

< Case Report >

## 하절기 급사 돼지의 *Clostridium novyi* 진단 및 분리

정창기 · 서병주 · 김원일\*  
전북대학교 수의과대학 생체안전성연구소

### Diagnosis on sudden death cases during summer season and isolation of *Clostridium novyi*

Chang-Gi Jeong, Byoung-Joo Seo, Won-Il Kim\*

College of Veterinary Medicine and Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

(Received 24 May 2016; revised 7 June 2016; accepted 9 June 2016)

#### Abstract

*Clostridium novyi* (*C. novyi*) is a gram positive, non-capsulated, motile, obligatory anaerobe that produces endospores. Both *C. novyi* type A and B produce a bacteriophage encoded lethal alpha toxin which belongs to a family of large clostridial cytotoxins. These large clostridial cytotoxins of *C. novyi* bind to the uncharacterized receptors on host vascular endothelial cells, which leads to the loss of integrity of the vascular endothelium with subsequent edema, refractory hypotension, organ failure, and sudden death. A total of 13 sudden death cases were submitted to Chonbuk National University-Veterinary Diagnostic Center between June and October, 2015. The samples, mainly liver, were collected in sterile vials after necropsy and processed within 12~24 hours for diagnosis, isolation and identification of *C. novyi*. All of the 4 gram positive samples showed amplification by PCR. Out of 4 positive samples, 3 were detected to be *C. novyi* type B and 1 was detected as *C. novyi* type A. Based on the 16S rDNA sequence analysis, 1 case (150564) showed 99% similarity with *C. novyi* type A while other 3 cases (150388, 150557 and 150775) presented 99% similarity with *C. novyi* type B. Based on the results, *C. novyi* was found to be prevalent in Korean pig farms and causes sudden death to finishing pigs or sows during summer season. Thus, *C. novyi* should be considered for differential diagnosis on sudden death cases during the summer season.

**Key words :** *Clostridium novyi*, Sudden death cases, Summer season, Differentiation PCR, Flagellin genes

## 서 론

최근 기후 변화에 의해 하절기 동안 고온 다습한 환경이 장기간 지속됨에 따라 비육돈 및 모돈의 급사가 빈번히 보고가 된다. 급사를 일으키는 원인체로는 주로 *Clostridium spp.*과 시가 독소 생산 대장균(*Shiga toxin producing E. coli*)과 같은 독소를 산생하는 세균이거나 *Salmonella Choleraesuis* 등의 폐혈증을 유발하는 세균들이 일반적으로 알려져 있다. 따라서 양돈

산업에 큰 손실을 일으키고 있는 다양한 세균의 정확한 감별 진단이 필요한 실정이다.

*Clostridium novyi* (*C. novyi*)는 비육돈 및 모돈의 급사를 일으키는 세균 중 하나로써, 1894년 미시간 대학의 Frederick Novyi 박사가 기니피그에서 처음 분리하였다(Aronoff 등, 2013). *C. novyi*는 절대 혐기조건에서만 생육이 가능한 그람 양성균이고 생육 환경이 맞지 않을 경우 아포를 형성하는 세균이다. 최근 보고에 따르면, *C. novyi*는 사람과 동물에게 모두 영향을 끼치고 있다. *C. novyi*는 다양한 환경에 널리 퍼져 있으며, 특히 토양과 퇴적물에 많이 존재한다(Skarin

\*Corresponding author: Won-Il Kim, Tel. +82-63-270-3981,  
Fax. +82-63-270-3780, E-mail. kwi0621@jbnu.ac.kr

등, 2014).

*C. novyi*는 산생하는 독소를 기반으로 하여, A, B, C 그리고 D type으로 나뉜다. *C. novyi* A type은 alpha, gamma, delta, epsilon toxin을 생산하고, *C. novyi* B type은 alpha, beta, zeta toxin을 생산한다. *C. novyi* type C는 gamma toxin만 생산한다(Skarin 등, 2014). *C. novyi* type D는 *Clostridium haemolyticum*이라고 불리며 beta, eta, theta toxin을 생산한다. *C. novyi* type A는 사람과 동물에게서 가스괴저를 유발시키며, *C. novyi* type B는 양, 소, 모돈에서 간 괴사를 유발시킨다고 보고되어 있다. *C. novyi* type C는 실험 조건에서는 비 병원체로 분류가 되며, *C. novyi* type D는 송아지에서 haemoglobinuria를 유발한다고 알려져 있다(Brazier 등, 2002; Eklund 등, 1976; Sasaki 등, 2001; Skarin 등, 2014; Smith 등, 1975).

*C. novyi*의 주된 독소는 type A와 B가 가지고 있는 alpha toxin이며, 이는 bacteriophage에 독소 유전자가 내제되어 있다(Skarin 등, 2014). Alpha toxin은 숙주의 혈관 내피세포의 불특정한 수용기에 결합하여 혈관 내피세포를 손상시키고 부종을 유발하며, 내화성 저혈압과 조직을 괴사시키고 끝내 죽음에 이르게 한다(Aronoff 등, 2013). Alpha toxin을 산생하는 *C. novyi* type A와 B는 주로 고온 다습한 여름철 비육돈 및 모돈에 영향을 끼치며, 생육조건이 맞지 않을 경우 아포 형태로 환경에 존재하게 된다. 이러한 아포가 비육돈 및 모돈의 장 내로 들어가 발아를 하여 혈관이 소실되고 발아 된 *C. novyi*는 장 내로 들어가 간 조직의 괴사를 유발한다. 따라서, 비육돈 및 모돈의 폐사 시, 양돈농장의 경제적 손실이 큼으로 빠르고 정확한 진단과 후속조치가 필요한 실정이다(Duran 등, 1997; García 등, 2009).

본 연구는 고온 다습한 여름철 국내 양돈장으로부터 확보된 급사 비육돈 및 모돈 진단 케이스로부터

급사의 원인 세균을 진단하였으며, 특히 *C. novyi*에 대한 진단 및 균 분리를 국내 최초로 실시하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

2015년 6월부터 10월까지 전북대학교 동물질병진단센터로 의뢰된 총 13건의 급사비육돈 및 모돈 진단 케이스를 확보하였다. 급사 비육돈 및 모돈의 주요 장기는 국내 양돈장으로 부터 24시간 이내에 냉장 상태로 전달 받았다.

### *C. novyi* 진단을 위한 감별 PCR

급사 돼지의 주요 장기로부터 *C. novyi* 진단을 위해 PCR을 수행하였다. *C. novyi* 진단을 위한 primer는 Table 1과 같다(Sasaki 등, 2002). *C. novyi*의 DNA 추출은 *C. novyi*가 배양된 RCM 액체배지의 배양액 200  $\mu$ L를 1.5 mL tube에 담아 100°C에서 10분간 반응(boiling methods) 하고, 10,000 g로 5분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다.

PCR 검사는 3  $\mu$ L template DNA와 1  $\mu$ L의 각 10 pM primer, 17  $\mu$ L DW를 PCR premixture (AccuPower<sup>®</sup> Multiplex PCR PreMix, Bionneer, Daejeon, Korea)에 첨가하여 최종 volume이 20  $\mu$ L가 되도록 하여 실시하였다. PCR 반응은 SimpliAmp Thermal Cycler (Life technologies, Carlsbad, California, USA)를 사용하였으며, 반응 조건은 pre-incubation을 94°C에서 5분간 반응한 후 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 56.5°C에서 1분, extension 72°C에서 1분으로 30회 반

Table 1. Primer information used in the study

Bacterial strain primer	Sequence	Position
<i>C. novyi</i> type A		
FlanaFF	5'-CTTAAAAATTC AAGGAGGAATT-3'	1~22
FlanaR	5'-CGCCTACTTGGAAAAGTTACTC-3'	472~452
<i>C. novyi</i> type B		
FlanbFF	5'-AAATTC AAGGAGGAATTTTA-3'	1~20
FlanbR	5'-TTATGCTAACTTTAGCTGCGTC-3'	551~530
<i>C. haemolyticum</i>		
FlahaFF	5'-CACAAAGGATCAAGGAGGC-3'	1~19
FlahaR	5'-CTGCTGTACCTTCTATGAACC-3'	819~799

복하고 72°C에서 5분간 반응하였다. PCR 수행 후 PCR 산물 10 µL를 2% agarose gel에 Red Safe™ (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea) 첨가하여 전기영동을 실시하였다.

### C. novyi 배양

의뢰 가검물(간이나 장)을 여러 부분 절개를 하여 내부의 병변을 확인 후, 의심되는 병변 주위의 조직 1 g을 마쇄하여 phosphate buffer saline (PBS) 9 mL에 넣어 주었다. 조직 유제액을 100°C에 10분간 가열하고 그 상층액을 Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Becton and Dickinson Company, Sparks, MD, USA) 218081)에 1 mL 접종하여 절대 혐기조건에서 37°C, 3일간 정치 배양하여 이번 연구에 사용하였다. 배양된 RCM 액체배지에 일회용 백금이(Loop & Needles)를 이용하여 RCM 고체배지와 5% sheep blood agar (혈액배지, Kisan Biotech, Seoul, Korea)에 희선도말을 실시하고, 절대 혐기조건에서 37°C, 3일간 정치 배양을 하였다. 혈액배지에서 beta 용혈을 나타내는 집락 (Brazier 등, 2002)을 PCR로 *C. novyi*를 검증 하였으며, 새로운 RCM 고체배지에 희선도말법으로 순수분리 하였다.

### C. novyi 동정

PCR로 검증되어 순수 분리된 *C. novyi*의 단일 집락의 형태학적 관찰을 위해 그람 염색을 실시하였다.

염색이 완료된 후, 1000배 대물렌즈로 관찰하였다. 순수 분리된 *C. novyi*의 단일 집락은 DNA extraction kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 DNA를 추출 하였다. 추출된 *C. novyi* DNA의 염기서열 분석은 16S rDNA sequence (염기서열분석: 바이오팩트®, Daejeon, Korea)를 이용하였으며, 분자생물학적 상동성을 확인 하기 위하여 미국 국립정보센터(NCBI)의 nucleotide BLAST를 사용하여 GenBank에 등록된 16S rDNA 유전자들과 비교하였다.

## 결 과

### C. novyi 배양

2015년 6월부터 10월까지 급사한 비육돈 및 모돈 시료를 13개를 확보하였다. 확보된 진단 케이스의 주요 장기 조직으로부터 베타 용혈을 나타내는 *C. novyi* 4주를 분리하였다. 분리된 *C. novyi* 4주를 희선 도말법으로 순수분리 한 결과 균 집락의 모양은 불규칙적이며 균 집락의 경계가 불분명하였다. 또한 *C. novyi*의 type 별로 colony의 증식하는 모양이 상이하였다 (Fig. 1). 순수 분리된 *C. novyi* 4주의 colony를 그람염색을 한 결과, 모두 그람양성 간균을 관찰 할 수 있었으며, 아포가 형성 중인 것으로 보이는 균체들도 관찰되었다(Fig. 2).

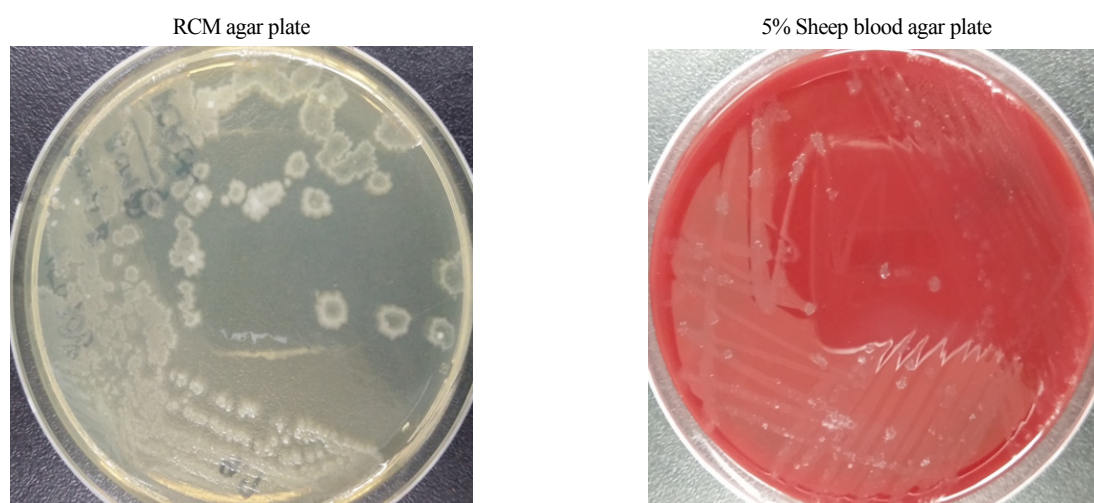


Fig. 1. Pure culture of *C. novyi* on RCM and Sheep blood agar plates.

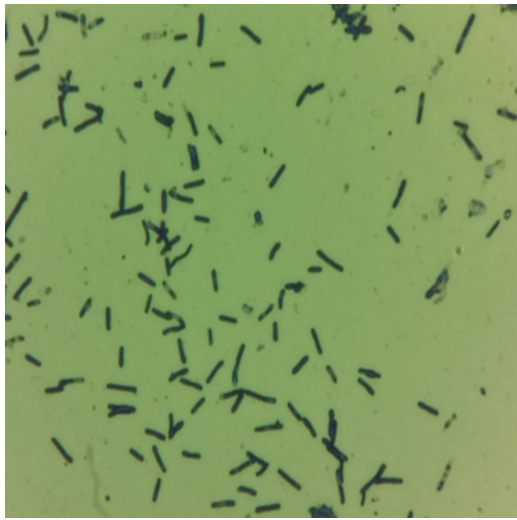


Fig. 2. Gram staining of *C. novyi* colonies from pure cultures.

**C. novyi** 감별 PCR 검사 결과

유전자 증폭은 *C. novyi*에 대한 type specific primer 을 사용하였고, 유전학적으로 상동성이 높은 *C. haemolyticum*에 대한 specific primer도 같이 사용하였다. 그 결과 총 4개의 케이스에서 *C. novyi* 양성으로 진단 되었다. 특히, 150564에서는 *C. novyi* type A가 검출되었고, 150388, 150557, 150775에서는 *C. novyi* type B가 검출되었다. 모든 케이스에서 *C. haemolyticum*은 검출되지 않았다(Fig. 3).

**세균 동정을 이용한 C. novyi** 검증

4개의 급사 케이스에서 분리된 *C. novyi*에 대한 분자생물학적 유사성을 확인한 결과, 150338, 150557, 150775의 경우 *C. novyi* type B (GenBank. AB 857215.1)

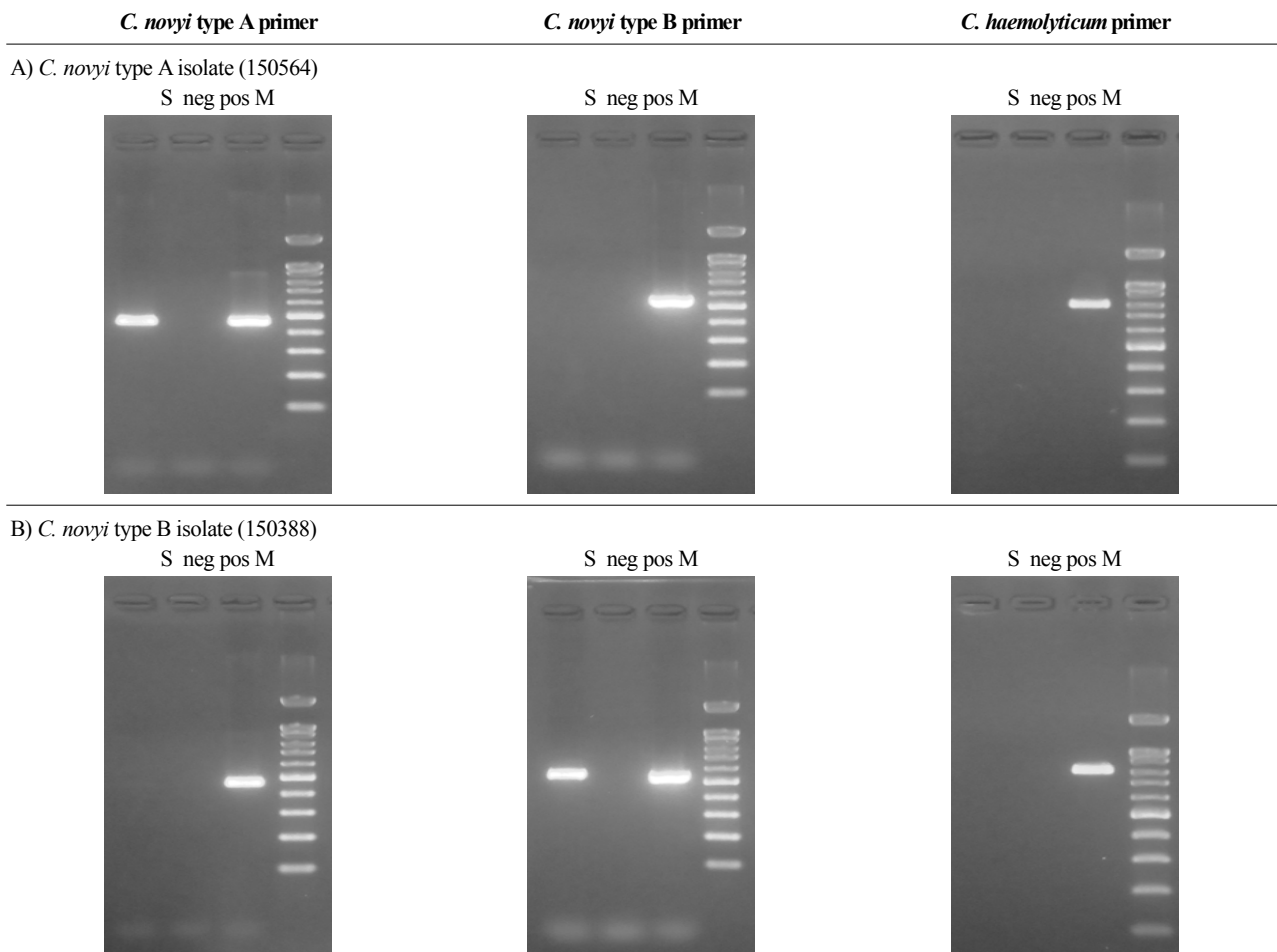


Fig. 3. PCR amplifications of *C. novyi* and *C. haemolyticum* for differential diagnosis. S: Sample, neg: Negative, pos: Postive, PCR product size: *C. novyi* type A-472 bp, *C. novyi* type B-551 bp, *C. haemolyticum*-819 bp.

와 99% 이상의 유사성을 확인할 수 있었고, 150564의 경우 *C. novyi* type A (GenBank. NR 113022.1)와 99% 이상의 유사성을 확인하였다.

## 고 찰

국내 여름철 고온 다습한 환경에 의해 국내 양돈장에서 발생하는 비육돈 및 모돈의 급사 유발 원인균에 대한 정확한 진단이 필요한 실정이다. 특히 급사 원인 세균중 *C. novyi*의 경우 급사 후 빠른 시간 내에 진단이 되지 않으면 원인체에 대한 진단이 어려운 실정이다.

*C. novyi*는 8가지 서로 다른 가용성 항원의 생산과 사람과 동물에게 질병을 일으키는 정도에 따라 A~D까지 총 4가지 type으로 분류되어지며, 각 type은 다른 양상의 증상이 나타난다(Borrmann 등, 1999; Eklund 등, 1976). *C. novyi* type A, B 둘 다 강력한 alpha 독소를 가지며, alpha 독소는 불특정한 숙주 혈관내피세포 수용기에 결합하고 그 결과 혈관내피세포의 손실과 부종, 심각한 저혈압, 조직 손상과 급사를 초래한다(Skarin 등, 2014).

2015년 6월부터 10월까지 총 13건의 *C. novyi* 의심 급사케이스를 전북대학교 동물질병진단센터로부터 제공 받았다. 이 중 *C. novyi* 양성을 진단된 케이스는 총 4건이며, 그 외에도 *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus dysgalactiae* 등이 분리되었다. 이번 연구는 *C. novyi* 양성 진단 케이스로 부터 *C. novyi*를 순수 분리하고, 특성 연구를 진행하였다.

*C. novyi*의 PCR 진단은 flagellin genes (*fliC*)을 이용한 primer을 사용하였으며, 이 유전자는 chromosome에 존재하며, *Clostridium* 종들 간에 비교적 잘 보존되어있는 gene이다(Sasaki 등, 2002). 이번 연구를 통해 분리된 150388, 150557, 150775는 *C. novyi* type B로 검출되었고, 150564는 *C. novyi* type A로 검출되었다. 하지만, 16 rDNA 유전자를 이용한 유전적인 특성 분석 결과, *C. novyi* type A, *C. novyi* type B, *C. novyi* type C, *C. botulinum* type C와 D 그리고 *C. haemolyticum* 사이에는 유전적 상동성 99%로 매우 높아 명확한 유전적인 분석을 완성하기 위해서는 분리균주의 전체 염기서열 분석이 필요할 것으로 판단된다.

## 결 론

이번 연구는 국내 다양한 지역에서 확보된 *C. novyi* 의심 케이스에 대하여 진단을 실시하였으며, *C. novyi* 양성 진단된 케이스에서 *C. novyi*의 분리를 진행하였다. 총 13건의 *C. novyi* 의심 케이스에서 총 4주의 *C. novyi*를 분리하였으며, 1주는 *C. novyi* type A이고 3주는 *C. novyi* type B로 확인 되었다.

최근 기후변화에 의해 국내 하절기 동안 고온 다습한 환경이 장기간 지속되는 실정이며, 국내의 비육돈이나 모돈의 급사가 일어나고 있어 급사의 주요 원인균에 대한 정확한 진단이 필요한 실정이다. 특히, *C. novyi*에 대한 정확한 진단과 이들의 alpha 독소 증명법을 확립하고 다른 유사한 *Clostridium spp.*와의 정확한 감별이 필요한 실정이다.

이번 연구의 결과를 토대로 *C. novyi*의 분리를 하여 추가적인 연구를 진행 후, 한국에 맞는 *C. novyi*의 bacterin toxoid 백신을 개발 할 수 있는 연구의 초석이 될 것이라 사료되어진다.

## 감사의 글

이번 연구는 농촌진흥청 국가농업 R&D 어젠다 연구개발사업(관리번호: PJ010530)의 지원에 의해 수행된 것입니다.

## REFERENCES

- Aronoff DM. 2013. Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease. Anaerobe 24: 98-101.
- Borrmann E, Schulze F. 1999. Detection of Clostridium novyi type B  $\alpha$  toxin by cell culture systems. FEMS Immunology & Medical Microbiology 24(3): 275-280.
- Brazier JS, Duerden BI, Hall V, Salmon JE, Hood J, Brett MM, George RC. 2002. Isolation and identification of Clostridium spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. Journal of medical microbiology 51(11): 985-989.
- Duran CO, Walton JR. 1997. Clostridium novyi sudden death in sows: toxemia or post mortem invader? Pig Journal (United Kingdom).
- Eklund MW, Poysky FT, Peterson ME, Meyers JA. 1976. Relationship of bacteriophages to alpha toxin production in Clostridium novyi types A and B. Infection and im-

- munity 14(3): 793-803.
- García A, Ayuso D, Benítez JM, García WL, Martínez R, Sánchez S. 2009. Clostridium novyi infection causing sow mortality in an Iberian pig herd raised in an outdoor rearing system in Spain. *Journal of Swine Health and Production* 17(5): 264-269.
- Sasaki Y, Takikawa N, Kojima A, Norimatsu M, Suzuki S, Tamura Y. 2001. Phylogenetic positions of Clostridium novyi and Clostridium haemolyticum based on 16S rDNA sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51(3): 901-904.
- Sasaki Y, Kojima A, Aoki H, Ogikubo Y, Takikawa N, Tamura Y. 2002. Phylogenetic analysis and PCR detection of Clostridium chauvoei, Clostridium haemolyticum, Clostridium novyi types A and B, and Clostridium septicum based on the flagellin gene. *Veterinary microbiology* 86(3): 257-267.
- Skarin H, Segerman B. 2014. Plasmidome interchange between Clostridium botulinum, Clostridium novyi and Clostridium haemolyticum converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens. *PloS one* 9(9), e107777.
- Smith L. DS. 1975. *The pathogenic anaerobic bacteria*. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill.