

## 닭의 괴사성 장염 및 건강 계군에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 신속동정 및 독소형 분석

김홍집 · 강문일\* · 정운익

(주)미원 축산과학연구소  
전남대학교 수의과대학\*  
(1996년 5월 18일 접수)

### Rapid identification and toxin type analysis of *Clostridium perfringens* isolated from healthy or diseased stocks with necrotic enteritis in chicken

Hong-jib Kim, Mun-il Kang\*, Un-ik Chung

Miwon Institute of Animal Science, Ichon  
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju\*

(Received May 18, 1996)

**Abstract** : About *Clostridium perfringens* causing clinically necrotic enteritis or isolated from the intestinal contents of healthy chicken, We examined the usefulness of a rapid identification method by gas-liquid chromatography as well as the types of toxins. For this study, there were used 169 chickens including 116 broilers, 27 layers and 26 breeders which collected from 9 healthy flock and 21 diseased flock showing necrotic enteritis.

Among them, *Cl perfringens* was isolated from 30 chickens(17.8%) including 7 breeders(26.9%), 5 layers(18.5%) and 18 broilers(15.5%). Isolation of *Cl perfringens* was mainly from ceca (100%) and followed by small intestines(70.0%) and livers(16.7%), respectively.

Average concentration of the pathogen in intestinal contents was  $10^{3.8}$ CFU/g in cases occurring necrotic enteritis and on the contrary  $10^{3.8}$ CFU/g in healthy cases.

All isolates tested showed the same characteristics in biochemical tests compared to those in standard strain. Analysis of gas-liquid chromatography to volatile fatty acids produced by *Cl perfringens* in PYG broth showed the typical peaks of acetic and butyric acids compatible with the standard chromatogram and was confirmed as an effective and reliable tool for rapid identification of the bacteria.

Toxin types of 30 strains were mostly classified in A type(26 isolates) and the rest in C type(2 isolates) and unidentified type(2 isolates). All the isolates were highly susceptible to ampicillin, amoxicillin and cephalothin.

Key words : *Clostridium perfringens*, gas-liquid chromatography, toxin, necrotic, enteritis, antibiotic susceptibility

## 서 론

닭 괴사성 장염은 주로 어린 병아리에서 *Clostridium perfringens* 감염에 의하여 발생하는 질병으로 영국의 Parish<sup>1-3</sup>가 최초로 보고하였다.

본 질병에 관여하는 *Cl perfringens*는 Gram 양성 간균으로서 혐기성 세균이다. 또한 운동성이 없고 균체에 polysaccharide capsule을 가지고 있으며, 아포는 드물게 형성한다. 이 세균은 혈액배지에서 잘 자라며 용혈능이 있고 본 균 분리를 위해 더욱 향상된 선택배지<sup>4</sup>가 개발되었다. 특히 본 균의 추동동정에는 *Cl perfringens* A형의 항독소를 이용한 난황한천배지에서의 성장억제현상을 관찰하는 Nagler 반응<sup>5</sup>이 이용되고 있다.

이 세균은 성장하면서 각종 대사산물들을 생산하는데 Coleman<sup>6</sup>이 최초로 *Cl perfringens*가 분비하는 butyric acid가 장점막을 자극하여 장의 기능을 약화시킨다고 보고한 이래, 휘발성 지방산중 특히 acetic acid와 butyric acid가 주로 생산되고 균에 따라서는 소량의 propionic acid가 확인되고 있다<sup>7</sup>. 최근에는 gas-liquid chromatography(GLC)를 이용하여 세균의 대사산물인 이들 휘발성 지방산을 분석함으로써 혐기성 세균의 급속 동정에 활용되고 있다<sup>8-11</sup>.

한편 Bull과 Pritchett<sup>12</sup>는 최초로 시험관에서 *Cl perfringens*의 용해성 독소를 추출하여 항독소를 생산한 다음 독소와 항독소간의 중화시험 결과로서 독소의 성상을 결정하였다. 그후 Sterne과 Warrack<sup>13</sup>은 *Cl perfringens*의 주요한 치사성 독소형에 따라 A, B, C, D, E 등의 5가지 형으로 분류하고 이들 독소형에 따라 A는 alpha toxin, B는 alpha, beta 및 epsilon toxin, C는 alpha 및 beta toxin, D는 alpha 및 epsilon toxin, E는 alpha 및 iota toxin을 분비하는 것으로 보고하였다. 그러나 국내에서는 아직까지 닭에서 본 균의 분리 및 독소형의 조사가 미흡한 실정이다.

본 연구는 국내의 닭으로부터 *Cl perfringens*의 감염상태를 확인하고, 급속동정을 위한 분리균의 휘발성 지방산 GLC를 이용하여 분석하였다. 또한 국내에서 유행하고 있는 *Cl perfringens*의 독소형을 조사하고 이들 분리균

에 대한 약제 감수성 시험을 실시하여 예방 및 치료대책을 강구하고자 시도하였다.

## 재료 및 방법

대상동물 : 닭 괴사성 장염으로 진단된 21개 농장의 이환계와 외관상 건강한 9개 농장의 육계 116수, 산란계 27수, 종계 26수 등 총 169수를 대상으로 하였다.

*Cl perfringens*의 분리 : *Cl perfringens*를 순수분리하기 위해서 부검을 실시하여 무균적으로 간, 소장, 맹장의 가검물을 5% 염소혈액을 첨가한 혈액배지에 접종하였다. 접종된 혈액배지는 혐기성 배양장치인 GasPak(BBL)을 이용하여 37℃에서 18-24시간 배양한 후 혈액배지상에서 안쪽의 완전용혈과 바깥쪽의 불완전한 용혈대를 형성한 집락을 선택한 다음 Gram염색 결과, 양성 간균인 경우 선택배지인 trypticase-sulfite-neomycin(TSN) agar(BBL)에 접종하여 순수분리하였다.

순수분리된 균은 cooked meat(CM) medium(Difco)에 증균하여 생화학적 검사 및 GLC의 분석에 사용하였다.

*Cl perfringens*의 colony forming unit(CFU) 조사 : 장관 내용물에서 *Cl perfringens*의 CFU/g을 확인하기 위하여 내용물 1g을 채취, 멸균된 10ml thioglycollate broth(Difco)에 혼합한 후 75℃에서 20분간 유지하였다. 그후 1ml을 취하여 phosphate-buffered-saline(pH 7.0)에 10배 계단 희석하여 sulfite-polymixin-sulfadiazine(UPS) agar(BBL)에 각각 접종하고, 배지를 37℃에서 24시간 혐기배양한 후 CFU/g을 계산하였다.

Nagler 검사 : Koneman *et al*<sup>7</sup>의 방법에 따라 난황한천배지의 우측 반쪽에 *Cl perfringens* A형의 항독소를 고르게 펴고 건조시킨 후 *Cl perfringens*로 의심되는 분리주를 항독소가 없는 배지의 좌측으로부터 시작하여 반대쪽으로 향하여 직선으로 접종하였다. 그후 37℃에서 24-48시간 배양한 다음 항독소가 있는 쪽에서 lecithinase 활성의 억제반응을 보이면 양성으로 판독하였다.

생화학적 검사 : 생화학적 검사는 API 20A(Analytab products, Inc, Plainview, USA)를 이용하여 Cottral<sup>14</sup>, Allen<sup>15</sup>, Sneath *et al*<sup>16</sup>, Walker *et al*<sup>17</sup>의 방법에 의해서 동정하

었다.

Gas-liquid chromatography 분석 : CM medium에서 자란 대수증식기의 균액 0.1ml를 7ml peptone-yeast extract-glucose(PYG) broth<sup>18</sup>에 접종하고 48시간 배양한 후 1ml를 취하여 Gerhardt *et al*<sup>9</sup>의 방법에 의하여 전처리하였다. 처리된 시료 14μl를 gas-liquid chromatography (Hewlett Packed 5890 with flame ionization detector, HP 3394 A integrator, USA)에 column packing으로 free fatty acid phase(30m × 0.32mm, film thickness 0.25μm)을 사용하고 carrier gas로서 질소를 2.0ml/min의 속도로 주입하여 휘발성 지방산을 분석하였다. 표준용액의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Preparation of standard solution for gas-liquid chromatography

Reagents*	Abbreviation	Volume
Acetic acid, glacial	A	0.057
Propionic acid	P	0.075
Isobutyric acid	IB	0.092
Butyric acid	B	0.091
Isovaleric acid	IV	0.109
Valeric acid	V	0.109
Caproic acid	C	0.126
Distilled water	DW	100.0

\* Standard mixture of volatile fatty acids(about 1mEq/100ml).

표준균주 : *Cl perfringens* A, B, C, D, E형의 표준균주 및 항독소는 수의과학연구소(농촌진흥청)에서 분양받아 사용하였다.

중화시험 : Smith<sup>19</sup>의 방법에 의하여 1% glucose를 첨가한 CM medium에 분리균을 접종하고, 37℃에서 5~6시간 배양한 후 5,000rpm(ALC, 4326 centrifuge, Italy)에서 15분간 원심하여 상층액을 3개의 시험관에 1.2ml씩 분주하였다.

첫번째 시험관에 0.3ml 정상 말 혈청, 두번째 시험관에 0.3ml *Cl perfringens* A형 항혈청, 세번째 시험관에 0.3ml C형 항혈청을 넣고, 혼합한 후 실온에서 30분간 정지한 다음 각각을 18g 전후의 2마리 BALB/c 마우스에 0.5ml씩 복강내 접종하고 다음날 아침 Table 2에 준하여 판독하였다.

약재감수성 시험 : 분리된 30주의 *Cl perfringens*에 대한 약재감수성 시험은 disc diffusion method(BBL, microbiology system)에 의해서 실시하였다. 사용한 약제는

Table 2. 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

BBL사의 ampicillin, cephalothin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, penicillin, tetracycline, sulfonamides, trimethoprim + sulfamethoxazole과 amoxicillin (BioMerieux), bacitracin(Difco) 등 12종이었다.

## 결 과

*Cl perfringens*의 분리 : 총 169수의 장관으로 부터 *Cl perfringens*의 분리성적은 Table 3에서와 같이 총 169수 중 30수에서 분리되어 17.8%의 분리율을 보였다. 또한 종계에서 26.9%로 가장 분리율이 높았으나 분리균수는 육계에서 18수로 가장 많았다.

각 장기별 분리율을 살펴보면 맹장(100.0%)에서 가장 높았고 그 다음으로 소장 그리고 간장 순이었다(Table 4).

Table 3. Isolation of *Clostridium perfringens* from intestinal contents of chickens

Types	No. tested (heads)	No. isolated (heads)	Rate(%)
Broiler	116	18	15.5
Layer	27	5	18.5
Breeder	26	7	26.9
Total	169	30	17.8

Table 4. Isolation of *Clostridium perfringens* from the liver and intestine of chickens

Types	No. tested	No. isolated		
		Livers(%)	SI*(%)	Cecca(%)
Broiler	116	3(2.6)	14(12.1)	18(15.5)
Layer	27	1(3.7)	3(11.1)	5(18.5)
Breeder	26	1(3.8)	4(15.4)	7(26.9)
Total	169	5(3.0)	21(12.4)	30(17.8)
Rates		(16.7)	(70.0)	(100.0)

\* Small intestine.

*Cl perfringens*의 CFU 조사 : 장관 내용물에서 *Cl perfringens*의 CFU/g를 조사한 결과, 피사성 장염의 경우 평균  $10^{7.8}$ CFU/g의 수준을 보였다(Table 5).

Table 5. Population of *Clostridium perfringens* from intestinal contents of chickens suffering from necrotic enteritis and of healthy chickens

Chickens	No. of farms	No. of population(CFU/g)	
		Range	Mean
NE*-diagnosed	21	$10^7$ - $10^9$	$10^{7.8}$
Healthy	9	$10^1$ - $10^4$	$10^{3.8}$

\* Necrotic enteritis.

분리균의 생화학적 성상 : 분리된 30주의 *Cl perfringens*의 생화학적 성상은 분리균의 특성이 표준균주의 성상과 거의 일치하였다(Table 6, Fig 1-4).

Table 6. Biochemical properties of *Clostridium perfringens* isolated from chickens

Tests	Standard strain	Isolates(N=30)	
		No. of positive	%
Nagler's reaction	+	30	100
Motility	-	0	0
Esculin	-	12	40
Gelatin	+	30	100
Indole	-	0	0
Urea	-	0	0
Acid produced from			
arabinose	-	0	0
cellobiose	-	1	3.3
glucose	+	30	100
glycerol	+	30	100
lactose	+	30	100
maltose	+	30	100
mannitol	-	0	0
mannose	+	30	100
melezitose	-	0	0
refinose	-	9	30
rhamnose	-	0	0
saccharose	+	30	100
salicin	-	0	0
sorbitol	-	3	10
trehalose	+	17	56.6

분리균의 휘발성 지방산 분석 : 분리된 30주의 PYG broth에서 생성된 휘발성 지방산을 분석하기 위하여 표

준용액을 제조하여 각 지방산별 retention time(Fig 5)을 결정하였고, 표준균주 및 분리균주의 지방산을 측정하였다. 분석결과 acetic acid(A)는 7분대, propionic acid(P)는 9분대, butyric acid(B)는 12분대에서 확인되었고, 표준균주는 A, P, B 모두 확인(Fig 6)되었으며, 분리균의 25주는 A, B, 나머지 5주는 A, P, B, 모두 확인(Fig 7)되어 *Cl perfringens*를 급속 동정하는데 매우 유효하였다.

분리균의 독소형 : 분리된 30주의 독소형을 파악하기 위하여 마우스에 중화시험을 실시한 결과 26주가 A형으로 판명되었으며, C형이 2주였고, 나머지 2주는 분류할

Table 7. Toxin types of *Clostridium perfringens* isolated from chickens

No. of isolates	Toxin types					
	A	B	C	D	E	Unclassified
30	26	0	2	0	0	2

수 없었다(Table 7).

분리균의 약제감수성 시험 : 분리된 30주는 약제감수성 시험결과 Table 8에서와 같이 ampicillin, amoxicillin, cephalothin 등에 90% 이상의 감수성이 있었으나 나머지 약제에 대해서는 감수성이 비교적 낮았다.

Table 8. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from chickens

Drugs	Concentration of discs( $\mu$ g)	Isolates(N=30) (susceptible patterns)	
		Number	%
Ampicillin	10	28	93.3
Amoxicillin <sup>a</sup>	25	28	93.3
Bacitracin <sup>b</sup>	10 IU	20	66.6
Cephalothin	30	27	90.0
Clindamycin	2	17	56.7
Erythromycin	15	13	43.3
Gentamicin	10	4	13.3
Kanamycin	30	4	13.3
Penicillin	10 IU	18	60.0
Tetracycline	30	17	56.7
Sulfonamides	250	3	10.0
SXT <sup>c</sup>	1.25+23.75	20	66.6

a : BioMerieux product. b : Difco product.

c : SXT : trimethoprim+sulfamethoxazole.

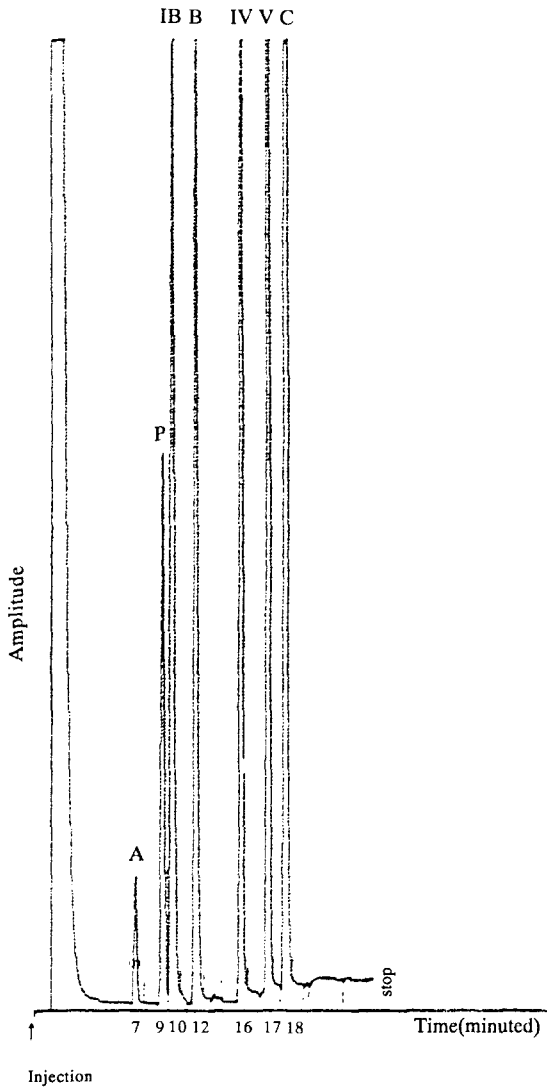


Fig 5. A typical volatile fatty acid standard chromatogram. The elapsed time between the injection of ether of the standard solution and the peak against each acid (retention time) was used to identify the acids (Hewlett Packed 5890 with flame ionization detector).

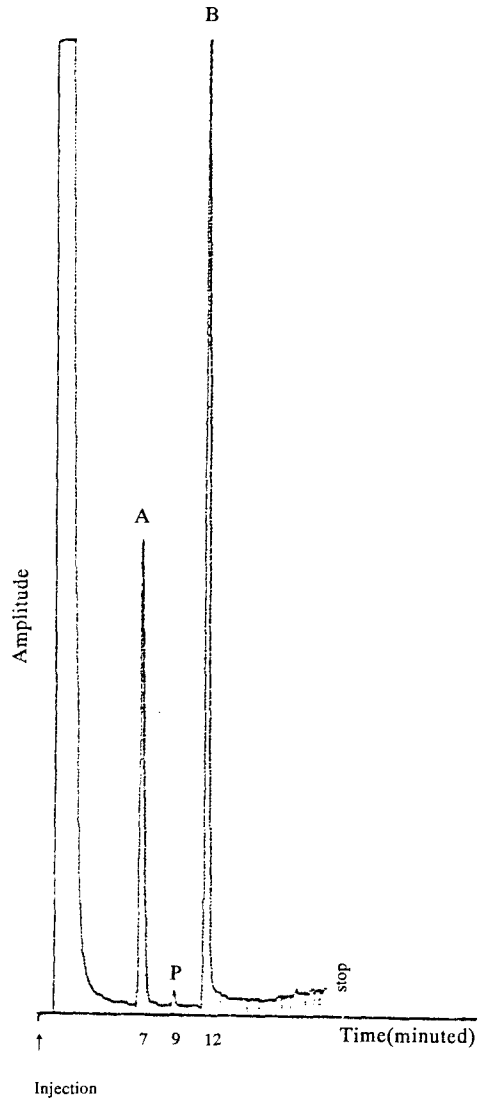


Fig 6. Volatile fatty acid chromatogram of a 48-hour PYG broth culture of *Clostridium perfringens* (standard strain). A=a-cetic acid; P=propionic acid; B=butyric acid.

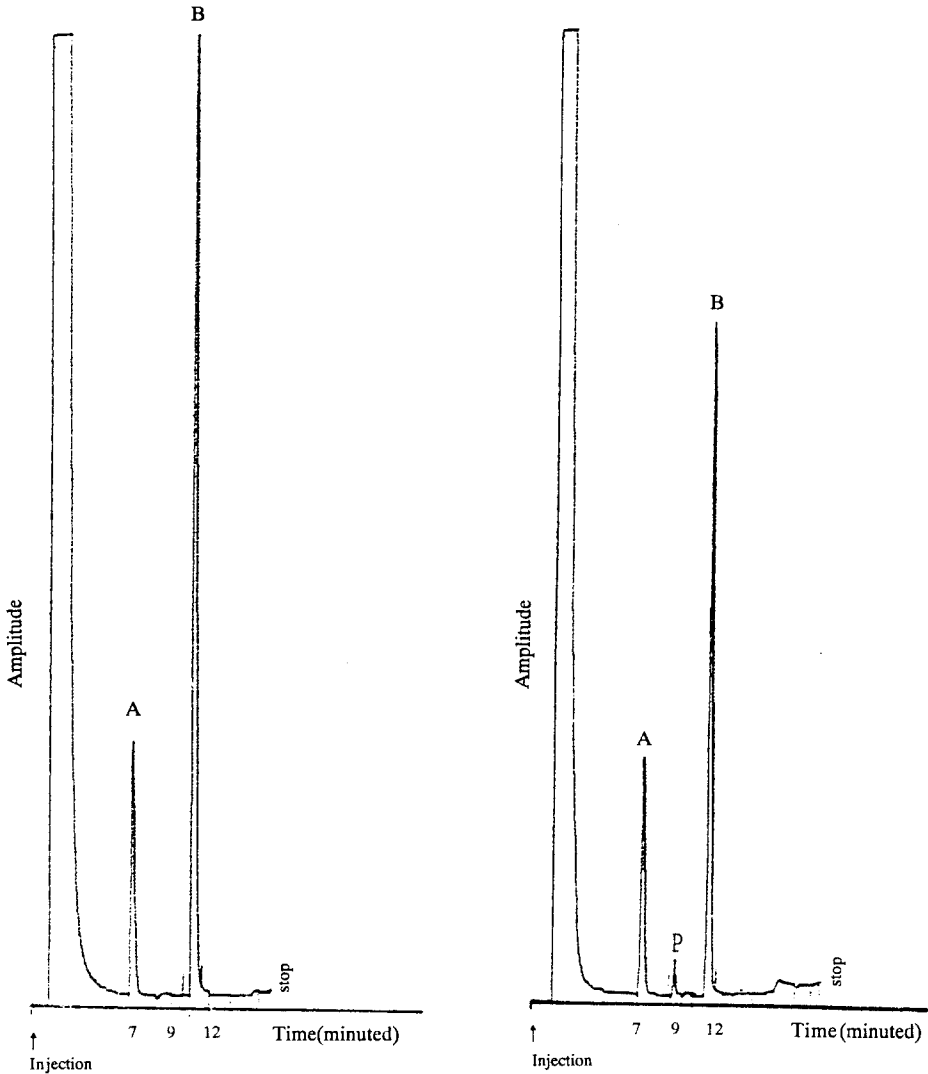


Fig 7. Volatile fatty acid chromatogram of a 48-hour PYG broth culture of *Clostridium perfringens* isolated from chickens. A=acetic acid; P=propionic acid; B=butyric acid.

## 고찰

장관 내용물에서 *Cl perfringens*의 분리성적을 보면 Taylor와 Gordon<sup>20</sup>은 동물과 사람의 장관 내용물 174예중 162예(93.1%), 조류에서는 1예중 12예(92.3%)에서 이 세균을 분리하였고, Niilo<sup>21</sup>는 닭의 장염발생 계군에서 23수, 정상 계군에서 1수를 분리보고한 경우가 있으며 近藤과 尾形<sup>22</sup>은 조류에서 분류한 성적은 없으나 기타 축종에서 소

의 경우 설사변에서 79.1%와 건강변에서 70%를, 돼지의 경우 설사변에서 46.1%와 건강변에서 73.7%의 높은 분리율을 보고하였다. Shane *et al*<sup>23</sup>은 시판 병아리의 장관 내용물을 검사한 결과 75예중 62예(75%)에서 *Cl perfringens*-like 집락을 검출하였지만 5예(6.7%)만이 *Cl perfringens*로 동정되었다. 본 실험에서는 169수중 30수(17.8%)에서 분리되어 외국의 성적보다는 낮은 수준을 보였고, 국내 양계농장의 경우 이 균에 대한 오염이 상대적으로 낮은 것으로 사료되었다.

또한 Timms<sup>24</sup>는 임상적으로 건강한 18일령, 7주령, 5개월령의 닭 장관의 세균총을 검사한 결과 맹장에서의 분리율이 높고 소장에서는 분리율이 낮았다고 보고하였고, Barnes *et al*<sup>25,26</sup>은 부화 직후 병아리의 소장에서 8.3%, 맹장에서 58.3%가 분리되었다고 보고하였다. 본 실험에서도 Timms<sup>24</sup>와 Banes *et al*<sup>25,26</sup>의 성적과 유사하게 맹장 17.8%, 소장 12.4%, 간 3.0%의 순서로 분리되었다.

장관 내용물에서 CFU/g을 측정된 결과, 피사성 장염의 경우 평균 10<sup>7.8</sup>CFU/g의 피사성 장염으로 폐사하거나 앓고 있는 닭 장관에서는 10<sup>7</sup>~10<sup>4.8</sup>CFU/g를 나타냈다고 보고한 성적과 Truscott와 Al-sheikhly<sup>28</sup>가 피사성 장염 재현시험에서 폐사한 닭의 공장에서 2×10<sup>6</sup>~2×10<sup>9</sup>CFU/g을 나타냈다는 보고와 비교하여 볼 때, 일반적으로 닭의 장관내용물중 10<sup>4</sup>CFU/g이하 수준의 *Cl perfringens*량은 정상 세균총을 간주되며 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>CFU/g의 수준은 진단상 장독혈증의 기준으로 사용이 가능하다고 판단되었다.

본 실험에서 분리된 모든 균주에 대한 당 분해실험의 결과 *esculin*, *cellobiose*, *sorbitol*, *trehalose*에서는 다소 차이가 인정되었으나 기타 11종의 당 분해능은 표준균주의 성장과 일치하였다.

또한 세균 특히 혐기성 세균에 대사산물인 휘발성 지방산을 GLC로 분석하여 급속동정에 활용할 수 있는 방법들이 Rizzo<sup>8</sup>, Gerhardt *et al*<sup>9</sup>, Moore<sup>29</sup>, Thomann과 Hill<sup>10</sup>, Cundy *et al*<sup>11</sup> 등에 의하여 보고된 바 있다. 본 실험에서도 국내에서 분리한 *Cl perfringens*에 대한 GLC 분석방법은 표준균주와 야외분리주의 *acetic acid*, *butyric acid*, *propionic acid*의 일정한 retention time을 비교함으로써 빠른 시간내에 이 세균의 동정이 가능하여 매우 유용한 급속동정법으로 이용될 수 있다고 사료되었다. 향후 이 기법은 *Cl perfringens*의 동정시간과 정확성을 향상시킬 수 있어 기존의 생화학적 검사법보다 실질적인 실용적 방법으로 대체 활용가치가 매우 높다고 생각된다.

닭의 장관으로 부터 분리한 *Cl perfringens*의 독소형은 Taylor와 Gordon<sup>20</sup>은 분리된 88주 모두 A형이라고 하였고, Nillo<sup>21</sup> 또한 분리된 21주 모두 A형이라고 보고하였다. 한편 Sinba *et al*<sup>30</sup>은 닭 분변의 세균검사에서 50검체중 29검체(58%)로부터 본 균을 분리하였고, 분리균은 A형이 대부분이었고 C형과 D형도 검출되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 분리균의 독소형을 확인하기 위하여 마우스에 중화시험을 실시한 결과, 분리된 30주중 A형이 26주(86.7%), C형이 2주(6.7%), 독소형을 분류할 수 없는 형이

2주(6.7%)이었다. 이러한 결과는 국내에서 유행하고 있는 *Cl perfringens*의 독소형은 주로 A형임을 알 수 있었다.

*Cl perfringens*에 대한 약제 감수성시험 결과를 살펴보면 외국의 경우 대부분의 연구자들은 사료 및 음수에 첨가한 약제의 반응을 관찰하였던 바 *bacitracin*<sup>31-39</sup>, *lincomycin*<sup>28,40-42</sup>, *penicillin*<sup>32,43-44</sup>, *tetracycline*<sup>33,45</sup> 등에서 예방 및 치료의 효과가 있음을 보고하였다. 본 시험에서는 분리된 30주가 *ampicillin*, *amoxicillin*, *cephalothin* 등에 90% 이상의 높은 감수성을 보였고 *bacitracin*(66.6%), *penicillin*(60.0%), *clindamycin*과 *tetracycline*(56.7%) 등에 비교적 낮은 감수성을 보였다. 이와같은 결과는 국내에서 닭 피사성 장염을 일으키는 *Cl perfringens*에 대한 약제 감수성이 발생농장에 따라 매우 다양함을 알 수 있어 향후 투여경로와 약제선택에 각별한 주의가 요구됨을 확인할 수 있었다.

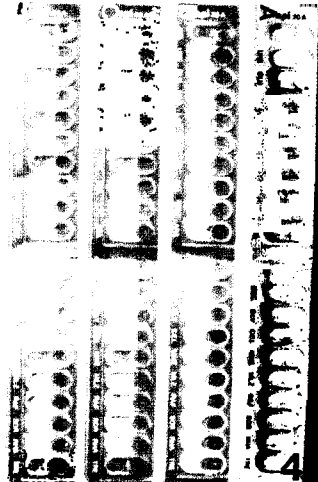
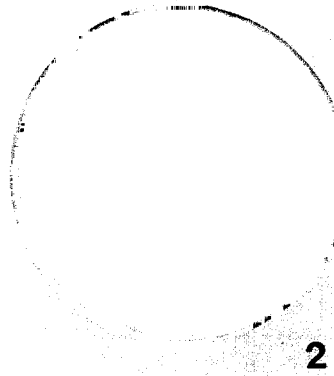
## 결론

닭 피사성 장염으로 진단된 21개 농장과 외관상 건강한 9개 농장의 육계 116수, 산란계 27수, 종계 26수 등 총 169수를 대상으로 *Cl perfringens*의 감염상태를 확인하고, GLC를 이용한 세균의 대사산물을 분석하였으며, 유행하고 있는 독소형을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 169수 중 30수에서 *Cl perfringens*가 분리되어 17.8%의 분리율을 나타냈다.
2. 분리된 30예의 각 장기별 분리율은 맹장(100.0%)에서 가장 높았고, 소장(70.0%) 및 간장(16.7%)이었다.
3. 장관 내용물에서 *Cl perfringens*의 CFU/g을 조사한 결과, 피사성 장염의 경우 평균 10<sup>7.8</sup>CFU/g을 보였으며, 대조 정상계군에서는 평균 10<sup>3.8</sup>CFU/g의 수준을 보였다.
4. 분리된 30주의 *Cl perfringens*의 생화학적 성장조사는 분리균의 특성이 표준균주의 성장과 거의 일치하였다.
5. 분리주가 배양된 PYG broth에서 생산한 휘발성 지방산의 GLC 분석결과는 표준균주의 성장과 같이 *acetic acid*와 *butyric acid*가 확인되었으며, 분리된 30주중 5주는 소량의 *propionic acid*도 함께 확인되어 매우 유효하게 급속동정을 할 수 있었다.
6. 분리된 30주의 독소형은 26주가 A형으로 국내에서 가장 유행하는 독소형으로 확인되었고 C형(2주)과 미분류형(2주)도 소수 분리되었다.
7. 분리된 30주의 약제감수성 시험결과 *ampicillin*, *amoxicillin*, *cephalothin* 등에 90% 이상의 높은 감수성이 있었다.

## Legends for figures

- Fig 1. Gram's stain of *Clostridium perfringens* from a 24-hour colony on blood agar. Note most cells without spores, and Gram-positive.
- Fig 2. Typical colonies of *Clostridium perfringens* isolated from a chicken. Characteristic double zone of hemolysis is noted on blood agar plate after a 24-hour incubation at 37°C
- Fig 3. A positive Nagler's reaction of *Clostridium perfringens* on egg yolk agar. Note the lack of lecithinase activity on the bottom, compared with the heavily growth on the top. The Nagler's plate is used for presumptive identification of *Cl perfringens*.
- Fig 4. Biochemical properties of *Clostridium perfringens* isolated from chickens. A : uninoculated API 20A strip. B, C, D : reaction of *Cl perfringens* on API 20A strip.





## 참고 문헌

1. Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*) I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol*, 71: 377~393, 1961.
2. Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl. II. Examination of the causal *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol*, 71: 394~404, 1961.
3. Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. *J Comp Pathol*, 71: 405~413, 1961.
4. Duncan CL, Strong DH. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol*, 16: 82~89, 1967.
5. Nagler FPO. Observations on a reaction between the lethal toxin of *Clostridium welchii* (type A) and human serum. *Br J Expt Pathol*, 20: 473~485, 1939.
6. Coleman GE. Laclede butyryge, *et al*. Sclerose. *Ann Inst Pasteur*, 29: 139~156, 1915.
7. Koneman EW, Allen SD, Dowel VR, *et al*. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 2nd ed., J.B. Lippincott Company, 347~424, 1983.
8. Rizzo AF. Rapid gas chromatographic method for identification of metabolic products of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, 11: 418~421, 1980.
9. Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, *et al*. *Manual of methods for general bacteriology*. Washington, DC. American Society for Microbiology, 423~425, 1981.
10. Thomann WR, Hill GB. Modified extraction procedure for gas-liquid chromatography applied to the identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, 23: 392~394, 1986.
11. Cundy KV, Willard KE, Valeri, *et al*. Comparison of traditional gas chromatography(GC), headspace GC, and microbial identification library GC system for the identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 29: 260~263, 1991.
12. Bull CG, Pritchett IW. Toxin and antitoxin of protective inoculation against *Bacillus welchii*. *J Expt Med*, 26: 119~138, 1917.
13. Sterne M, Warrack GH. The type of *Clostridium perfringens*. *J Pathol Bacteriol*, 88: 279~283, 1964.
14. Cottral GE. Manual of standardized methods for veterinary microbiology, Comstock Publishing Associates, A division of Cornell university Press, Ithaca and London, 509~519, 1978.
15. Allen SD. Clostridium. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr, Shadomy HJ(eds). Manual of clinical microbiology, 4th ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 434~444, 1985.
16. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, *et al*. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore/London, 2: 1141~1200, 1986.
17. Walker PD. Clostridium. In: Cater GR(eds). *Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology*, 5th ed. Charles C. Thomas publisher, Springfield, Illinois, 229~251, 1990.
18. Atlas RM. *Handbook of microbiological media*, CRC Press, USA, 1~1078, 1993.
19. Smith LD, Clostridial infections. In : Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, *et al*(eds.). *Isolation and identification of avian pathogens*. Creative Printing Co., 33~35, 1980.
20. Taylor AW, Grodon WS. A survey of the types of *Cl welchii* present in soil and in the intestinal contents of animal and man. *Anim Dis Res Assoc*, 5: 271~277, 1938.
21. Niilo L. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep, and chickens. *Can J Comp Med*, 42: 357~363, 1978.
22. 近藤房生, 尾形學. 各種動物由來 *Clostridium perfringens* 諸性狀 形別. 日本細菌學雜誌, 30: 477~484, 1975.
23. Shane SM, Koetting DG, Harrington KS. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian Dis*, 28: 1120~1124, 1984.
24. Timms L. Observations on the bacterial flora of the alimentary tract in three age groups of normal chickens. *Br Vet J*, 124:470~477, 1968.
25. Barnes EM, Mead GC, Barnum DA, *et al*. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks

- of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br Poult Sci*, 13: 311~326, 1972.
26. Barnes EM, Impey CS, Cooper DM. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *Am J Clin Nutr*, 33: 2426~2433, 1980.
  27. Long JR, Pettit JR, Barnum DA. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. *Can J Comp Med*, 38: 467~474, 1974.
  28. Truscott RB, Al-Sheikhly F. Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. *Am J Vet Res*, 38: 857~861, 1977.
  29. Moore HB. Rapid methods in microbiology. IV. Presumptive and rapid methods in anaerobic bacteriology. *Am J Med Technol*, 47: 705~712, 1981.
  30. Sinba M, Willinger H, Trcka J. Studies on the incidence of *Clostridium perfringens* in domestic animal (horse, cattle, pig, dog, cat and fowl). *Wien Tierarztl Mschr*, 62: 163~169, 1975.
  31. Gardiner MR. Clostridial infections in poultry in Western Australia. *Aust Vet J*, 43: 359~360, 1967.
  32. Nairn ME, Bamford VW. Necrotic enteritis of broiler chickens in Western Australia. *Aust Vet J*, 43: 49~54, 1967.
  33. Bains BS. Necrotic enteritis of chickens. *Aust Vet J*, 44: 40, 1968.
  34. Wicker DL, Isgrigg WN, Trammel JH, et al. The control and prevention of necrotic enteritis in broilers with zinc bacitracin. *Poult Sci*, 56: 1229~1231, 1977.
  35. Prescott, JF. The prevention of experimentally induced necrotic enteritis in chickens by avoparcin. *Avian Dis*, 23: 1072~1074, 1979.
  36. Prescott JF, Sivendra R, Barnum DA. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally induced necrotic enteritis in the chicken. *Can Vet J*, 19: 181~183, 1978.
  37. Stutz MW, Johnson SL, Judith FR. Effect of diet and bacitracin on growth, feed efficiency, and populations of *Clostridium perfringens* in the intestine of broiler chicks. *Poult Sci*, 62: 1619~1625, 1983.
  38. Broussard CT, Hofacre CL, Page RK, et al. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. *Avian Dis*, 30: 617~619, 1986.
  39. 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.
  40. Maxey OB, Page RK. Efficacy of lincomycin feed medication for the control of necrotic enteritis in broiler type chickens. *Poult Sci*, 56: 1909~1913, 1977.
  41. Hamdy AH, Thomas RW, Kratzer DD, et al. Licomycin dose response for treatment of necrotic enteritis in broilers. *Poult Sci*, 62: 585~588, 1983.
  42. Hamdy AH, Thomas RW, Yancey RJ, et al. Therapeutic effect of optimal lincomycin concentration in drinking water on necrotic enteritis in broilers. *Poult Sci*, 62: 589~591, 1983.
  43. Bernier G, Filion R. Necrotic enteritacin broiler chickens. *JAVMA*, 158: 1896~1897, 1971.
  44. Long JR, Truscott JR. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Reproduction of the disease. *Can J Comp Med*, 40: 53~59, 1976.
  45. Bernier G, Filion R, Malo R, et al. Enterite necrotique chez le poulet de gril. II. Caracteres des souches de *Clostridium perfringens* isolees. *Can J Comp Med*, 38: 286~291, 1974.