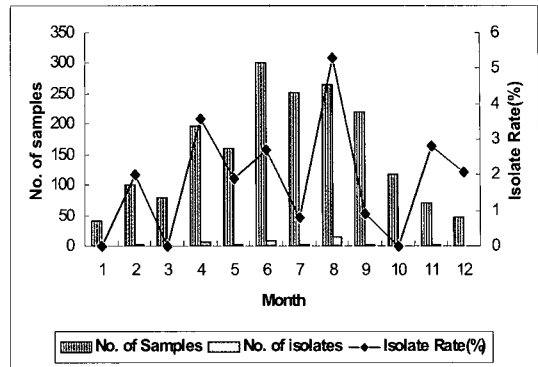


Fig 2. Isolation rate of *C perfringens* according to months

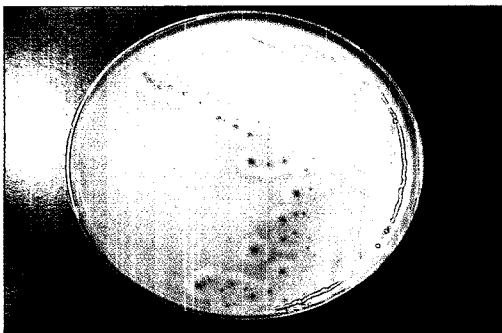


Fig 3. Typical colonies of *C perfringens* isolate. Characteristic lecithinase activity and H<sub>2</sub>S production are noted on TSC agar after a 24-hour incubation.

*C perfringens*의 enterotoxin은 35kDa의 단백질로 소장상피세포의 receptor에 직접 결합하여 병원성을 나타낸다고 한다<sup>1)</sup>.

Lukinmaa et al<sup>14)</sup>은 설사환자에서 분리한 *C perfringens*의 균주에서 47주 중 33 (70.2%)주가 enterotoxin을 가지고 있다고 보고하여, 실제로 enterotoxin이 *C perfringens*의 병원성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 기존에는 *C perfringens*의 enterotoxin의 검출법이 *in vivo*에서 독소중화시험을 하거나, RPLA, ELISA 등으로 진단하였으나, 경제적, 시간적으로 많은 노력이 필요하며, 미량의 독소 생성시 판단이 불가능하여 PCR을 이용한

방법이 널리 이용되고 있다<sup>3, 14-16)</sup>. 분리주 41주에 대하여 PCR을 이용한 enterotoxin gene검출 결과 1건(4.3%)만이 233bp에서 밴드가 확인되었다. Enterotoxin gene의 검출률은 다른 문헌상에 0-8%로 보고된바 있으며, 대부분의 균주가 *cpe* gene을 가지고 있지 않기 때문에 식중독의 원인이 되지 않는다고 한다<sup>7)</sup>.

국내에서의 *C perfringens*의 enterotoxin에 의한 식중독과 분리율에 관한 연구는 거의 이루어 지지 않고 있으며, 그 증상이 경미하고, 검사방법이 까다롭기 때문에 발생보고가 많지 않다. 그러나 근래 우리나라의 식생활이 육류 위주의 식생활과 학교급식 같은 단체급식이 증가하는 시점에서 이 균에 의한 식중독의 발생 가능성을 배재할 수 없다. 특히 육류식품에 오염되어 식중독을 일으키는 *C perfringens*에 의한 식중독이 흔할 것으로 예상되어 돼지나 소의 도체표면에서의 오염도 조사는 의미가 클 것으로 여겨진다. 비록 본 연구에서 분리주가 병원성을 일으키는 enterotoxin의 검출률이 낮았지만 앞으로 지속적인 분리와 감시가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

2003년 1월부터 2005년 11월까지 서울시

도축장에서 도축되는 소와 돼지의 도체표면에서 시료를 채취하여 *C. perfringens*의 분리를 시도하였고, 분리주에 대하여 그람염색상, 생화학적 특성 그리고 enterotoxin 유전자의 유무를 확인하였다.

총 1,848건 중 41주 (2.2%)를 분리하였으며, 소 도체에서는 925건 중 30건 (3.2%)가 검출되었으며 돼지 도체에서는 923건 중 11건 (1.2%)이 검출되었다. 계절별 분리율을 보면 봄과 여름에서 24.0%와 59.0%가 검출되어 가을과 겨울보다 더 높게 나타났다. 월별로는 4월과 8월에 분리가 많이 되었다. 분리주 모두 난황을 첨가한 TSC agar에서 H<sub>2</sub>S를 생성하고, lecithinase 양성반응을 나타냈으며, API 20A kit를 이용한 생화학 검사결과 gelatin, glucose, lactose, maltose를 분해하는 전형적인 *C. perfringens*임을 확인하였다.

PCR을 이용한 *cpe* enterotoxin gene 검출 결과 분리주 41주 중 1주 (4.3%)만이 233 bp에서 밴드가 확인되었다.

## 참 고 문 헌

- Hatheway CL. 1990. Toxigenic Clostridia. *Clin Microbiol Rev* 3 : 66-98.
- Waters M, Savoie A, Garmory HS, et al. 2003. Genotyping and phenotyping of beta 2 - toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J Clin Microbiol* 41 : 3584- 3591.
- Wen Q, Miyamoto K, McClane BA. 2003. Development of a duplex PCR genotyping assay for distinguishing *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal enterotoxin (*cpe*) genes from those carrying plasmid-borne enterotoxin (*cpe*) genes. *J Clin Microbiol* 41 : 1494- 1498.
- Rood JI, Cole ST. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev* 55 (4) : 621-648.
- 정일권, 이경원, 이계호 등. 1998. 장독소 생성 A형 *Clostridium perfringens*의 국내분리. *대한미생물학회지* 33 : 49-54.
- Smith DS. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Rev Infect Dis* 1:254-260.
- 박경운, 이상운, 유한상 등. 1996. 닭에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 독소형. *대한수의학회지* 36 : 829-837.
- 유상렬, 김상범. 2000. *Clostridium perfringens* 감염. *감염병발생정보*. 7월.
- Shauna GS, Robert JC, Mahfuzur RS. et al. 2001. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North america. *J Clin Microbiol* 39 : 883-888.
- Meer RR, Songer JG. 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *AJVR* 58 : 702-705.
- Bermier G, Filion R. 1971. Necrotic enteritis in broiler chickens. *JAVMA* 158 : 1896-1897.
- 정희곤. 1997. 닭의 괴사성장염, 새끼돼지 및 소의 장독혈증에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 S-R 변이와 항균요법제의 감수성. *한국식품영양학회지* 10 : 166-173.
- Gubash SM. 1991. Improved egg-yolk agar plate medium for the detection of clostridial phospholipase C activity. *Res Microbiol* 142 : 87- 93.
- Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. 2002. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in

- Finland from 1984 to 1999. *Appl Environ Microbiol* 68 : 3744-3749.
15. Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, et al. 2001. PCR detection and prevalence of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta$  2-,  $\epsilon$ -, and  $\iota$ -enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet Microbiol* 82 : 39-43.
16. Songer JG, Meer RR. 1996. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobes* 2 : 197-203.