

새끼 하마에서 *Clostridium perfringens* Type A 감염 증례

김영섭 · 임숙경* · 신남식¹

서울대공원 동물원

*국립수의과학검역원, 서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2008년 7월 18일)

Clostridium perfringens Type A Infection in a *Hippopotamus amphibius* Cub

Young-Seob Kim, Suk-Kyung Lim* and Nam-Shik Shin¹

Seoul Grand Park Zoo, Gwacheon, 427-420, Korea

*National Veterinary Research & Quarantine Service, Aanyang, 430-824, Korea

¹Dept. of Zoo & Wildlife Medicine College of Veterinary Medicine Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract : *C. perfringens* is the most important enteric clostridial pathogen of animals. *C. perfringens* type A has been associated with hemorrhagic enteritis in a wide range of domestic and wild mammals. But all types of *C. perfringens* can be normal inhabitants of the intestine of most mammals. We have a special case that showed *C. perfringens* type A infection in a hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*) cub at Seoul Grand Park Zoo. Male, hippopotamus cub died in 3 days after birth. Clinical features of the hippopotamus cub have showed lethargy and anorexia before death. Gross post-mortem findings of the hippopotamus were hemorrhagic enteritis of intestine. Histopathologically, ruminant stomach and intestine showed hemorrhagic lesions and the lumen of the small intestine was filled with mucoid and hemorrhagic fluid. Also, intestine and stomach of hippopotamus were distended with gas and hemorrhagic fluid. *C. perfringens* was isolated in culture of small intestine and the presence of *C. perfringens* type A was confirmed by PCR. This case indicated that *C. perfringens* type A could be considered as a virulence factor responsible for causing death of a newborn hippopotamus.

Key words : *C. perfringens* type A, enterotoxemia, clostridium infection, *Hippopotamus amphibius*.

서 론

하마(*Hippopotamus amphibius*)는 아프리카에서 서식하는 초식동물로서 우제목(*Artiodactyla*) 하마과(*Hippopotamidae*)에 속하며, 체중이 2,500~4,000 kg에 이른다. 땀샘이 발달하여 땀을 흘리면 약간 붉은색으로 보여 마치 피를 흘리는 것 같고 배변을 할 때는 꼬리를 좌우로 흔들면서 분산시키는 특이한 습성이 있다. 임신기간은 227~240일이고 체중이 27~45 kg인 새끼를 분만한다(16).

*C. perfringens*는 그람양성의 혐기성 세균으로 아포를 형성하며, 이 아포는 오염된 구역내에서 최소한 1년 이상 살아남을 수 있다(9,18). *C. perfringens*는 대부분의 포유동물과 조류의 장관(특히 잘 발달된 맹장에 정상적으로 존재하며 대부분의 동물에서 생후 수일 내에 획득하게 된다(8). *C. perfringens*는 독소생산능력에 따라 A, B, C, D, E의 5개 type으로 분류된다(18).

C. perfringens type A는 alpha독소를 생산하는데 이 독소는 치명적이며 용혈성, 괴사성으로 이 독소에 의한 질병을 장독혈증(*enterotoxemia*)이라고 한다(8,14). A type은 가축과 야생 포유동물, 조류에서 괴사성 장염 또는 출혈성 장염을 일으키며(7,9,10), 사람과 동물에서 가스괴저의 가장 흔한 원인이 된다.

송아지와 어린양에서는 급성경과를 취하며 높은 폐사율, 황달, 용혈성 빈혈, 심외막 수종, 암적색 신장, 증대되고 부서지기 쉬운 간 등이 특징이다(11). 말에서는 X 대장염을 유발하며 악취냄새를 풍기고, 풍부한 설사, 탈수가 특징이며 장의 여러 부위에 출혈을 일으키고, 대장 점막의 괴사와 출혈을 보인다(15). 염소, 개, 멧크에서는 장독혈증을 일으키고, 영장류에서는 위의 확장을 일으킨다(11,20).

기타 야생동물에서 *C. perfringens*에 의한 장독혈증 사례는 생후 48시간된 말의 새끼에서 *C. perfringens* type A에 의한 괴사성 장염(5), 사육중인 치타에서 *C. perfringens* type A로 인한 폐사(6), 로리스에서 괴사성 장염(17), 해양포유류인 Hooded seals (4)와 경주용 낙타(14), 까마귀에서 *C.*

¹Corresponding author.
E-mail : nsshin@snu.ac.kr

*perfringens*로 인한 치사적인 괴사성 장염(3), 타조에서 괴사성 장염(13)의 발생보고 등이 있다.

대부분의 동물에서 *C. perfringens* type A는 정상적인 장내세균총의 일부이므로 임상증상만으로 진단하는 것은 불확실하다(9). 그리고 동물이 폐사된 후 신체를 통해서 빠르게 증식되고 퍼져나감으로 진단은 임상증상과 부검소견, 병소에서 세균배양 결과를 종합하여 판단하여야 한다(9).

본 증례는 생후 3일령에 폐사한 동물원내 새끼하마의 부검 및 병리조직학적 검사, 마우스접종실험, 미생물 검사를 실시한 결과 *C. perfringens* 감염증으로 진단되어 보고한다.

증례

병력 및 부검소견

2005년 6월 10일 서울대공원에서 다산의 경험을 가진 하마로부터 28 kg에 수컷하마가 태어났다. 생후 첫날은 활발히 활동하였으며, 초유는 먹지 못하였다. 생후 3일째, 움직임이 둔해지고 머리를 들지 못하는 등 침울 증상을 보이다가 폐사되었다(Fig 1). 하마 새끼는 곧바로 부검을 실시하였으며, 육안 소견상 복부피하에 점상출혈이 있었고, 소장 및 대장은 약간 부종되어 있었다. 위내는 새끼의 발톱 일부가 소화되지 않은 상태로 2개 있었고 위점막은 울혈되어 있었다(Fig 2). 소장의 관강내에는 치즈양 점액이 부착되어 있었고, 결장의 관강 내는 젤리양 혈액이 함유된 내용물이 다량 저류되어 있었으며, 장점막에 충출혈은 하부로 갈수록 더 심하였다(Fig 3).

미생물학적 검사

소장 및 결장 점막부위에서 샘플을 그람 염색한 결과 그람 양성 간균이 확인되었다. 세균검사를 위해 소장 및 결장에서 샘플을 채취하여 혐기 배양한 후 그람염색을 실시한 결과 그람양성의 아포형성균이 다수 관찰되었고(Fig 4), 세균확정을 위해 API 20E kit (bioMerieux)를 사용하여 조사한 결과 *C. perfringens*임이 확인되었다.

분리된 세균의 독소형을 확인하기 위해 Yoo 등(21)의 방법에 따라 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였으며 표준균주 중 *C. perfringens* type A는 KCTC (Korean collection for type cultures)에서 구입하였으며 *C. perfringens* type B, C, D, E는 국립수의과학검역원이 National Animal Disease Center (Ames, Iowa)로부터 분양받아 보관중인 균주를 사용하였다. PCR 결과 분리주에서 402 bp에서 특이밴드(Fig 5)를 형성하여 *C. perfringens* type A로 확인되었다.

심장, 간, 폐, 위, 장 등에 대한 병리조직검사 결과 특이소견은 관찰되지 않았다. 독소에 의한 급성 폐사로 추정되었다.

독소의 존재여부를 확인하기 위하여 26~28 g의 마우스(ICR) 5수에 경정맥 혈액과 위, 십이지장, 회장, 결장의 내용물 추출액을 원심 후 상층액을 세균여과기로 무균적으로 여과 한 후 각각 복강내 접종하였다. 경정맥 혈액 5 ml, 위 내용물 5 g,



Fig 1. Hippopotamus cub was died at 3 days after birth.

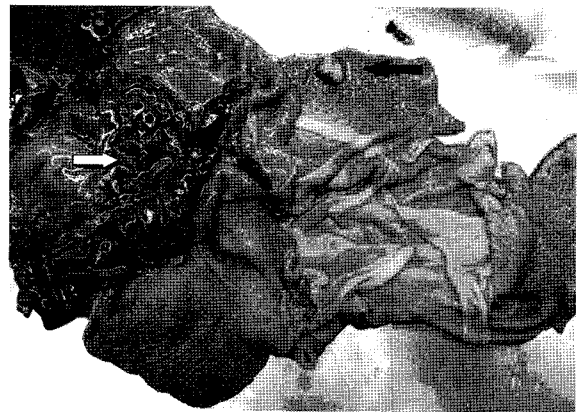


Fig 2. A fragment of hoof (black arrow) and congestion (white arrow) in stomach of the hippopotamus cub died.

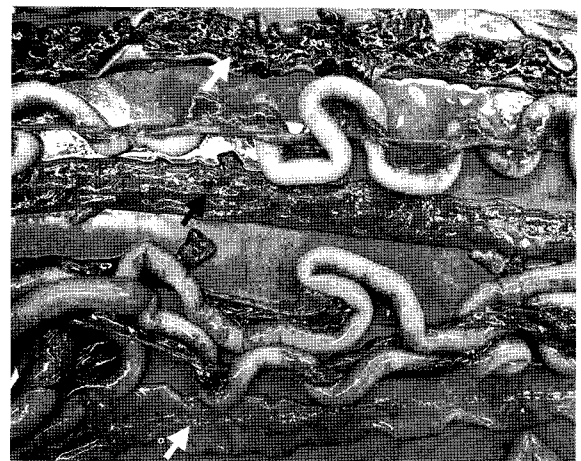


Fig 3. Jelly-like hemorrhagic contents (white arrow) and hemorrhage (black arrow) in colon of the hippopotamus cub died.

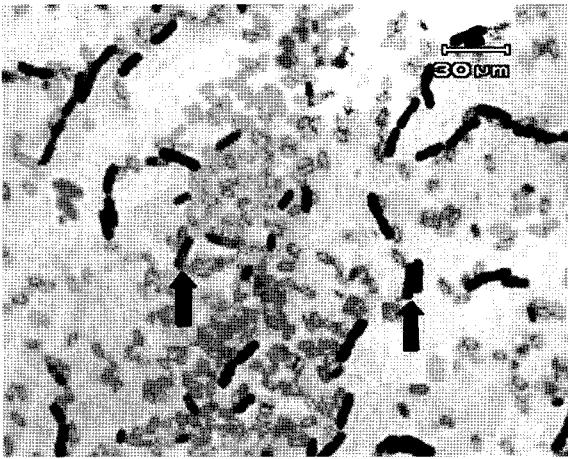


Fig 4. *C. perfringens* spores in cultured bacteria of colon of the hippopotamus cub died (Gram's stain, × 1,000).

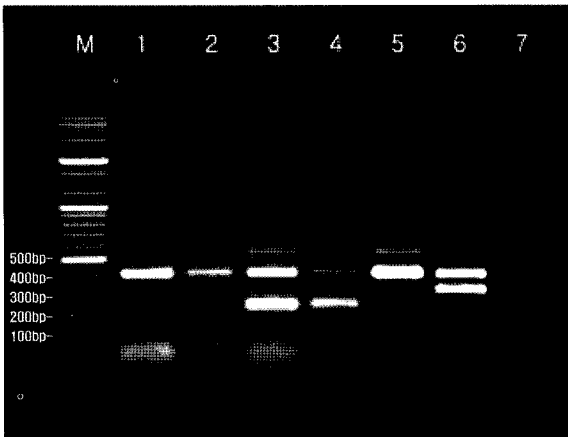


Fig 5. Detection of *C. perfringens* toxin genes amplified by a PCR. Lane M. 100bp DNA ladder (Bioneer). Lane 1. Cultured bacteria in the large intestine (402bp). Lane 2. *C. perfringens* type A KCTC 3269 (402bp). Lane 3. *C. perfringens* type B (541, 402, 236bp). Lane 4. *C. perfringens* type C (402, 236bp). Lane 5: *C. perfringens* type D (541, 402bp). Lane 6. *Cl. perfringens* type E (402, 317bp)

십이지장 내용물 1.5 g, 회장 내용물 1.1 g, 결장 내용물 1.9 g을 각 장기의 점막에 부착된 점액과 함께 각각 3 ml의 증류수로 희석 후 진탕하고, 6,000 rpm 에서 10분간 원심분리 후 상층액을 0.2 μm, 25 mm 의 실린지 필터(Nalgene, USA)로 여과하였다. 이 여과액 각각을 5수의 마우스 복강내로 경정맥 혈액 희석액과 위내용물 희석액을 여과한 액은 각각 2 ml 씩 접종하였고, 십이지장, 회장, 결장의 내용물을 희석하여 여과한 액을 각각 1 ml 씩 복강내로 접종하였다. 그 결과 접종 후 15시간 이내 모두 급성으로 폐사되어, 부검 결과 각 장기에 염증이 없었고, 장내 출혈만 존재하여 세균의 외독소에 의한 폐사로 추정되었다.

고 찰

*C. perfringens*는 토양이나 물 속 등 자연환경과 대부분의 포유동물과 조류의 장관, 특히 잘 발달된 맹장에 정상적으로 존재하며(2,19), 장관의 미생물환경은 *C. perfringens*의 장 질병에 중요한 요소이다(9). 정상적인 장내 세균총은 미생물의 부착부위를 점유하여 병원성 미생물이 부착되지 못하게 하거나 병원성 미생물이 필요로 하는 영양소를 흡수하여 병원성 미생물의 이용을 제한시키는 작용을 하며, 항 미생물 작용이 있는 지방산의 생산, 독소를 낮추는 단백질 생산 등을 통하여 병원성 미생물의 집락형성을 저지한다(8). 일부 *C. perfringens*는 정상적인 장내 세균총으로 있으며, *C. perfringens*에 균수가 적을 때는 비병원성으로 존재하다가 장내의 미생물환경이 변하면 *C. perfringens*가 증식되고 독소를 생산하며, 신체 내 침입을 허용하여 질병을 일으키게 된다(2,19). 질병에 쉽게 걸리게 하는 요인으로는 사료의 변경, 스트레스, 약물 투약 등이 있으며 특히 사료변화는 소화관의 연동운동을 감소시키거나 발효작용을 촉진하므로 *C. perfringens*에 의한 장 질병을 방지하기 위해서는 장관의 정상적인 미생물환경을 유지하는 것이 중요하나(2), 본 증례의 하마새끼는 초유를 먹지 못하여 정상적인 장내 세균총을 형성하지 못한 것으로 추정되었다.

C. perfringens type A는 alpha독소를 생산하며 이 독소에 의한 질병을 장독혈증이라고 하는데(9,15), 본 증례의 새끼하마는 병리조직학적 검사결과 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 대장 등의 조직에서 특이 병변이 발견되지 않았고, 부검시 대장에 젤리양 혈액이 다량 함유되어 있어 장독혈증 시의 독소에 의한 특이병변과 동일한 것으로 추정되었다.

세균의 내독소 존재여부를 검사하는 방법은 상업적으로 판매하는 키트를 이용한 *Limulus* 검사가 있으며, 이 검사는 혈청 및 뇌척수액내 미량의 내독소를 검출하는데 사용한다고 하였으나(1), 우리의 실험에서는 *Limulus* 검사 대신에 마우스를 사용하여 내·외독소의 존재 여부만 확인 하였고, 마우스 접종실험은 각각의 시료를 증류수로 희석 후 원심 분리하여 상층액을 0.2 μm 실린지 필터를 사용하여 여과 한 후 마우스 복강내 접종하여 폐사시간 측정을 통해 독소의 존재 여부를 확인하고자 하였다. 시료의 여과액을 오후 5시에 접종 하였으나 다음날 아침 7시경에 폐사체로 발견되어 정확한 폐사 시간을 측정하지 못하였다. 폐사된 마우스를 부검하였으나 장내 출혈의 특이 병소는 없었으며, 모든 마우스가 15시간 이내 빠르게 폐사된 점으로 보아 외독소에 의한 폐사로 추정되었다. 폐사된 마우스는 0.2 μm 실린지 필터를 사용하여 균을 여과한 후 접종하였기 때문에 세균감염은 없었다.

새끼하마의 병소에서 세균 검출을 위해 소장 및 결장에서 샘플을 채취하여 혐기 배양한 후 그람염색을 실시한 결과 그람양성의 아포형성균이 다수 관찰되었고, 세균확정을 위해 API 20E kit (bioMerieux)를 사용하여 조사한 결과 *C. perfringens*임이 확인되었으며, Yoo 등(21)의 방법에 따라

PCR을 실시하여 혈청형을 확인한 결과 Fig 5와 같이 402 bp 에서 단일 밴드를 형성하였으며, 표준균주를 사용한 밴드와 동일한 밴드를 형성하여, *C. perfringens* type A로 확인되었다.

새끼하마는 우제류의 초식동물로서 분만 후 24~48시간이내 초유를 섭취하여 모체이행항체를 흡수하여 면역력을 획득하여야 하나 본 개체는 어미가 다리를 원활히 벌려주지 못하여 초유를 섭취하지 못하였고, 면역력이 부족한 상태에서 *C. perfringens*가 구강을 통하여 감염 후 급속히 증식되어 폐사에 이르게 된 것으로 추정되었다.

결 론

본 증례의 새끼하마는 동물원에서 태어 난지 3일 만에 무기력 증상을 보이다 폐사되었다. 부검 시 대장에 젤리양 혈액을 다량 함유하였으나 조직학적 검사 결과 특이병변이 발견되지 않았다. 폐사의 원인은 세균검사와 PCR에 의해 *C. perfringens* type A에 의한 독소로 확인되었다.

어미의 다리가 불편하여 벌려주지 못하였고, 이로 인하여 새끼가 초유를 먹지 못하여 면역력을 갖지 못한 상태에서 *C. perfringens*에 감염되어 폐사된 것으로 추정되었다.

하마에서 *C. perfringens* 감염에 의한 폐사는 국내에서 아직 보고된 바가 없다. 우리의 증례보고가 자연서식지와 다른 열악한 환경에서 사육되고 있는 희귀 야생동물의 관리에 많은 도움이 되었으면 한다.

참 고 문 헌

- 권오섭외 39인. 대학미생물학. 8판. 서울: 탐구당. 2000: 1019-1020.
- Aguilera MO, Stagnitta PV, Micalizzi B, Stefanini de Guzman AM. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. *Anaerobe* 2005; 11(6): 327-334.
- Asaoka Y, Yanai T, Hirayama H, Une Y, Saito E, Sakai H, Goryo M, Fukushi H, Masegi T. Fatal necrotic enteritis associated with *Clostridium perfringens* in wild crows (*Corvus macrorhynchos*). *Avian Pathol* 2004; 33(1): 19-24.
- Aschfalk A, Muller W. *Clostridium perfringens* toxin types in hooded seals in the Greenland sea, determined by PCR and ELISA. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001; 48(10): 765-769.
- Bueschel D, Walker R, Woods L, Kokai-Kun J, McClane B, Songer JG. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. *J Am Vet Med Assoc* 1998 Nov 1;213(9): 1305-7, 1280.
- Citino SB. Chronic intermittent *Clostridium perfringens* enterotoxigenesis in a group of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo wild Med* 1995; 26(2): 279-285.
- Engstrom BE, Fermer C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V, Gunnarsson A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol* 2003; 94(3): 225-235.
- Ernst L, Biberstein, Zee YC. Review of veterinary microbiology. Blackwell scientific publications INC. 1990: 9-11.
- Foweler ME, Miller RE. Clostridial disease in all Taxa. In: Zoo and Wild Animal Medicine, 5th ed. USA: Elsevier Science. 2003: 712-714.
- Immerseel FV, Buck JD, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrock F, Ducatelle R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian pathology* 2004; 33(6): 537-549.
- Jones JC, Hunt RD, King NW. Veterinary Pathology. 6th ed. 1997: 421.
- Kreidl KO, Green GR, Wren SM. Intravascular Hemolysis from a *Clostridium perfringens* Liver Abscess. Images for surgeons. *J Am Coll Surg* 2002; 194(3): 387.
- Kwon YK, Lee YJ, Mo IP. An outbreak of necrotic enteritis in the ostrich farm in Korea. *J Vet Med Sci* 2004; 66(12): 1613-1615.
- Moore JE, McCalmont M, Xu J, Nation G, Tinson AH, Crothers L, Harron DW. Prevalence of faecal pathogens in calves of racing camels (*Camelus dromedarius*) in the United Arab Emirates. *Trop Anim Health Prod* 2002 ; 34(4) 283-287.
- Netherwood T, Binns M, Townsend H, Wood JL, Mumford JA, Chanter N. The *Clostridium perfringens* enterotoxin from equine isolates; its characterization, sequence and role in foal diarrhoea. *Epidemiol Infect* 1998; 120(2): 193-200.
- Nowak RM. Walker's Mammals of the world vol II. 6th ed. Johns Hopkins University Press. 1999: 1067-1072.
- Pizarro M, Hofle U, Rodriguez-Bertos A, Gonzalez-Huecas M, Castano M. Ulcerative enteritis (quail disease) in lorries. *Avian Dis* 2005; 49(4): 606-608.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby. 1998: 204-206.
- Sknavis C, Yanko WA. *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Marine pollution bulletin* 2001; 42(1): 31-35.
- Uzal FA. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerob* 2004; 10(2):135-143.
- Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35(1): 228 - 232.