

일부 동물에서 분리한 *Clostridium perfringens* 독소형의 검색

정 희 곤

송원대 식품영양과

Detection for Toxin Types of *Clostridium perfringens* Isolates from an Animals

Hee Kon Jung

Dept. of Food & Nutrition, Songwon College, Kwang-ju, Korea

ABSTRACT

Outbreak patterns were observed in 250 chickens of necrotic enteritis(0.3%) among 81,000, 90 enterotoxemic pigs(9.5%) among 950, and 9 enterotoxemic cattle(13.8%) among 65 in a farms of Gyeonggi, Chungnam, Kwangwon, and Chonnam area from 1993 to 1996. *Clostridium perfringens* was isolated from 36 strains(14.4%) among 250 chickens of necrotic enteritis, 21 strains(23.3%) among 90 enterotoxemic pigs, and 3 strains(33.3%) among 9 enterotoxemic cattle. Toxin types by the neutralization test were categorized as A-type in 36 strains(100.0%) among 36 chickens of necrotic enteritis, and as A-type in 17 strains(81.0%), as B-type in 2 strains(9.5%) and as C-type in 2 strains(9.5%) among 21 enterotoxemic pigs, and also 3 strains(100.0%) among 3 enterotoxemic cattle.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Outbreak Patterns, Toxin Types

I. 서 론

*Clostridium perfringens*는 자연계에 널리 분포되어 있는 세균인데,^{1,2)} 조 등³⁾은 강원, 충남, 경기지역의 15개 목장에서 송아지 1,700두중 300두(17.6%)가 설사증을 나타내었으며 설사증을 나타낸 300두중 95두(31.7%)에서 *C. perfringens*를 분리하여 보고하였다. 그리고 Sterne and Warrack⁴⁾은 이균이 생산하는 독소를 A,B,C,D,E 등 5가지 형으로 분류하였다.

C. perfringens A형은 닭의 괴사성장염과 yellow lamb 병을 일으키며 주로 토양과 사람의 장관에서 분리되는데, 사람은 가스괴저와 봉와직염의 원인이 된다. B형은 새끼양의 설사증과 면양 및 산양의 출혈성장염을 일으키고 C형은 닭, 송아지, 망아지, 양 및 돼지 등의 출혈성 장독혈증과 면양의 위장병(struck)을 일으키며 D형은 새끼양의 과식증과 면양의 신장수질병(pulp kidney disease)의 원인이 되고 E형은 양과 송아지의 장독혈증을 일으킨다.⁵⁾

Glenny 등⁶⁾은 이들 독소형을 alpha, beta, gam-

ma, epsilon 등으로 분류하였으며 Prigge⁷⁾는 theta 독소를 분리하여 보고하였다. *C. perfringens* A형은 alpha, eta, theta, kappa, Mu, Nu, neuraminidase 및 enterotoxin, B형은 alpha, beta 및 epsilon, C형은 alpha 및 beta, D형은 alpha 및 epsilon, E형은 alpha, eta 및 iota 등의 독소를 생산한다.⁴⁾

C. perfringens A형이 생산하는 장독소(enterotoxin)는 사람에게 식중독을 일으킨다는 많은 보고가 있는데,^{12*13)} 최근 이 식중독의 주원인은 아포가 형성될 때에만 생산되는 장독소(heat-labile enterotoxin, LT, DNA:364 bp, Saito et al, 1992; Jung, 1997)라는 것이 입증되었다.²¹⁰⁾ 이독소는 분자량 34,000-35,000의 단순단백으로서 열에 약하므로 70-80°C에서 1분동안에 불활성화 된다.

본 연구는 *C. perfringens*에 의한 동물질병의 유행을 조사하고 본균을 분리동정하여 독소형을 분류하였는데, 이 조사연구가 본균에 의한 축산농가의 피해를 감소시키며 인체의 식중독발생을 예방하여 국민보건향상을 도모하는데, 기초자료로 이용되기를 바란다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1993년부터 1996년까지 4개년동안 경기, 충남, 강원, 전남지역 일부농장에서 발생한 닭괴사성 장염, 돼지 및 소의 장독혈증 등의 환축 349마리에서 분리한 총60균주를 본실험에 사용하였다(표 2참조).

대조균주는 일본 오오사카 공중위생연구소와 미국 NVSL(National Veterinary Labs, Iowa)에 서분양받은 *C. perfringens* A,B,C,D 및 E형을 사용하였다.

2. 균분리 및 동정

분변 1g을 peptone broth 10 ml에 부유시켜 75°C에서 20분간 가열한 용액을 blood agar상에 도말하여 혐기성상태의 37°C에서 20~24시간 배양한 후 *C. perfringens*로 생각되는 colony를 선정하여 그림염색, 형태학적 및 생화학적 시험 등을 실시하여 동정하였다.^{14,15)}

3. 독소정제

C. perfringens A, B, C, D 및 E형을 cooked meat medium에 4시간 배양하여 75°C에서 20분간 가열한후 Duncan & Strong medium¹⁶⁾에 접종하여 37°C에서 8시간동안 배양하였다.

배양액을 5,000 rpm으로 원심분리하여 집균된 용액을 Stark & Duncan¹⁷⁾과 Granum & Whitaker¹⁸⁾법에 의하여 80% ammonium sulfate 포화용액과 집균액을 등량 혼합하여 cell sonicating 하였으며 30분후에 그용액을 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 10,000 rpm 으로 30분간 원심분리한 후 침전단백질을 0.02M phosphate buffer 용액(pH 6.8) 이 2-4 mg/ml가 되도록 조정하였다. 부유된 용액을 다시 15% ammonium sulfate 포화용액으로 처리하였으며 30분후에 위와 같은 rpm으로 원심분리하였다. 그리고 침전 단백질을 같은 buffer 용액에 용해시킨후 같은 buffer 용액을 사용하여 sephadex G-100 column(2.5×70 cm, 20 ml/h)에서 정제하여 독소로 사용하였다.

4. 항독소제조

정제된 독소를 0.3% formalin으로 처리하여 실온에서 overnight한후 adjuvant complete freund (Difco)를 독소와 등량혼합(0.1 mg/ml)한 용액을 마우스

Table 1. Interpretation of serum neutralization test for *Clostridium perfringens* toxin

Antitoxin	Types neutralized	Toxins neutralized
Type A	Type A only	Alpha
Type B	Type A, B, C and D	Alpha, beta, epsilon
Type C	Type A and C	Alpha, beta
Type D	Type A and D	Alpha, epsilon
Type E	Type A and E	Alpha, iota

(Balb/C) 복강내에 0.3 ml을 접종하였다. 그리고 14일 후에 adjuvant complete freund 가 첨가된 독소 0.3 ml을 마우스에 접종한 다음 14일에 toxoid만 0.3 ml을 접종하였으며 7일후에 채혈된 혈청을 항독소로 사용하였다.¹⁹⁾

5. 중화시험

Smith법¹⁴⁾에 의하여 1% glucose를 첨가한 CM 배지에 분리균을 접종하고 37°C에서 5-6시간 동안 배양한후 5,000 rpm(ALC, 4236 centrifuge, Italy)에서 15분간 원심분리하여 상층액을 3개의 시험관에 1.2 ml 씩 분주하였다.

첫째 시험관에 0.5 ml 정상말혈청, 둘째 시험관에 0.3 ml *C. perfringens* A형 항혈청, 셋째 시험관에 0.3 ml C형 항혈청을 넣고 혼합한후 실온에서 30분간 정치한후 각각 18 g내외의 2마리의 마우스에 0.5 ml씩 복강내에 접종하고 다음날 표 1에 준하여 판독하였다.

III. 결과 및 고찰

1993년부터 1996년까지 4개년 동안 경기, 충남, 강원, 전남도 지역 일부농장에서 발생한 닭괴사성장염, 돼지 및 소의 장독혈증의 유병율을 조사한 결과, 닭괴사성장염의 유병율은 81,000수중 250수로서 0.3%이었고 돼지장독혈증은 950두중 90두로서 9.5%이었고 소장독혈증은 65두중 9두로서 13.8%이었다.

C. perfringens 분리율은 닭괴사성장염의 환축에서는 250수중 36수에서 본균이 분리되어 14.4%이었고 돼지장독혈증에서는 90두중 21두에서 분리되어 23.3%이었으며 소장독혈증에서는 9두중 3두에서 분리되어 33.3%이었다(표 2참조).

1997년 정²⁰⁾의 보고에 의하면 닭 16,200수중에서 54수(0.3%)가 괴사성장염에 이환되었으며 새끼돼지 620두중에서 66두(10.6%)가 장독혈증에 이환되

Table 2. Outbreak patterns on chickens of necrotic enteritis, enterotoxemic swine and cattle in 1993-1996

Sources	Animal examined	Outbreak cases(%)	Number of isolated strains(%)
Chickens	81,000	250(0.3)	36(14.4)
Swine	950	90(9.5)	21(23.3)
Cattle	65	9(13.8)	3(33.3)
Total	82,015	349(0.4)	60(17.2)

있고 소 65두중에서 9두(13.8%)가 장독혈증에 이환되어 본조사 성적과 유사한 유행율을 나타내었다. 그리고 *C. perfringens*의 분리율은 피사성장염에 이환되어 있는 닭 54수중 7수(13.0%)에서 본균이 분리되었으며 장독혈증에 이환되어 있는 새끼돼지 66두중 14두(21.2%)에서 본균이 분리되었고 장독혈증에 이환되어 있는 소 9두중 3두(33.3%)에서 본균이 분리되어 역시 본조사 성적과 유사한 분리율을 나타내었다.

또한 1990년 조 등³⁾의 보고에 의하면 강원, 충남, 경기지역 15개 목장에서 조사한 설사증 유행율은 송아지 1,700두중 300두(17.6%)가 설사증을 일으켰으며 설사증 송아지 300두중 95두(31.7%)에서 *C. perfringens*가 분리되어 본조사 성적과 유행율이 유사하였다.

닭피사성장염, 돼지 및 소의 장독혈증에서 분리한 *C. perfringens*을 중화시험법을 이용하여 독소형을 분류한 결과, 닭피사성장염에서 분리된 본균은 B, C, D 및 E형에서 마우스가 모두 폐사하고 A형에서만 생존된 A형이 36균주중 36균주(100.0%)이었고 돼지장독혈증에서 분리된 21균주중 17균주가 A형(81.0%)이었으며 2균주는 B형(9.5%)이었고 2균주는 C형(9.5%)이었다. 그리고 전체적으로는 총 60균주중 A형이 56균주(93.3%)이었고 B, C 균주가 각각 2균주(3.3%)이었다(표 3참조).

1997년 정¹⁾의 보고에 의하면 총 26균주중 22균주(91.7%)는 A형이었으며 2균주(8.3%)는 C형으로서 A형이 거의 대부분으로 본성적과 유사하였다. 1994년 김¹⁹⁾에 의하면 닭피사성장염의 환축 169수중 30수(17.8%)에서 본균이 분리되었는데, 장기별 분리율은 간장에서 3.0%이었고 소장에서 12.4%이었으며 맹장에서 17.8%이었다. 그리고 분리된 30균주의 독소형은 26균주(86.7%)가 A형이었으며 C형이 2주(6.7%)이었다. 또한 Taylor & Gordon²⁰⁾에 의하면 닭에서 분리된 88균주 모두가 A형이었고 Niilo²¹⁾에 의하면 역시 닭에서 분리된 21균주 모두가 A형이었다. 이와같이 여러연구결과, *C. perfringens*의 여러독소형중에서 A형이 거의 대부분을 차지하였는데, 이는 본조사 성적과 대체로 일치하였다.

이상과 같이 동물에서 *C. perfringens* A형의 분리 빈도가 높은 것은 사람에게 식중독을 일으키는 독소인 장독소(enterotoxin)을 가지고 있는 독소형균이기 때문에, 이의 예방관리에 주의가 요망된다.

IV. 요약

1993년부터 1996년까지 4개년 동안 경기, 충남, 강원, 전남지역 일부농장에서 닭 81,000수, 돼지 950두 및 소 65두(총 82,015마리)에 대하여 닭피사성장염과 돼지 및 소장독혈증에 대한 유행율을 조사

Table 3. Detection for toxin types of *Clostridium perfringens* by the neutralization test in 1993-1996

Toxin types	No. of strains isolated(%)			Total(%)
	Chickens of necrotic enteritis	Enterotoxemic swine	Enterotoxemic cattle	
A	36(100.0)	17(81.0)	3(100.0)	56(93.3)
B		2(9.5)		2(3.3)
C		2(9.5)		2(3.3)
D				
E				
Total	36(100.0)	21(100.0)	3(100.0)	60(100.0)

하였으며, 349마리로 부터 본균 60균주를 분리하여 분리율을 산출하였고 중화시험을 실시하여 독소형을 분류하였다.

유병율은 닭 81,000수중 괴사성장염이 250수(0.3%)이었고 돼지 950두중 장독혈증은 90두(9.5%)이었으며 소 65두중 장독혈증은 9두(13.8%)이었다.

*C. perfringens*의 분리율은 닭괴사성장염의 환축 250수중 36균주(14.4%)에서 본균이 분리되었고 돼지장독혈증은 90두중 21균주(23.3%)에서 분리되었으며 소장독혈증에서는 9두중 3균주(33.3%)에서 분리되었다.

분리된 *C. perfringens* 독소형은 닭괴사성장염은 36균주중 36균주(100.0%)가 모두 A형이었고 돼지장독혈증에서는 21균주중 A형이 17균주(81.0%)이었으며 B형이 2균주(9.5%)이었고 C형이 역시 2균주(9.5%)이었으며 소장독혈증에서는 3균주중 3균주가 모두 A형(100.0%)이었다.

참고문헌

- 정희곤: 닭의 괴사성장염, 새끼돼지 및 소의 장독혈증에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 S-R 변이와 항균요법제의 감수성. 한국식품영양학회지, **10**(2), 166-173, 1997.
- 정희곤: *Clostridium perfringens* A형이 생산하는 장독소의 검색을 위한 RPLA 법과 PCR기법의 감도비교. 한국환경위생학회지, **23**(4), 45-49, 1997.
- 조근성, 김종영, 박정문: *Clostridium perfringens*에 의한 송아지의 장독혈증에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, **14**(3), 255-263, 1990.
- Sterne, M., and Warrack, G.H.: The type of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol. Bacteriol.*, **88**, 279-283, 1964.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., and Barlough, J.E.: Hagan and Brummer's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed., Comstock Publishing Associates, Ithaca and London, 214-240, 1998.
- Glenny, A.T., Barr, M., Clewellyn-Jones, M., Dalling, T., and Ross, H.E.: Multiple toxins produced by some organisms of the *Clostridium welchii* group. *J. Pathol. Bacteriol.*, 53-74, 1993.
- Prigge, R.: Experimentelle untersuchungen uber die serologischen eigenschaften des Fraenkel schen gasbazillus (*B. perfringens*). *Int. Soc. Microbiol.*, 2nd Cong., 175-178, 1936.
- Hobbs, B. C.: *Clostridium welchii* as a food poisoning organism. *J. Appl. Bacteriol.*, **28**, 74-82, 1965.
- Itōh, T.: Incidence of heat-resistant *Clostridium perfringens* in faeces of healthy subjects, serotyping of isolates and food poisoning caused by new serotype organisms. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. Publ. Hlth.*, **24**, 7-39, 1973.
- Saito, M., Matsumoto, M., and Funabashi, M.: Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin gene by the polymerase chain reaction amplification procedure. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 47-55, 1992.
- Tsukamoto, T., Ishibashi, M., Asao, T., Ohtsu, K., Shinagawa, K., Kunito, D., and Uemura, T.: Detection of strain and enterotoxin in fecal specimens of *Clostridium perfringens* food poisoning. *Jpn. J. Publ. Hlth.*, **28**, 487-491, 1981.
- Choudhary, S.P., and Narayan, K.G.: Outbreak of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. 30th Ann. Conf. IPHA, All India Inst. of Hyg. & Publ. Hlth., Calcuta, Jan., 16-18, 1986.
- Todd, E.C.D.: Foodborne disease in six countries a comparison. *J. Food Protect.*, **41**, 559-565, 1978.
- Smith, L.D.: *Clostridia* infections. In "Isolation and identification of avian pathogens (Hitchner, S. B., Domermuth, C. H., Purchase, H.G., and Williams, J.E., eds.)", Creative Printing Co., Inc., Endwell, N.Y., 33-35, 1980.
- A Dey, C.W.: Anaerobic infections. *Brit. Med. J.*, **2**, 748, 1935.
- Duncan, C.L., and Strong, D.H.: Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *App. Microbiol. J.*, **16**(1), 82-89, 1967.
- Stark, R.L., and Duncan, L.L.: Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Inf. Immunol.*, **6**, 662-673, 1972.
- Granum, P.E., and Whitaker, J.R.: Improved method for purification of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. *App. Env. Microbiol.*, **39**(6), 1120-1122, 1980.
- 김홍집: *Clostridium perfringens* 감염에 의한 닭의 괴사성장염에 관한 연구. 전남대 대학원 박사학위논문, 1994.
- Taylor, A.W., and Gordon, W.S.: A survey of the types of *Clostridium welchii* present in soil and in the intestinal contents of animal and man. *Anim. Dis. Res. Assoc.*, **5**, 271-277, 1938.
- Niilo, L.: Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens. *Can. J. Comp. Med.*, **42**, 357-363, 1978.