

동물원 사자의 *Clostridium perfringens*에 의한 장독혈증 감염증례

김용환¹, 나호명, 박성도, 고바라다, 김태순*, 윤병철*, 최종욱*, 이삼수

광주광역시 보건환경연구원, 광주우치동물원*

(접수 2005. 8. 29. 게재승인 2005. 9. 23)

Clostridium perfringens enterotoxigenesis in a lion of zoo

Yong-Hwan Kim¹, Ho-Myung Na, Sung-Do Park, Ba-Ra-Da Koh,
Tae-Sun Kim*, Byeong-Chel Yoon*, Jong-Woog Choi*, Sam-Soo Lee

Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju, 500-210, Korea

*Gwangju Metropolitan Uchi Zoo, Gwangju, 500-240, Korea

(Received 29 August, accepted in revised from 23 September 2005)

Abstract

A 3-year-old male lion at Gwangju Uchi Zoo presented for acute onset of haemorrhagic diarrhea and died. The lion showed reddening of the anus as the cause of haemorrhagic enteritis. Necropsy revealed a severe haemorrhagic colitis. Grossly, lesions included icterus, excess pericardial fluid, dark kidneys, and an enlarged, friable liver. The intestines were flaccid, thin-walled, dilated, and gas-filled. The spleen was enlarged and pulpy because of congestion. Most of organs were rapidly postmortem autolysis. Histopathologically, the intestines were edema and transient leukocyte infiltration of the lamina propria, followed by necrosis. Especially of the intestinal submucosa was edematous, haemorrhagic, or filled with leukocytes. The crypts remained intact or dilated. *C perfringens* was isolated from a lion at bloody feces, and identified *C perfringens* type A, confirming the presence of *C perfringens* α -toxin by PCR. These results were suggested that the case were diagnosed as enterotoxigenesis in the lion. More studies are needed on lion enterotoxemia, especially of its etiopathogenesis, in order to develop more efficient prevention for this disease.

Key words : Lion, *Clostridium perfringens*, Enterotoxigenesis, PCR

¹Corresponding author

Phone : +82-62-571-0498, Fax : +82-62-571-0496

E-mail: vetkyh@hanmail.net

서 론

장독혈증은 *Clostridium perfringens*의 장내 이상 증식으로 그 독소에 의하여 출혈과 괴사성 병변을 일으켜 급사하는 질병이다¹⁾. 이 질병은 주로 사람을 비롯한 소, 돼지, 양 등의 가축에서 주로 문제가 되며, 꽃사슴과 표범과 같은 사육되는 야생동물에서 발생이 확인된 바 있으나, 사자의 장독혈증의 발생 보고 예가 희소하다^{2,3)}.

*C perfringens*는 1940년대에 질병을 일으키는 것으로 처음 보고되었으며, 동물체에서 괴사성 장염을 일으켜 폐사에 이르게 하기도 하며 식중독의 원인으로도 잘 알려져 있다. 이 균은 그람양성 간균, 혐기성, 아포형성 균으로서 A~E형의 5개의 독소형으로 분류되며, 이들이 분비하는 독소는 주로 α , β , ϵ , ι 독소이다⁴⁾. 독소형 중 *C perfringens* A형균은 주로 α -toxin, B형균은 α , β , ϵ -toxin, C형균은 α , β -toxin, D형균은 α , ϵ -toxin, E형균은 α , ι -toxin을 생산한다⁵⁾. 이들 독소는 사람에서는 가스괴저와 동물의 괴사성장염을 일으키고, 송아지, 면양, 자돈에서 구토, 복부통증, 혈변 등을 동반한 장염과 때로는 뇌조직 괴사를 유발하여 후구 마비나 선회운동과 같은 신경증상을 일으킨다. 장독혈증의 일반적인 경과는 극히 급격하며, 건강하던 동물이 임상증상 없이 돌연 폐사하는 예가 많다^{6~11)}. 대부분 급성출혈성 장염이 주증상으로 고열을 나타내며 급사한다. 중증 예에서는 천연공의 출혈, 혈액응고부전, 내장 각부의 가스분출, 간장의 변색과 스폰지화, 위저부의 출혈과 가스 충전 및 소장 충출혈 등이 인정된다¹¹⁾. 사람의 *C perfringens*에 의한 식중독과 관련하여 조사된 바에 따르면 도축된 소고기, 돼지고기, 닭고기 등의 육류를 통한 오염된 음식물로 식중독을 일으킬 수 있다¹²⁾.

국내에서 보고된 사육 야생동물의 C

*perfringens*에 의한 장독혈증 사례는 순록과 꽃사슴에서 *C perfringens* A형균에 의한 발생보고가 있으며²⁾, 최근 외국의 발생사례로는 미국의 펜실베니아 피츠버그 전시 동물인 표범 (Amur leopard; *Panthera pardus orientalis*)에서 *C perfringens*에 의한 장독혈증에 의한 폐사 보고가 있다³⁾.

본 연구는 동물원에서 사육중인 사자의 폐사에 대한 질병진단을 실시한 결과 *C perfringens* A형균 α -toxin에 의한 장독혈증으로 판명되었기에 보고하는 바이다.

증 례

병 력

2004년 4월 21일 광주광역시 우치동물에서 사육중인 세 마리의 사자 중 한 마리(수컷, 3세)가 항문과 꼬리부위의 혈변 양상 외에 외부의 특이증상 없이 급사하여, 광주보건환경연구원 가축위생연구부에 부검의뢰되었다. 나머지 두 마리(암컷)의 사자는 특이한 증상이 없었다.

육안적 검사

의뢰된 사자는 비교적 영양상태가 양호하였으며, 천연공에서 출혈과 혈액의 응고부전이 관찰되었다 (Fig 1). 내부 장기의 각 부위에서는 가스가 분출되고, 복강은 검붉은 복수로 가득 차있었으며, 위장관은 심한 충출혈소견과 소세지양으로 팽대되어 있었다 (Fig 2). 간과 신장은 변색과 스폰지와 같은 취약한 상태였으며, 비장은 중등도로 종창되어 관찰되었고, 기타 실질장기의 대부분이 심한 사후 변색소견을 보였다.

병리조직학적 검사

부검 시 확인된 각종 실질장기를 채취하

여 10% 중성포르말린 용액에 고정시킨 다음 파라핀 처리 후 4 μm 두께의 조직 절편을 만들고 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 병리조직학적으로 전신 장기는 심한 충·출혈 소견을 보였으며, 사후변화에 의한 자가용해가 많이 진행되어 관찰되었다. 대부분의 장은 충·출혈이 심하고, 특히 장 점막하 부위의 부종과 충·출혈 등 괴사 소견이 관찰되었다 (Fig 3). 간, 신장, 비장, 폐 등에서 충·출혈 소견이 관찰되었으며, 이들 대부분의 조직은 괴사와 사후변화가 심하게 진행되어 관찰되었다.

분변검사

부검 시 채취한 분변에 대하여 일반적인 기생충란검사 방법인 침전법과 부유법을 실시하였다. 검사결과 사자회충란 (*Toxascaris leonina*)이 경감염되어 있음을 확인하였다.

세균배양검사

간, 비장, 장에서 균 분리를 시도하였다. 각각의 가검재료를 멸균된 면봉으로 닦아 5% 면양혈액배지와 증균배지에 접종한 후 배양하였다. 특히 장 내용물에 대해서는 *C perfringens*의 증균배지인 Cooked Meat Medium의 배지 아랫부분에 접종하여 35℃에서 18~24시간 혐기배양을 하였다. 증균배지에서 자란 균액은 *Clostridium perfringens* Agar(OPSP, Oxid.)에 도말하여 37℃ 혐기 배양하여 확인하고, 균수 측정을 OPSP agar에서 병행하였다. 최확수(MPN)법에 의한 *C perfringens*의 균수를 측정 한 결과 장 내용물에서 2×10⁷ CFU/g으로 검출되었다 (Fig 4).

PCR을 이용한 특이 유전자 검출

분리된 *C perfringens*의 균 독소형을 확인하기 위해 상업용으로 판매되는 *C perfringens*의

Pathogenic PCR Kit (RapiGEN®)을 이용하여 증합효소연쇄반응(PCR)법을 실시하였다. DNA의 분리를 위해 증균배지에서 균액 1 ml를 시험관에 옮긴 후 12,000×g에서 3분간 원심분리 후, 상층액을 버리고 멸균증류수로 500 μl로 현탁 시키고 다시 12,000×g에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 DNA 추출액 100μl를 첨가하여 혼합하여 균체를 현탁시킨 후, 현탁액을 끓는 물에서 10분간 가열하여 세포를 완전히 파쇄하고 실온에서 식혔다. 다음 가볍게 혼합한 후 12,000×g에서 5분간 원심분리하고 상층액 10 μl를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응 조건은 95℃에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94℃에서 20초, 63℃에서 25초, 72℃에서 45초간의 반응을 40회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 51분간 더 반응시켰다. 증폭산물을 확인하기 위해 PCR 산물을 2.5% agarose gel에서 전기영동한 후 증폭여부를 확인한 결과 *C perfringens* A형 균의 *cpa* 독소유전자에 해당하는 band가 431 bp크기에서 검출되었다 (Fig 5).

고 찰

*C perfringens*에 의한 장독혈증은 주로 급성으로 진행되기 때문에 동물원에서 사육 전시되는 동물의 치료는 매우 어려운 실정 이므로, 이 질병이 발생했을 경우 철저한 원인 규명을 통하여 예방하는 것이 중요하다.

본 증례는 육안적 검사, 병리조직학적 검사, 세균배양과 병원체에 대한 유전자 검사에 의하여 *C perfringens* A형 α-toxin에 의한 장독혈증으로 진단되었다. *C perfringens* A형균은 창상감염을 통해 사람의 가스괴저와 포유동물의 출혈성, 괴사성 장염을 일으키고 독혈증으로 급성 폐사에 이르게 하며, 이 질병에 의한 임상소견과 병리소견과 임상소견은 원인균이 생산하는 특이한 독소의

영향에 따라 크게 달라지고, 증상의 경과기간에 의해서도 병변의 정도와 범위가 개체별로 큰 변화가 있다²⁾. 본 발생 예에서는 부검시 육안적으로 천연공의 출혈과 내부 장기의 가스분출과 장의 충·출혈로 인한 암적색의 출혈성 변성괴사가 특징적으로 관찰되었다.

장독혈증에 의해 폐사된 동물의 병리조직학적 소견으로는 간, 비장, 장 등의 충·출혈이 관찰되고, 주로 소장·점막, 점막하직, 근층, 장막에서 출혈과 단핵세포의 침윤이 관찰된다고 보고되고 있다^{13,14)}. 하지만 본 증례에서는 소장을 비롯한 대장에서도 유사한 충·출혈성 병변을 확인되어 매우 심한 증례였던 것으로 사료된다.

장독혈증의 확정 진단은 임상소견, 병리소견, 및 세균학적 검사결과에 근거하여 실시하고 각부에서 균 분리와 장내용물 중의 독소를 증명한다. 하지만 *C perfringens* A형균의 경우 건강한 동물의 소장에서도 존재하므로 질병이 발생한 동물의 소장병변부의 내용물에서 균수를 측정하는 것이 매우 중요하다¹⁾. 본 증례에서는 *C perfringens*의 균수가 장내용물에서 2×10^7 CFU/g으로 검출되어 장내에서 돌연적으로 이상 증식하여 과사성장염을 일으켰고, 이 균이 산생한 균체 외독소가 혈류에 들어가 수시간내에 폐사한 것으로 추정된다.

또한 분리 균주의 독소형 파악을 위해서 *C perfringens* A형 균의 *cpa*와 *cpe* 독소유전자를 동시에 분자생물학적 진단방법을 활용함이 매우 유용하다는 보고에 따라^{15~19)}, 본 증례에 적용한 결과 PCR 검사에서 431 bp크기의 특이적인 증폭산물을 검출하여 α -toxin에 의한 장독혈증임을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해볼 때 질병진단이 의뢰된 동물원은 사자에게 닭고기를 주식으로 급여하고 있었으며, 사육 환경은 다른 일반 우리와 같았다. 또한 함께 동거사육 중이던 암컷 두 마리의 사자에서는 특이한 질병

의 증후는 관찰할 수 없었다. 따라서 본 증례가 *C perfringens* A형균 α -toxin에 의한 장독혈증으로 확진됨에 따라 사람에게서 식중독의 감염원이 식육을 통해서도 발병할 수 있는 점을 고려할 때, 주식으로 급여되는 닭고기를 통한 감염도 의심해볼 수 있다. 그러므로 이 질병의 보다 효과적인 예방을 위해서는 사자 장독혈증의 병인론적 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

사자의 *C perfringens*에 의한 장독혈증에 관한 보고는 매우 드물다. 2004년 우치동물원으로부터 광주보건환경연구원 가축위생연구부에 의뢰된 수컷 사자에 대한 질병진단 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

의뢰된 사자는 영양상태는 양호한 편이었으나 천연공의 출혈 소견을 보이며 급사한 증례로서 육안적 소견은 내부 장기의 각 부위에서 가스가 분출되고, 복강은 검붉은 복수로 가득 차있었으며, 위장관은 심한 충·출혈소견과 소세지양으로 팽대되어 있었다. 병리조직학적으로 전신 장기는 심한 충·출혈 소견을 보였으며, 사후변화에 의한 자가용해가 많이 진행되어 관찰되었다. 특히 장점막하 부위의 부종과 충·출혈 등 괴사 소견이 관찰되었다. 한편 사자의 분변에서 *Toxascaris leonina*가 검출되었다. 폐사된 사자의 장내용물에서 *C perfringens*가 분리되었다. *C perfringens*는 사자의 장내용물에서 *Clostridium perfringens* agar 상에서 2×10^7 CFU/g 분리되었다. 분리된 *C perfringens*는 분자생물학적 진단법인 PCR 검사에서 431 bp크기의 특이적인 증폭산물을 검출되어 α -toxin에 의한 장독혈증임을 확인하였다.

이상의 결과로 볼 때 본 증례는 *C perfringens* A형 α -toxin에 의한 장독혈증으로 최종 진단되었다.

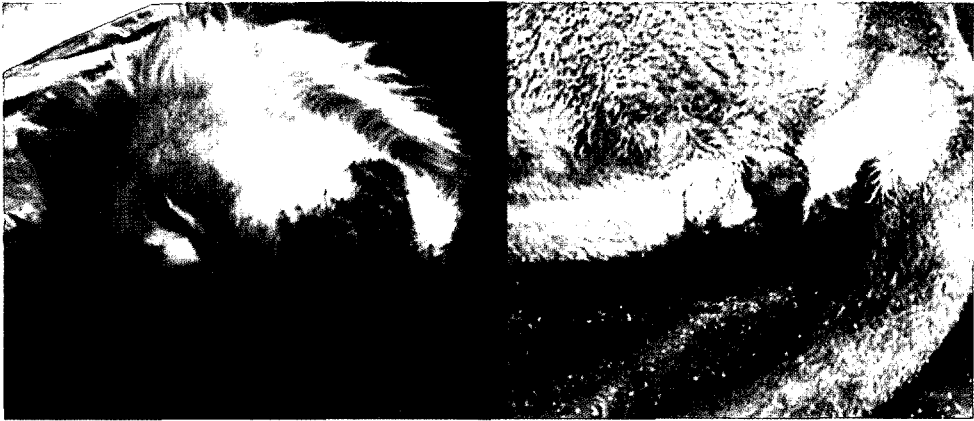


Fig 1. Bloody discharges from body orifices.



Fig 2. Severe haemorrhagic colitis and postmortem change.

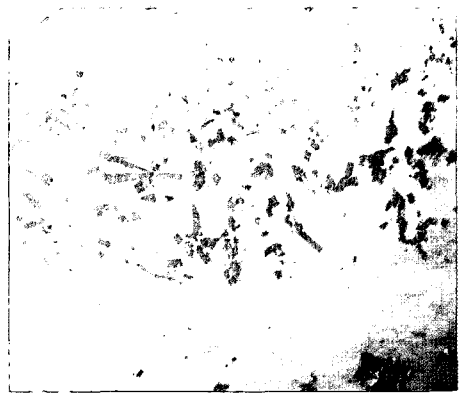


Fig 3. The intestinal submucosa was edematous haemorrhagic. H&E,×40.

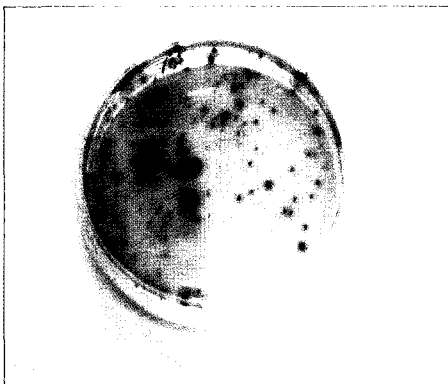


Fig.4. *C. perfringens* seen as large black colonies on the OPSP agar.

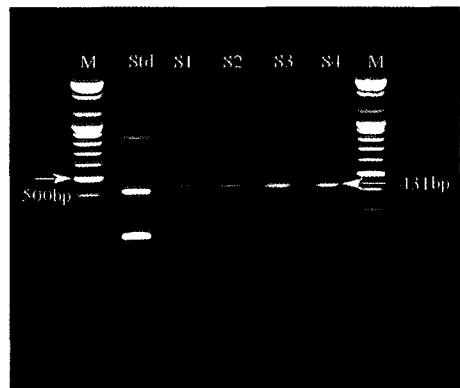


Fig 5. Lane M: 100bp DNA ladder
Lane Std: 431bp, cpa toxin:
231bp & 872bp, cpe toxin
Lane S1 ~ 4: samples.

참고문헌

1. 최원필, 송희중, 김순재. 1994. 수의전염병학. 경북대학교출판부, 대구 : 275-277.
2. 이청산, 한성태, 박학구 등. 2002. 꽃사슴의 *Clostridium perfringens* A형에 의한 장독혈증 발생 보고. 한가위지 25(2) : 127-133.
3. Neiffer DL. 2001. *Clostridium perfringens* enterotoxigenesis in two Amur leopards (*Panthera pardus orientalis*). *J Zoo Wild Med* 32(1) : 134-135.
4. Petit L, Gibert M, Popoff MR. 1999. *Clostridium perfringens*: toxintype and genotype. *Trends Microbiol* 7 : 104-110.
5. Songer JG. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 9 : 216-234.
6. Alouf JE. 1988. Purification of alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Methods Enzymol* 165 : 91-94.
7. Taylor DN. 1987. Enteritis necroticans among Khmer children at an evacuation site in Thailand. *Lancet* ii : 496-500.
8. Lawrence G, Brown R, Bates J, et al. 1984. An affinity technique for the isolation of *Clostridium perfringens* type C from man and pigs in Papua New Guinea. *J Appl Bacteriol* 57(2) : 333-338.
9. Batty I, Bullen JJ. 1956. The effect of *Clostridium welchii* type D culture filtrates on the permeability of the mouse intestine. *J Pathol Bacteriol* 71(2) : 311-323.
10. Hunter SE, Clarke IN, Kelly DC, et al. 1992. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60(1) : 102-110.
11. Lawrence G, Cooke R. 1980. Experimental pigbel: the production and pathology of necrotizing enteritis due to *Clostridium welchii* type C in the guinea-pig. *Br J Exp Pathol* 61(3) : 261-271.
12. Wen Q, McClane BA. 2004. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl Environ Microbiol* 70(5) : 2685-2691.
13. Jubb KVF, Palmer PC. 1993. Pathology of Domestic Animals. *Academic Press* 2 : 238-247.
14. Kummeneje K, Bakken G. 1973. *Clostridium perfringens* enterotoxaemia in reindeer. *Nord Vet Med* 25(4) : 196-202.
15. Augustynowicz E, Gzyl A, Slusarczyk J. 2000. Molecular epidemiology survey of toxinogenic *Clostridium perfringens* strain types by multiplex PCR. *Scand J Infect Dis* 32(6) : 637-641.
16. Meer RR, Songer JG. 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res* 58(7) : 702-705.
17. Kanakaraj R, Harris DL, Songer JG, et al. 1998. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Vet Microbiol* 63(1) : 29-38.
19. Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, et al. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol* 100(1-2) : 11-16.