

닭에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 독소형

박경윤 · 이상운* · 유한상* · 예재길

바이엘 코리아(주)
농촌진흥청 수의과학연구소*
(1996년 5월 2일 접수)

Toxigenic type of *Clostridium perfringens* isolated from chicken in Korea

Kyoung-yoon Park, Sang-un Lee*, Han-sang Yoo*, Jae-gil Yeh

Bayer Korea Ltd, Seoul, 157-200, Korea,
Department of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research Institute, RDA,
Anyang, 430-016, Korea*

(Received May 2, 1996)

Abstract : *Clostridium perfringens* has been identified as a causative organism in necrotic enteritis in chicken. The bacterium has been classified into five toxigenic types (A through E) based on the pattern of the production of major lethal toxins. Seroneutralization with mice or guinea pigs usually has been used to type the organism. Of the types, types A and C of the bacterium had been recognized as the major pathogenic types in chicken. In this experiment, we isolated nine field strains of *C perfringens* from chicken showing necrotic enteritis in clinical symptoms and pathologic findings and identified by biochemical tests. In order to type the organism, a multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used with primers on major lethal toxin genes instead of seroneutralization. Amplification of only a toxin gene with the PCR suggested that the disease in chicken was due to type A of *C perfringens* in Korea. Furthermore, the PCR method can be replaced with seroneutralization to type *C perfringens* in future.

Key words : *Clostridium perfringens*, chicken, toxigenic types, PCR.

서 론

닭의 괴사성 장염은 *Clostridium perfringens*가 그 원인체이며 1961년 최초보고된 이후 전세계 대부분의 지역에서 발병이 보고되고 있다¹. *C perfringens*는 그람양성의

혐기성 간균으로 일부는 아포를 형성하여 일반적인 기후조건이나 소독제에 저항성을 가진다². *C perfringens*는 여러 종류의 세포의 독소생산에 의해 병원성을 나타내며 그중 α , β , ϵ , 그리고 ι 의 4개 독소는 주요 치사독소로 분류되어 이들의 생산양상에 따라 A에서 E까지 5개의 독소형으로 나눌 수 있다^{2,3}. 닭의 괴사성 장염은 주로 A

Address reprint requests to Dr. Han-sang Yoo, Department of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang, 430-016, Republic of Korea.

형과 C형에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며, A형의 경우 토양, 먼지 등 주변환경에 산재하고, 건강한 조류의 장관내에도 정상적으로 존재하는 것으로 알려져 있다¹.

*C. perfringens*는 숙주 동물이나 분포지역에 따라 병원성을 나타내는 독소형이 차이가 나는 것으로 알려져 있다⁴. 따라서 병원성을 나타내는 *C. perfringens*의 독소형에 대한 정확한 조사는 지역의 실정에 맞는 예방대책을 수립하는데 필수적이다. *C. perfringens*의 독소형은 기존에는 마우스나 기니피크를 이용한 독소중화시험에 의해 결정되었으며⁵, 이는 많은 수의 동물과 각각의 독소에 대한 특이중화항체가 있어야만 하고 장기간을 요하는 단점이 있었다⁶. 그러나 최근에는 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 독소형을 결정하는 연구가 진행되어 왔으며⁶, PCR을 이용할 경우 독소중화시험보다 신속하고 정확하게 독소형을 결정할 수 있다.

국내에서 *C. perfringens*는 닭 뿐만아니라 소나 돼지에서도 장독혈증이나 출혈성 장염을 일으키기 때문에 계속적인 연구가 진행되었으며⁷⁻⁹, 이들에 대한 독소형은 모두 마우스를 이용한 중화항체검사에 의해 독소형을 결정하였다. 박 등¹⁰은 최근에 국내에서 괴사성 장염발병 계균으로부터 *C. perfringens*를 분리하여 생화학적 특성, 항균제에 대한 감수성 검사와 함께 괴사성 장염의 육안 병변 및 조직학적 병변과 계균별 발생양상을 보고한 바 있다. 그러나 주요한 역학자료중의 하나인 독소형에 대한 보고는 없었다. 본 실험에서는 괴사성 장염이 발생한 계균으로부터 *C. perfringens*를 분리 동정하고 발병 개체에서의 육안적 병변조건 및 조직학적 병변을 조사하였으며, PCR 기법을 이용하여 분리주들의 독소형 조사법을 확립하였고 야외분리주에 적용하였다.

재료 및 방법

가검재료 : 1992년부터 1995년까지 바이엘 동물의약 연구소에 의뢰된 닭 가검물중에서 괴사성 장염에 의해 폐사된 닭으로부터 분리된 *Clostridium perfringens* 9주에 대하여 조사하였다.

표준균주 : 본 실험에 사용된 표준균주는 미국 NADC (National animal disease center, ames, iowa, USA) 에서 분양받아 수의과학연구소에 보관중인 *C. perfringens* A, B, C, D 및 E형을 표준균주로 사용하였다.

세균분리 : 발병 계균에서 괴사성 장염병변을 보이는 개체의 장내용물과 간 조직을 멸균면봉을 이용하여 채취한 후 면양혈액평판배지에 도말한 다음 gas pak (BBL) 과 함께 candle jar에 넣어 37℃, 24시간동안 혐기 배양하였다. 특징적인 이중 용혈대를 보이는 세균 집락수가 우세하게 많거나 단일 집락으로 나타나는 혈액배지로부터 하나의 집락을 따서, 이를 순수배양하고 Hogh의 방법¹¹에 따라 litmus milk 의 stormy fermentation, lecithinase 생성능, reverse CAMP test, 운동성, indole 및 urease 생성능, glucose를 비롯한 당분해능 등 생화학적 성장검사를 실시하여 동정하였다.

병리학적 검사 : 괴사성 장염의 소견을 보인 개체의 간장과 장관을 10% 인산완충 포르말린에 고정한 다음, 절편을 만들어 조직처리하고 파라핀포매과정을 거쳐 4µm 두께로 조직표본을 만든후 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

DNA 분리 : *C. perfringens*의 표준균주와 야외분리균주로부터 Murray와 Thomson¹³의 방법에 따라 DNA를 분리하였다. 즉, 균주를 1% sodium thioglycollate가 첨가된 Brain heart infusion(Difco) 배지에 24시간 혐기배양하여 원심, 집균한 후 침전균체에 10% SDS와 Proteinase K (20mg/ml in DW)를 가하여 37℃, 1시간 처리하였으며, 5M NaCl와 CTAB/NaCl(10% CTAB in 0.7M NaCl)를 가하여 65℃에서 10분간 반응시켰다. Phenol 정제과정을 통해 단백질을 제거하고 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시켰으며, 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 진공 건조시킨 다음, TE buffer로 녹여 GeneQuant RNA/DNA Calculator(Pharmacia Biotech)로 정량하여 -20℃에 보관하면서 실험에 이용하였다.

Polymerase chain reaction : *C. perfringens*의 α , β , ϵ , 그리고 1독소 유전자에 대한 특이 primer는 Genebank[®]를 조사하여 이들 독소 유전자의 염기서열을 바탕으로 작성하였으며 Expedite 8905 (Perseptive biosystems)를 이용하여 합성하였다 (Table 1). 각각의 독소에 대한 Genebank[®] number는 다음과 같다. alpha-toxin(*plc*) gene (CPPLCG; X17300), beta-toxin gene (CLOTO X BETA; L13198), epsilon-toxin (*etxD*) gene (CLOET X DA; M95206), iota toxin gene (CPITO X IAB; X73562). 각 독소 유전자를 증폭시키기 위한 PCR 반응조건은 다음과 같다. 10× PCR buffer (100mM Tris/HCl, 500mM KCl, pH 8.3) 5µl, 25mM MgCl₂ 4µl, 10mM dNTP 1µl, primer 각 100pmol 그

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this experiment

Primers	Nucleotide sequences of primers	Size of amplified products
CPA (<i>a</i> toxin)		
forward	5'-GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG-3'	402bp
reverse	5'-CATGIAGTCATCTGTTCCAGCATC-3'	
CPB (β toxin)		
forward	5'-ACTATACAGACAGATCATTCAACC-3'	236bp
reverse	5'-TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC-3'	
CPE (<i>e</i> toxin)		
forward	5'-ACTGCAACTACTACTACATACTGTG-3'	541bp
reverse	5'-CTGGTGCCTTAATAGAAAGACTCC-3'	
CPI (<i>t</i> toxin)		
forward	5'-GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC-3'	317 bp
reverse	5'-GGTATATCCTCCACGCATATAGTC-3'	

리고 추출한 DNA 100ng을 넣은 후 최종량 49 μ l가 되도록 증류수를 넣고 mineral oil (Sigma Co)을 점적하여 5분간 끓는 물에 담근 후 가볍게 원심하고 Taq polymerase (5U/ l, BRL) 희석액 (2U/ μ l) 1 μ l를 넣고 PCR을 실시하였다. 반응온도와 시간은 최초 denaturation을 94 $^{\circ}$ C, 5분간 실시한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복수행하고 마지막 cycle에 extension을 72 $^{\circ}$ C, 5분간 실시하였다. PCR 증폭이 끝난후 Ethidium bromide이 첨가된 1.5% agarose gel에 PCR산물 10 μ l를 loading하여 100 V, 1시간 전기영동한 후, UV light를 조사하여 증폭산물의 크기를 확인하였고, 증폭된 유전자의 identity는 TA cloning system (Invitrogen Co)과 Sequenase Version 2.0 kit (United States Biochemical Co)을 이용하여 각각의 독소 유전자에 대해 증폭된 PCR fragment의 염기서열 분석을 통하여 확인하였다.

결 과

임상증상 및 균 분리동정 : 괴사성 장염발생 계군에서는 갑작스런 원기소실과 함께 식욕을 상실하고 움직이기를 싫어하며, 깃털이 거칠어지고 혈액 섞인 설사변을 보이는 등의 임상증상과 수 시간내 폐사되는 개체들을 관찰할 수 있었다. 증상발현개체나 폐사로부터 균을 분

리하였으며, 이들 분리주들은 그람 양성 간균이고 면양혈액배지상에서 특징적인 이중용혈상을 보이며 litmus milk의 stormy fermentation, lecithinase 양성, reverse CAMP test 양성, 비운동성, Indole 음성, Urease 음성, 당분해능 검사에서 glucose, lactose, galactose 분해능을 보이는 성상을 나타내는 균주들을 표준균주와 비교하여 *C perfringens*로 동정하였다.

육안소견 및 조직학적병변 : 괴사성 장염으로 폐사된 닭은 장출혈과 함께 혈액성 삼출물이 차 있거나 (Fig 1), 두터운 위막이 점막면에 형성되어 있었다. 간은 대부분 암적색으로 발적되어 있거나 황갈색조로 변색되어 있었으며 (Fig 2), 만성으로 경과한 개체들에서는 한계가 분명한 괴사부위가 관찰되었다. 슬라이드 글라스에 간 단면을 직접도말하여 그람 염색한 후 현미경으로 관찰하였을 때 많은 수의 그람양성 간균체를 볼 수 있었다 (Fig 3). 소장은 대부분의 용모가 괴사 탈락되었으며 괴사된 용모의 장막면에는 무수히 많은 간균이 부착되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 4).

독소형 분석 : 표준균주와 야외분리균주 9주에 대하여 CPA, CPB, CPE와 CPI 4쌍의 primer을 이용하여 multiplex PCR을 실시한 결과, *C perfringens* 표준균주 A형과 C형에서는 각각 예상대로 A형에서는 α 독소 유전자에 해당하는 증폭산물, C형에서는 α 독소와 β 독소 유전자에 해당하는 증폭산물을 관찰할 수 있었으며, 야외분리균주 9주에서는 모두 α 독소 유전자에 해당하는 402bp 크기의 증폭산물만이 관찰되어 A형으로 판정하였다 (Fig 5). PCR 증폭산물이 원하는 독소의 유전자인지를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 실시한 후 이미 보고된 이들 유전자의 염기서열과 비교함으로써 증폭된 독소유전자는 α 독소와 β 독소 유전자임을 확인하였다.

고 찰

닭의 괴사성 장염은 주로 2주령부터 6개월령사이의 계군에서 발생보고되고 있으며 특히 평사에서 사육하는 2-5주령의 유계 계군에서 발생이 많은데¹⁴⁻¹⁸ 이는 분변을 통한 균의 다량배출로 인하여 동거감염이 쉽게 일어나기 때문으로 추측되고 있다. 본 질병은 오염된 사료¹⁹,²⁰나 깔집²¹이 주요한 오염원으로 작용하는 것으로 밝혀져 있으며, *C perfringens*는 정상적인 닭의 장관 내에서도 분리되지만, 여러 요인에 의해서 장점막이 손상을 입었

을 때 급격히 증식하게 되고 이에 따라 과량의 독소를 생산하여 피사성 장염을 유발하는 것으로 알려져 있다. *C. perfringens*의 독소형은 균이나 집락의 형태, 생화학적 특성, 지방산이나 유기산에 대한 gas-liquid chromatographic analysis 등의 방법에 의해서는 구분할 수 없으며²², 기존에는 마우스나 기니피에 대한 독소중화항체시험에 의해 *C. perfringens*의 독소형을 구분하였다⁵. 하지만 이 방법은 각각의 독소에 대한 특이항체가 있어야만 하고, 상당수의 실험동물이 소모되는 등 경제적, 시간적으로 많은 노력을 필요로 하기에 임상적으로 *C. perfringens*로 동정이 되어도 균의 독소형을 확인하는데 극히 제한적이었다. 그러나 본 실험에서 이용된 PCR 기법을 이용할 경우 보다 신속하고 정확하게 *C. perfringens*의 독소형을 확인할 수 있을 것이다. PCR 기법은 ELISA 등의 항원항체반응이나 DNA나 RNA probe를 이용한 hybridization 기법들이 단백질이나 유전자를 이미 존재하는 양에 대하여만 검출해 내는 것과 달리, 미량의 유전자를 증폭시켜 검출하기 때문에 훨씬 민감한 것으로 알려져 있다²³. 따라서 *C. perfringens*가 배양 조건에 따라 미량의 독소만을 생산하여 항체중화시험에서 제대로 판정되지 않는 경우에도 PCR은 정확하게 유전자수준에서 독소형을 결정할 수 있을 것이다. 또한 PCR이 아직까지는 고가의 시약과 장비를 필요로 하는 단점이 있지만, 동물실험을 하지 않기 때문에 시간적, 경제적으로 그리고 공간적으로 중화항체시험보다는 훨씬 간편하리라 생각된다. 하지만 PCR 기법은 유전자수준에서 *C. perfringens*의 독소형을 결정하기 때문에, 혹 promoter나 독소 유전자 내의 부분적인 변이를 통해 유전자는 가지지만 독소를 생산하지 못하거나 비활성화된 독소를 생산하는 경우에도 독소를 가지는 것으로 판정되어 중화항체시험과는 다른 결과를 나타낼 가능성도 배제할 수 없다. 이러한 문제점은 유전자수준에서 병인체를 검색하는 기법들이 공통적으로 가지는 것이며, PCR을 위한 primer를 설계할 때 promoter 부위를 포함시키거나, 증폭산물 내부의 일부 염기서열에 대한 probe의 이용 등을 통해 어느 정도 극복될 수 있으리라 생각된다.

기존의 보고에 따르면, 닭의 피사성 장염은 *C. perfringens* A형^{4,24-26}과 C형²⁷⁻²⁹에 의하여 유발된다고 하였다. C형의 경우 장관내 출혈소견을 제외하고는 자돈에

서 유발되는 피사성 장염과 매우 유사한 병리학적 소견을 보여 β 독소에 의한 발병으로 추측되고 있으며³⁰, A형의 경우는 상대적으로 많은 양의 α 독소를 생산하는 균주와 밀접하게 관련되거나³¹ 또는 A형과 C형의 항독소를 이용한 Bernier 등²⁵의 실험결과로 볼 때 α 와 β 독소를 비롯한 주요치사독소 이외의 enterotoxin 등 기타 독소에 의한 발병가능성이 있는 것으로 추측된다. 본 실험에서는 야외분리균주 9주가 모두 A형으로 판정되었으며, C형은 확인되지 않았다. A형으로 판정된 분리주 9주는 지역적으로 각기 다른 농장의 9개 계군에서 산발적으로 분리된 것이므로 이는 국내에서 발생하는 닭의 피사성 장염의 양상이 *C. perfringens* C형보다는 A형에 의한 것이라고 추측할 수 있으나 외국의 보고예에 따르면 C형에 의한 발병이 많이 보고되고 있으며, 국내에서도 C형에 의한 발병가능성을 배제할 수 없기에 앞으로 지속적인 역학 조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

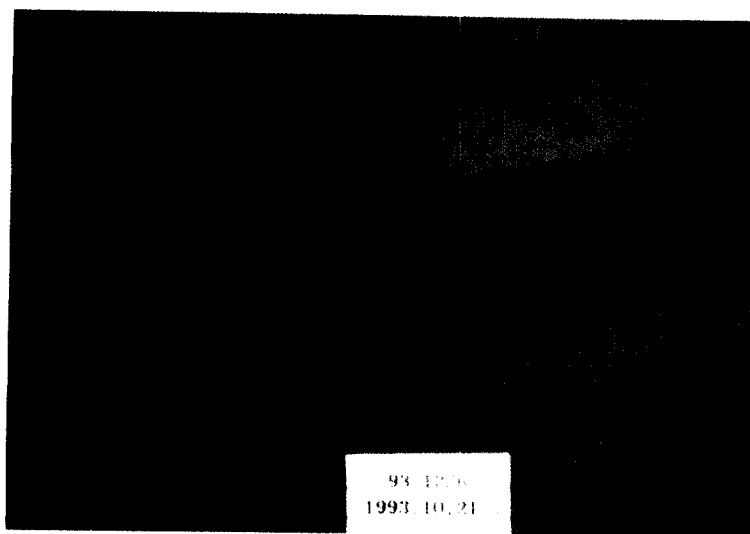
결론

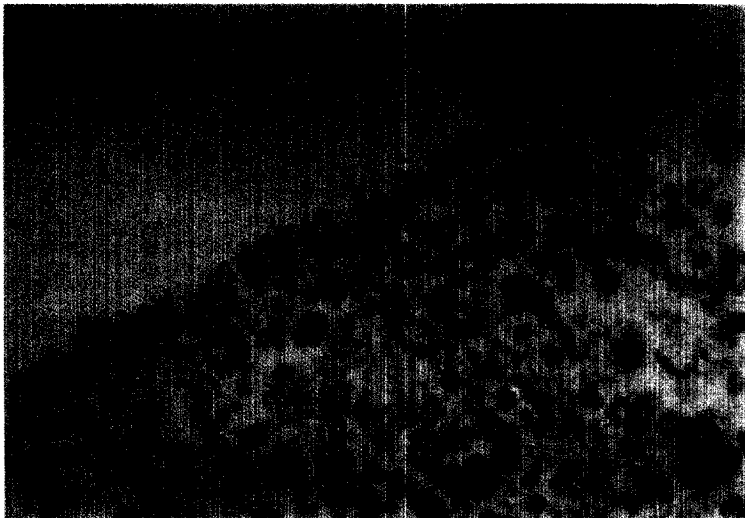
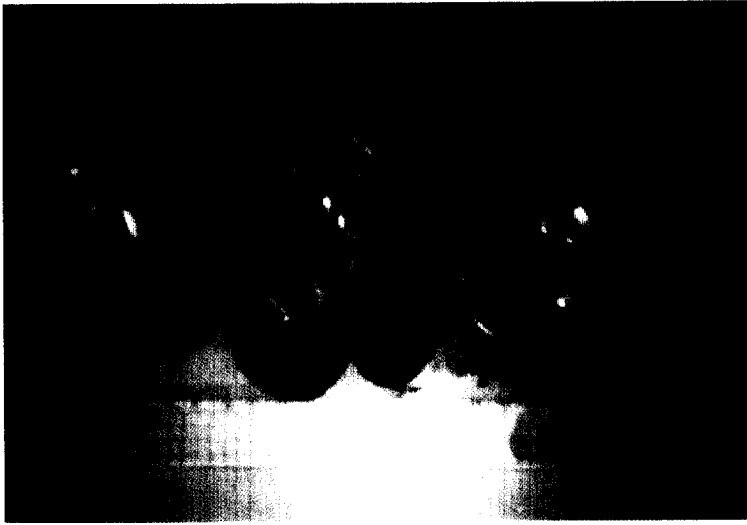
닭의 피사성 장염은 *C. perfringens*가 그 원인체이며 *C. perfringens*는 그 생산되는 독소의 양상에 따라 A, B, C, D 그리고 E의 다섯 독소형으로 나뉘어지고 그중 닭의 피사성 장염은 주로 A와 C형에 의해 발병이 이루어지는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 국내 닭의 피사성 장염을 일으키는 *C. perfringens*를 분리 동정하고 이들의 독소형을 판정하기 위하여 네개의 독소유전자에 대하여 각각 작성된 primer들을 이용한 multiplex PCR을 이용하였다.

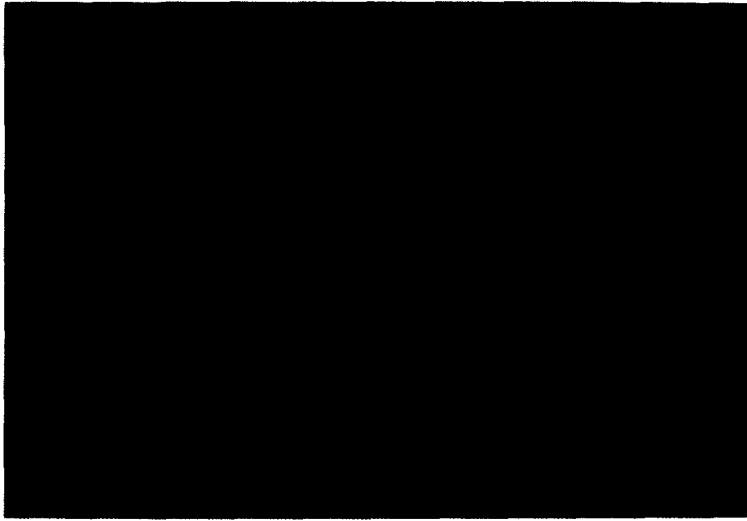
표준균주에 대하여 PCR을 실시한 결과 A형에서는 α 독소유전자에 해당하는 증폭산물, C형에서는 α 와 β 독소유전자에 해당하는 증폭산물이 관찰되었으며, 이들 증폭산물들은 염기서열 분석에 의해서 α 독소와 β 독소 유전자임을 확인하였다. 야외분리균주 9주에 대하여 PCR을 실시한 결과, 모두 A형의 독소형으로 판정되었으며, 따라서 국내 발생하는 닭의 피사성 장염은 A형이 압도적으로 많은 것으로 생각된다. 또한 본 실험의 multiplex PCR 기법은 *C. perfringens*의 독소형을 결정하는데 간편하고 유용한 기법이라고 생각된다.

Legends for figures

- Fig 1. Gross lesion of small intestine of a broiler with necrotic enteritis. Note thick membrane of mucosal surface and hemorrhage.
- Fig 2. Gross lesion of liver in chicken infected with *Clostridium perfringens*. Note spotted yellowish brown color change.
- Fig 3. Microscopic findings of a direct smeared liver with *Clostridium perfringens*. Note large Gram-positive bacilli with liver cells. Gram stain, $\times 1,000$.
- Fig 4. Microscopic findings of intestine from chicken affected with necrotic enteritis. Note brush hair-like Gram positive bacilli on the mucosal surface. H & E, $\times 530$.
- Fig 5. Electrophoretic analyses of PCR amplified products of *Clostridium perfringens* toxin genes with multiple primers on 1.5% agarose gel. PCR and electrophoresis were performed as described in materials and methods. Lanes 1 and 13; DNA size marker, 1 kb ladder (Gibco/BRL), lanes 2 to 10; field isolates of *C perfringens* from chicken with necrotic enteritis, lanes 11 and 12; *C perfringens* types A and C respectively.

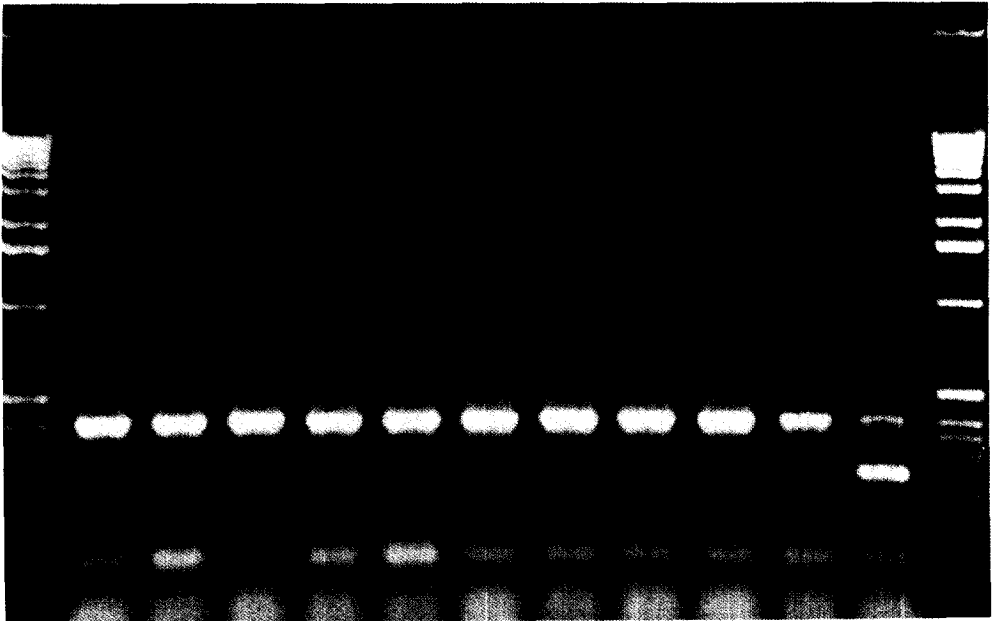






1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

1,018 bp —
506 bp —
396 bp —
298 bp —



5

참 고 문 헌

1. Ficken MD. Necrotic enteritis. In Calnek BW, ed *Diseases of Poultry*. 9th ed Ames, Iowa: ISUP, 264-267, 1991.
2. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*, 3:66-98, 1990.
3. Sterne M, Warrack GH. The types of *Clostridium perfringens*. *J Path Bact*, 88:279-383, 1964.
4. Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease. *Can Vet J*, 21: 141-148, 1980.
5. Sterne M, Batty I. Criteria for diagnosing clostridial infection. In *Pathogenic Clostridia*. London: Butterworths, 79-122, 1975.
6. Daube G, China B, Simon P, et al. Typing of *Clostridium perfringens* by *in vitro* amplification of toxin genes. *J Appl Bacteriol*, 77:650-655, 1994.
7. 예재길, 박경운, 조성근. 국내 돼지의 *Clostridium perfringens* type C 감염증에 관한 연구. *대한수의학회지*, 33:419-427, 1993.
8. 조성근, 김종염, 박정문. *Clostridium perfringens*에 의한 송아지의 장독혈증에 관한 연구. *한국수의공중보건학회지*, 14:255-263, 1990.
9. 조성근, 김종염, 박정문. 자돈의 *Clostridium perfringens* 감염증에 관한 조사 연구. *농시논문집(가축위생편)*, 33:25-31, 1991.
10. 박경운, 정성대, 예재길 등. 국내 닭의 괴사성 장염 발생에 관한 연구. *대한수의학회지*, 34:593-599, 1994.
11. Hogh P. Necrotizing infectious enteritis in piglets, caused by *Clostridium perfringens* type C. I. Biochemical and toxigenic properties of the Clostridium. *Acta Vet Scand*, 8:26-38, 1967.
12. Hogh P. Necrotizing infectious enteritis in piglets, caused by *Clostridium perfringens* type C. IV. Bacteriological diagnosis. *Acta Vet Scand*, 10:84-100, 1969.
13. Murray MG, Thomson WF. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 8:4321-4325, 1980.
14. Bains BS. Necrotic enteritis of chicken. *Aust Vet J*, 44: 40., 1968
15. Bernier G, Filion R. Necrotic enteritis in broiler chickens. *J Am Vet Med Assoc*, 158:1896-1897, 1971.
16. Gardiner MR. Clostridial infection in poultry on western Australia. *Aust Vet J*, 43:359-360, 1967.
17. Johnson DC, Pinedo C. Gizzard erosion and ulceration in Peru broilers. *Avian Dis*, 15:835-837, 1971.
18. Tsai SS, Tung MC. An outbreak of necrotic enteritis in broiler chickens. *J Chin Soc Vet Sci*, 7:13-17, 1981.
19. Char NL, Khan DI, Rao MRK, et al. A rare occurrence of clostridial infection in poultry. *Poult Adviser*, 19:59-62, 1986.
20. Frame DD, Bickford AA. An outbreak of coccidiosis and necrotic enteritis in 16-week-old cage-reared layer replacement pullets. *Avian Dis*, 30:601-602, 1986.
21. Wicker DL, Isgrigg WN, Trammell JH, et al. The control and prevention of necrotic enteritis in broilers with zinc bacitracin. *Poult Sci*, 56:1229-1231, 1977.
22. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, et al. ed *Bergey's manual of systematic bacteriology vol 2*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1179-1182, 1986.
23. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, et al. Recombinant DNA. 2nd ed New York: W.H. Freeman and Company, 79-98, 1992.
24. Al-Sheikhly F, Truscott RB. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis*, 21:241-255, 1977.
25. Bernier G, Filion R, Malo R, et al. Enterite necrotique chez le poulet de gril. II. Carateres des souches de *Clostridium perfringens* isolees. *Can J Comp Med*, 38: 286-291, 1974.
26. Wijewanta EA, Seneviratna P. Bacteriological studies of fatal *Clostridium perfringens* type-A infection in chickens. *Avian Dis*, 15:654-661, 1971.
27. Nairn ME, Bamford VW. Necrotic enteritis of broiler chickens in western Australia. *Aust Vet J*, 43:49-54, 1967.
28. Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. *J Comp Pathol*, 71:405-413, 1961.
29. Shane SM, Koetting DG, Harrington KS. The oc-

- currence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian Dis*, 28:1120-1124, 1984.
30. Long JR, Pettit JR, Barnum DA. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. *Can J Comp Med*, 38:467-474, 1974.
31. Niilo L. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep, and chicken. *Can J Comp Med*, 42:357-363, 1978.
-