大韓獸醫學會誌(1993) 第33券 第3號
Korean J Vet Res (1993) 33(3) : 419~427

國內 돼지의 *Clostridium perfringens* type C 감염증에 관한 연구

예재길 · 박경윤 · 조성근*
바이엘동물의약연구소
가축위생연구소*
(1993년 7월 12일 접수)

Studies on the *Clostridium perfringens* type C infection of pig in Korea

Jae-gil Yeh, Kyoung-yoon Park, Soung-kun Cho*
Bayer Veterinary Medical Research Institute
*Veterinary Research Institute**
(Received July 12, 1993)

Abstract : Thirteen strains of *Clostridium perfringens* were isolated from the pigs with hemorrhagic enteritis. The characteristics of the outbreaks, clinical signs and lesions were examined. The biochemical properties, type of toxin and susceptibility to antimicrobial agents of the isolates were investigated.

The results could be summarized as follows ;

1. Almost of the pigs affected with hemorrhagic enteritis, 17 cases examined from 1989 to 1992, were piglets less than 7 day old.
2. The average mortality rate of piglet less than 7 day old affected with hemorragic and necrotic enteritis was 48.5%.
3. The clinical signs of pigs with hemorrhagic enteritis were depression, hemorrhagic diarrhea, anemia and dehydration. Necropsy of the infected pigs showed typical hemorrhage of upper intestine and necrosis of mucosal membrane.
4. The characteristic biochemical properties of the isolates were 2-band hemolysis, positive reaction of reverse CAMP test and formation of LV precipitate in egg yolk medium.
5. The toxin type of the 13 isolates, investigated by mouse inoculation test, was all type C strains of *Clostridium perfringens*.
6. In susceptibility test to antimicrobial agents, 13 isolates of *Clostridium perfringens* were highly sensitive to ampicillin, enrofloxacin(Baytril), cephalothin, penicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Key words : *Clostridium perfringens*, hemorrhagic enteritis, biochemical properties, antimicrobial susceptibility.

서 론

돼지의 *Clostridium perfringens* type C 감염증은 1주령이하의 仔豚에서 급성의 경과를 취하며 원기소실, 출혈성 설사, 괴사성 장염을 특징으로 하는 소화기성 전염병이다.[1]

돼지의 *Clostridium perfringens* type C 감염증은 영국에서 Field와 Gibson에 의하여 1955년 최초로 발병 보고되

었으며[2] 헝가리, 미국, 덴마크, 독일, 네덜란드, 카나다, 일본등지에서도 보고되었다.[3~6]

우리나라에서는 曺 등이 仔豚과 송아지의 *Clostridium perfringens* 감염증에 관하여 조사·연구하였다.[7,8]

돼지에서 분리한 *Clostridium perfringens* type C는 porcine subtype으로써 주로 alpha(α) toxin과 beta(β) toxin을 생성하므로[9,10] 感染豚은 腸粘膜의 괴사를 동반하는 급성출혈성장염이 특징이다.[11]

최근 돼지에서 *Clostridium perfringens* type C 감염증의 발생이 증가되고 있으며 경제적 피해가 커지고 있다.

本 硏究는 돼지에서 出血性 腸炎 病巢로부터 *Clostridium perfringens* type C를 분리하여 여러가지 생화학적 성상 및 혈청학적 검사를 하여 동정하였으며, 항균제에 대한 감수성과 발병농장의 역학적 상황을 아울러 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 돼지의 出血性腸炎에서 *Clostridium perfringens* type C를 분리하기 위하여 1989년부터 1992년까지 바이엘동물의약연구소에 의뢰된 돼지 가검물 404例를 조사하였다.

細菌의 分離 : 돼지의 出血性 腸炎 病巢에서 가검재료를 채취한 후 sheep blood agar에 도말하여 gas pak(BBL)에 넣고 혐기배양하였다. 37℃에서 24시간 배양후 二重 溶血帶를 보이는 집락수가 우세하게 많거나 단일 집락임을 확인하고 이를 순수배양하여 Hogh[9,10,13]의 방법에 따라 생화학적 성상검사를 실시하였다.

공시균주의 항독소 : 본 실험에 사용한 *Clostridium perfringens* type C균주는 미국 NVSL(National Veterinary Service Labs : Iowa)에서 분양받은 *Clostridium perfringens* A, B, C 및 D형이며 항독소는 Granum과 Whitaker[13], 曺 등[7,8]의 방법에 따라 제조된 것을 사용하였다.

Reverse CAMP test : *Streptococcus agalactiae*에 의한 分離株의 용혈 증폭현상을 확인하기 위하여 Hansen과 Elliott[14]의 방법으로 reverse CAMP(Christie, Atkins and Munch-Peterson)test를 실시하였다. 즉, *Streptococcus agalactiae*(ATCC 3813)와 *Clostridium perfringens* 分離株를 서로 교차방향으로 혈액배지에 접종하여 배양한 후 두 균주의 근접부위에서 탄환모양의 증폭된 용혈현상을 관찰하였다.

LV preciptitate 반응 : LV(lecitho-vitellin)precipitate 반응은 Gubash[15]의 방법에 따라 실시하였다. 즉, E-Y-TS(egg yolk-triple salt)medium에 공시균을 접종하여 집락주위에 백탁대를 관찰하였다.

毒素型 調査 : 分離한 *Clostridium perfringens*의 독소형을 조사하기 위하여 Hogh[9,10], Barnes와 Moon[3], Atuma[16], Smith[17]의 방법에 따라 실험하였다.

분리주를 cooked meat medium(BBL)에서 18시간 배양한 후 75℃에서 30분간 열처리한 다음, Duncan and Strong(DS) medium[18]에 계대 배양하여 독소가 많이 산생되게 하였다. DS medium에서 20시간 배양하여 원심분리한 상층액을 0.45μ membrane filter로 여과한 다음, 여과액과 독소별 항독소를 혼합하여 실온에 30분간 작용후 독소별로 mouse에 3마리씩 복강주사하였다. 접종후 24시간동안 폐사여부를 관찰하였다.

항균물질에 대한 감수성 조사 : 각종 항균물질에 대한 감수성 조사는 disk 확신법으로써 Rood 등[19]의 방법에 따랐다. 공시 disk는 BBL 社에서 제조한 것으로 접종후 24시간 혐기배양 하여 증식억제대를 판독하였다.

결 과

발생상황 : 1989년부터 1992년까지 한국바이엘화학 동물의약연구소에 의뢰된 병성감정건 중에서 임상증상, 부검소견, 균 분리·동정을 통하여 출혈성 장염이 발생한 것으로 확인된 17개 발병돈군을 조사한 결과 출혈성 장염은 대부분 7일령이하의 자돈에서 발생하였으며(Table 1), 폐사두수 확인이 가능했던 발병돈군에서 포유자돈의 폐사율을 조사한 바 평균 48.5%로 나타났다(Table 2).

***Clostridium perfringens*를 分離한 돼지의 증상 및 병변** : *Clostridium perfringens* 감염증의 임상증상은 갑작스런 원

Table 1. Age at onset of hemorragic enteritis in the piglets infected with *Clostridium perfringens*

Year	No. of outbreak herds	Age at onset of enteritis		
		<1 Week	1–4 Week	> 4 Week
1989	2	2	–	–
1990	2	1	1	–
1991	7	5	1	1
1992	6	4	1	1
Total	17	12	3	2

Table 2. Mortality of piglet less than 7 day old affected with hemorragic and necrotic enteritis

Outbreak farm No.	No.piglets affected litter	Mortality	
		No.	percent
1	9	9	100
2	12	6	50
3	125	56	44.8
4	10	7	70
5	8	3	37.5
6	32	14	43.8
Total	196	95	48.5

Table 3. Biochemical properties of 13 *Clostridium perfringens* isolates compared with *Clostridium perfringens* type C reference strain

Biochemical properties	Reference strain	Isolated strains
Gram staining	Positive, rod	Positive, rod
Cooked meat medium	Gas and foam formation	Gas and foam formation
Litmus milk	Stormy fermentation	Stormy fermentation
Double zone hemolysis	+	13/13*
Lecithinase	+	13/13
Reverse CAMP test	+	13/13
H_2S gas	−	0/13
Indol	−	0/13
Motility	−	0/13
Glucose	+	13/13
Lactose	+	13/13
Urease	−	0/13

* No. of positive/No. of examined strains.

Table 4. Toxin type of isolated *Clostridium perfringens* from the infected piglets

Strain	No. of toxins tested	Antitoxin types(Neutralization test)			
		A	B	C	D
Isolated strain	13	−	−	13	−
Reference strain	2	−	−	2	−

Table 5. Susceptibility of 13 isolates of *Clostridium perfringens* to antimicrobial drugs

Drugs	No. of susceptible strains	% of susceptible strains
Amikacin	4	30.8
Ampicillin	10	76.9
Baytril	13	100
Cephalothin	8	61.5
Colistin	4	30.8
Erythromycin	4	30.8
Gentamycin	4	30.8
Neomycin	1	7.7
Penicillin	7	53.8
Streptomycin	1	7.7
Trimethoprim-sulfamethoxazole	8	61.5
Tetracycline	1	7.7

기소실, 포유불량, 혈액섞인 설사, 빈혈, 탈수 및 위축을 보였으며 폐사된 돼지는 소장의 심한 출혈 및 장점막의 괴사를 관찰할 수 있었다(Fig 1).

21일령 자돈에서는 장출혈과 함께 腸管內에 다량의 기포와 가스가 차 있었다(Fig 2).

分離株의 生化學的 性狀 : 돼지에서 분리한 *Clostridium perfringens* 13주와 표준주 *Clostridium perfringens* type C의 생화학적 성상을 비교한 결과 gram 양성의 간균(Fig 3), 二重 溶血性(Fig 4), urease 음성, H_2S 음성, glucose 및 lactose 양성 등의 성상을 보여 분리주와 표준주의 성상은 일치하였다(Table 4).

*Streptococcus agalactiae*에 의한 분리주의 용혈 증폭현상을 관찰하기 위하여 reverse CAMP test를 한 결과 표준주와 분리주 모두 탄환모양의 증폭된 용혈현상을 나타내었다(Fig 5).

LV precipitate 반응을 하였던 바 Fig 6과 같이 EY-TS 배지에서 分離株와 표준주는 집락주위에 큰 백탁대를 형성하였다.

毒素型 調査 : *Clostridium perfringens* 분리주를 배양한 상층액과 *Clostridium perfringens* type C 항독소를 반응시킨 혼합액을 주사한 mouse는 48시간동안 생존하였다. 그러나 *Clostridium perfringens* type C 이외의 항독소와 말

혈청 등을 분리주의 배양상층액에 혼합하여 주사한 mouse는 주사 2~3시간부터 움직임이 둔해지고 자극에 반응이 없다가 폐사하여 분리균의 toxin은 모두 C형으로 판정되었다(Table 4).

항균제에 대한 감수성 : 分離株 *Clostridium perfringens* 13주의 각종 항균제에 대한 감수성은 Table 5와 같다.

Ampicillin, baytril, cephalothin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole 등의 항균제에 감수성이 우수하였다.

고 찰

돼지에서 出血性 腸炎은 여러가지 원인에 의하여 발병되고 있지만 *Clostridium perfringens*가 중요한 원인균으로 작용하고 있음을 확인한 후 많은 연구가 진행되었다.[1,2,5,6,15,20]

Clostridium perfringens 감염증은 出血性腸炎과 壞死性出血性腸炎도 관찰되었으며[10,11], Bergeland 등[4]이 조사한 성적은 평균감염률 52.4%, 평균폐사율 26.4%로 나타났다. 또 Hogh[1]의 조사에서도 폐사율을 45.7~66.7%로 보고하였다.

본 조사에서도 *Clostridium perfringens* 감염증은 出血性壞死性 腸炎을 보였으며 주로 7일령 이하의 仔豚에서 발생하여 평균폐사율 48.5%를 나타내었다.

CAMP 시험법은 group B hemolytic Streptococci의 同定시험에 활용하고 있으나 *Clostridium perfringens*의 同定시험 목적으로 reverse CAMP 시험법을 활용하고 있다.[14] 본 실험에서도 분리주 모두 reverse CAMP 시험에서 양성반응을 보였다.

Gusbach[15,21]는 Clostridial 균속의 phospholipase C activity를 확인하고자 egg yolk agar plate에 가검균을 접종하여 95.5%이상 백탁대가 형성됨을 보고하였다. 본 실험에서도 분리주 모두 집락주위에 백탁대를 형성하였다.

*Clostridium perfringens*는 항독소의 중화력에 의한 구분으로써 type A, B, C, D, E로 나누고 있다.[22] Type A는 사람과 동물의 가스 괴저, type B는 양, 염소, 조류의 장독혈증 및 괴사성 장염, type C는 돼지, 양, 송아지에서 괴사성 출혈성 장염, type D는 양, 소의 장독혈증, type E는 양과 소에서 병원성이 있다.

여러 연구자들이 조사한 바에 의하면 *Clostridium perfringens* type A, B, C, D, E들은 각각 한가지 혹은 여러가지 독소를 생성하고 있다. 즉, type A는 alpha(α), type B는 alpha(α), beta(β), epsilom(ε), gamma(γ)독소, type C는 alpha(α), beta(β)가 주 독소이며, gamma(γ), delta(δ), theta(θ)독소, type D는 alpha(α), epsilon(ε)독소, type E는 alpha(α), iota(ι)독소를 생성하고 있다.[9,22]

돼지에서 분리한 *Clostridium perfringens*를 型別하였던 바 Barnes와 Moon[3]은 type B와 type C로 구분하였고, Azuma 등[16]은 분리주 6株 모두 type C로 구분하였다. Hogh도 돼지에서 분리한 23株 모두 type C로 구분하였으며, Meszaros도 24두의 돼지에서 분리한 *Clostridium perfringens* 모두 type C로 구분하였다.[20] 본 실험에서도 분리주 13株 모두 type C로 구분되었다.

*Clostridium perfringens*의 약제감수성 시험결과 penicilline, ampicillin, carbenicillin, ecphalothin 등에 감수성이 우수하다고 알려져 있다.[19,23~25]

본 실험에서도 분리주 3株의 항균제에 대한 감수성은 ampicillin, baytril, cephalothin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole에 감수성이 우수하였다.

*Clostridium perfringens*의 독소생성[26]과 병원성[27]에 관한 다양한 연구의 결과로써 Ripley 등[28]을 비롯한 여러 연구자들이 toxoid백신을 개발하여 실험하였던 바 예방효과가 우수하였다. 우리나라에서도 본 질병에 관한 계속적인 연구가 필요하며 효과적인 백신이 개발되어 실용화되기를 기대한다.

결 론

돼지에서 出血性 腸炎의 발생상황을 조사하고 발병돈에서 *Clostridium perfringens*를 분리하여 생화학적 성상, 독소형 및 각종 항균제에 대한 감수성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 1989년부터 1992년까지 17개 양돈장에서 出血性腸炎이 발생하였으며 주로 7일령 이하의 仔豚에서 발생이 많았다.

2. 출혈성 장염이 발생한 7일령이하의 자돈 폐사율은 평균 48.5%이었다.

3. 본 병의 임상증상은 원기소실, 혈액석인 설사, 빈혈, 탈수 등 이었으며 소장의 출혈 및 장점막의 괴사가 특징이었다.

4. 분리균은 2중 용혈성, reverse CAMP 양성, LV preciptitate 반응시 집락주의 백탁대를 형성하는 특징을 보였다.

5. 마우스 접종시험으로 분리균의 독소형을 조사하였던 바 분리주 13株 모두 *Clostridium perfringens* type C이었다.

6. 분리한 *Clostridium perfringesns* 13株의 각종 항균제에 대한 감수성은 ampicillin, baytril, cephalothin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole 등에 감수성이 우수하였다.

Legends for figures

Fig 1. Haemorrhagic necrotizing enteritis. Severe haemorrhages in the anterior part of the jejunum. Case no. 9129, age:5 days.

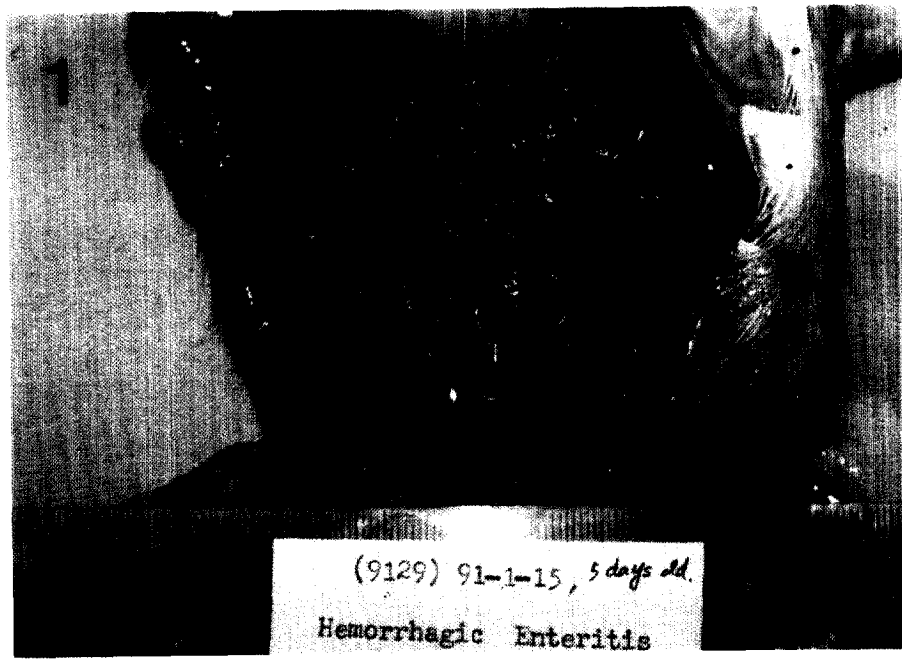
Fig 2. Haemorrhagic enteritis with emphysematous segment of jejunum. Case no. 90842, age:21 days.

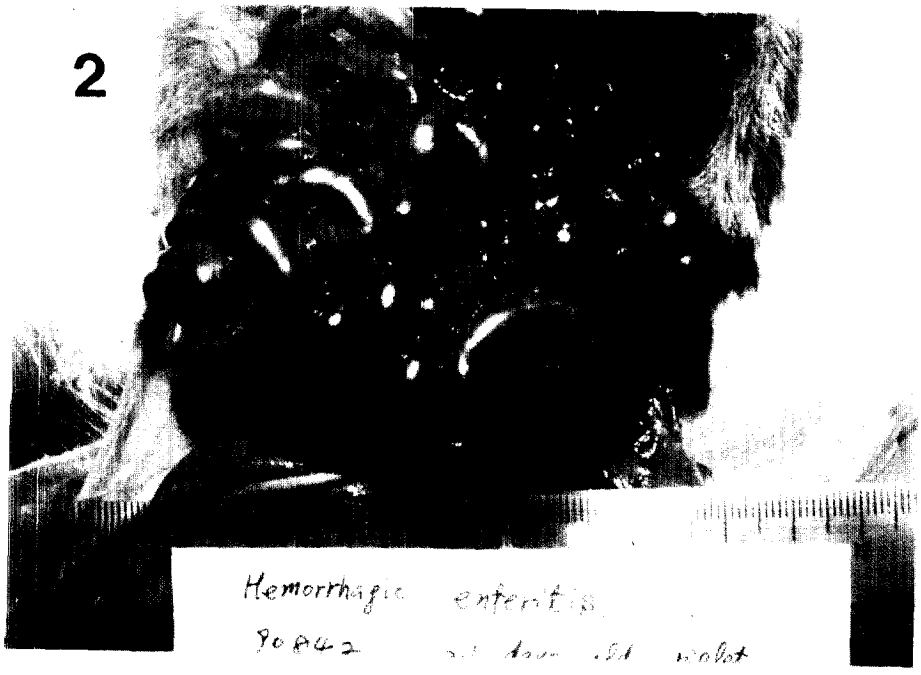
Fig 3. Morphology of *Clostridium perfringens* isolate from piglet by Gram stained smear(×1000).

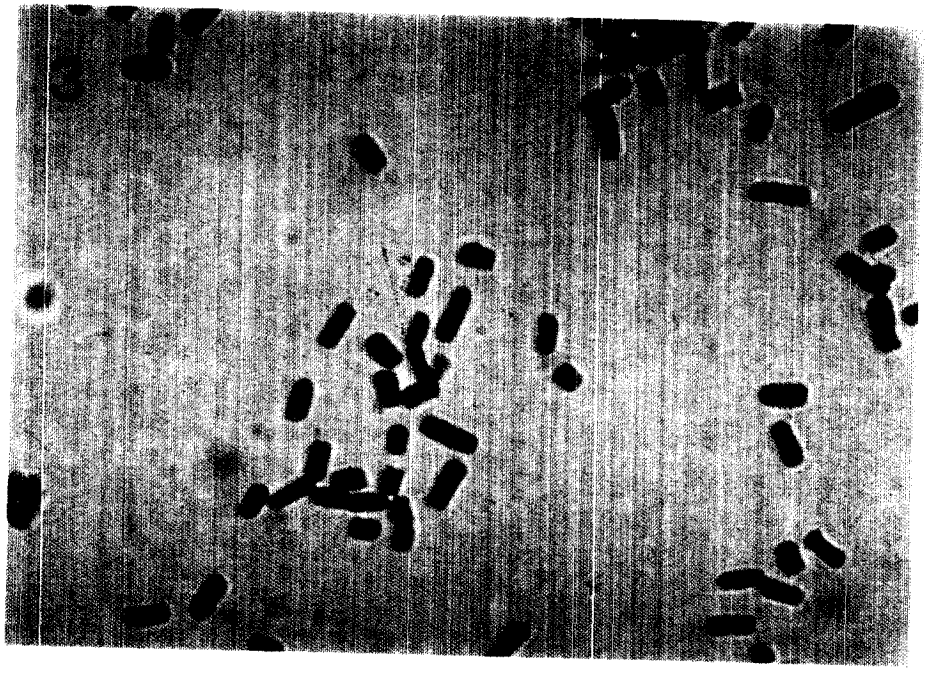
Fig 4. Showing 2-band haemolysis of *Clostridium perfringens* isolate on the sheep blood agar plate.

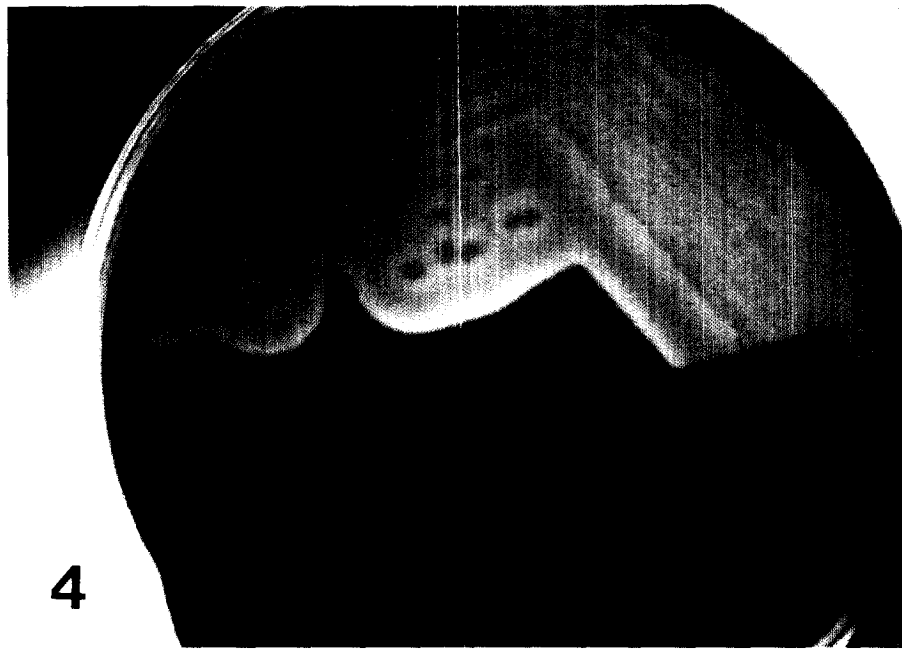
Fig 5. Zones of synergistic beta haemolysis were obtained with *Streptococcus agalactiae* and *Clostridium perfringens* isolates. ATCC 13813 : *Streptococcus agalactiae*, type C : *Clostridium perfringens* as reference strain, 358, 420 : Isolates of *Clostridium perfringens*.

Fig 6. Production of LV precipitate in EY-TS medium by *Clostridium perfringens*.



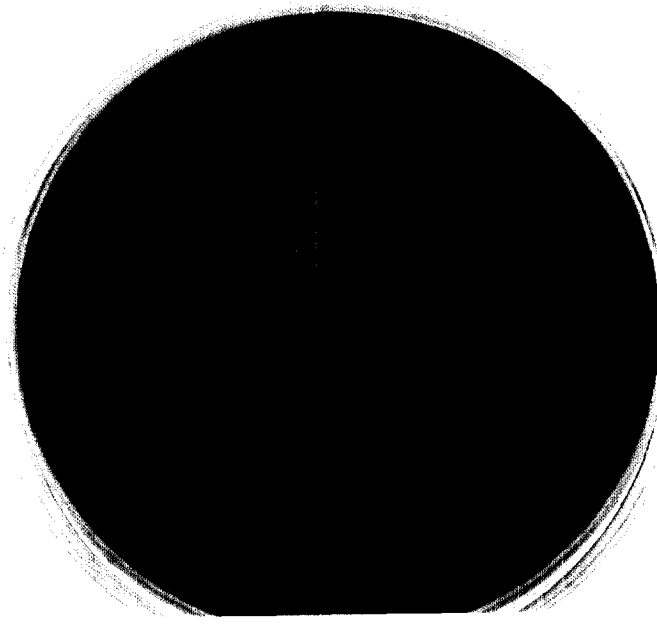

2
Hemorrhagic enteritis

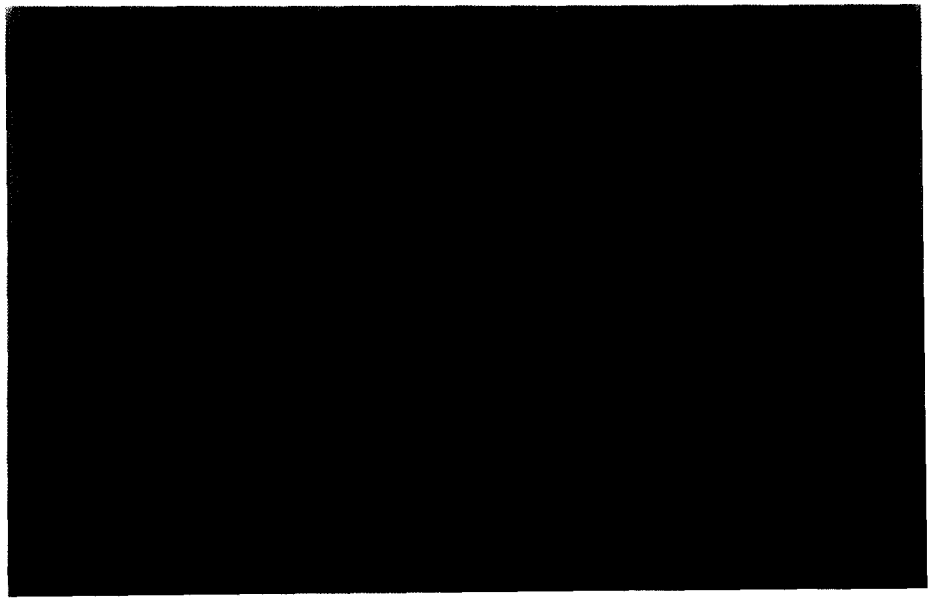




4

5





참 고 문 헌

1. Hogh P. Necrotizing infections enteritis in piglets, caused by *Clostridium perfringens* type C. Ⅱ. Incidence and clinical features. Acta *Vet Scand* 1967 ; 301～323.
2. Field HI, Gibson EA. Studies on piglet mortality. 2. *Clostridium welchii* infection. *The Veterinary Record* 1955 ; 67 : 31～35.
3. Barnes DM, Moon HW. Enterotoxemia in pigs due to *Clostridium perfringens* type C. *JAVMA* 1964 ; 144 : 1391～1394.
4. Bergeland ME, Dermody TA, Sorensen DK. Porcine enteritis due to *Clostridium perfringens* type C. I. Epizootiology and diagnosis. *proc US Livest Sanit Association* 1966 ; 70 : 601～606.
5. Bergeland ME. Necrotic enteritis in nursing piglets. *Amer Assoc Bet Lab Diagnosticinas* 1977 ; 20th annual proceeding : 151～158.
6. Morin M, Turgeon D, Jolette J, et al. Neonatal diarrhea of pigs in Quebec : Infectious Causes of Significant Outbreaks. *Can J Comp Med* 1983 ; 47 : 11～17.
7. 曺性根, 金鐘琰, 朴政文. 仔豚의 *Clostridium perfringens* 感染症에 관한 調査研究. 農試論文集(家畜衛生篇) 1991 ; 33 : 25～31.
8. 曺性根, 金鐘琰, 朴政文. *Colstridium perfringens*에 의한 송아지의 腸毒血症에 관한 研究. 韓國獸醫公衆保健學會誌 1990 ; 14 : 255～263.
9. Hogh P. Necrotizing infections enteritis in piglets, caused by *Clostridium perfringens*. type C. I. Biochemical and toxigenic properties of the Clostridium. *Acta Vet Scand* 1967 ; 8 : 26～38.
10. Hogh P. Necrotizing infection enteritis in piglets caused by *Clostridium perfringens* type C. Ⅲ. Bacteriological diagnosis. *Acta Vet Scand* 1969 ; 10 : 84～100.
11. Hogh P. Necrotizing infections enteritis in piglets, caused by *Clostridium perfringens* type C. Ⅲ. Pathological changes. *Acta Vet Scand* 1969 ; 10 : 57～83.
12. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. *Clostridium perfringens* 1988 ; eight edition : 223～229.
13. Granum PE, Whitaker JR. Improved method for purification of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. *App Environ Micro* 1980 ; 39 : 1120～1122.
14. Hansen MV, Elliott LP. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens* : Reverse

CAMP test. *J Clin Microbiol* 1980 ; 12 : 617~619.
15. Gubash SM. Improved egg yolk agar plate medium for the detection of clostridial phospholipase C activity. *Res Microbiol* 1991 ; 142 : 87~93.
16. Azuma R, Hamaoka T, Shioi H, et al. Case report of necrotic enteritis in neonatal pigs cause by *Clostridium perfringens* type C. *Jpn J Vet Sci* 1983 ; 45 : 135~137.
17. Smith L DS. Clostridial infections. In : Stephen BH. et al *Isolation* and *Identification of Avian Pathogens.* Endwell, New York, Creative Printing Company, Inc., 1980 ; 33~35.
18. Duncan CL, Strong DH. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens. Appl Microbiol* 1968 ; 16 : 82~89.
19. Rood JI, Maher EA, Somers EB, et al. Isolation and characterization of multiply antibiotic resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1978 ; 13 : 871~880.
20. Meszaros J, Pesti L. Studies on the pathogenesis of gastroenteritis in swine. *Acta Vet Acad Sci Hung* 1965 ; 15 : 465~470.
21. Gustafson C, Tagesson C, Phospholipase C from *Clostridium perfringens* stimulates phospholipase A_2-mediate arachidonic acid release in cultured intestinal epithelial cells (INT 407) *Scand J Gastroenterol* 1990 ; 25 : 363~371.
22. Sterne M, Warrack GH. The types of *Clostridium perfringens. J Path Bac* 1964 ; 88 : 279~383.
23. Martin WJ, Gardner M, Washington JA. *In vitro* antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolates from clinical specimens. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1972 ; 1 : 148~158.
24. Marrie TJ, Haldane EV, Swantee CA, et al. Susceptibility of anaerobic agents and demonstration of decreased susceptibility of *Clostridium perfrigens* to penicillin. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1981 ; 19 : 51~55.
25. Appelbaum PC, Chatterton SA. Susceptibility of anaerobic bacteria to ten antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1978 ; 14 : 371~376.
26. Bergeland ME. Pathogenesis and immunity of *Clostridium perfringens* type C enteritis in swine. *JAVMA* 1972 ; 160 : 568~571
27. Smith L DS. Virulence factors of *Clostridium perfringens. Review of Infectious Diseases* 1979 ; 2 : 254~260.
28. Ripley PH, Gush AF. Immunisation schedule for the prevention of infection necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* type C in piglets. *Vet Rec* 1983 ; 112 : 201~202.