

흑고니(*Cygnus olor*)의 보툴리눔독소증

김영섭¹ · 김보숙¹ · 신남식^{2,*}

¹서울대공원 동물원, ²서울대학교 수의과대학
(게재승인: 2008년 2월 27일)

Botulism in a Mute Swan(*Cygnus olor*)

Young Seob Kim¹, Bo Suk Kim¹, Nam Shik Shin^{2,*}

¹Seoul Grand Park Zoo, Gwacheon 427-420, Korea

²KRF Zoonotic Disease Priority Research Institute, and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: February 27, 2008)

Abstract : Many neurotoxicogenic clostridia are found in soil. Among animals, birds are especially susceptible to botulism, perhaps because they feed on insects, invertebrate carcasses, and decayed feeds contaminated with spores of *Clostridium* (*C.*) *botulinum*. *C. botulinum* type C is mainly involved in avian botulism. In the summer of 2005, death of a mute swan (*cygnus olor*) living in the pond of large bird cage was found in Seoul Grand Park Zoo. The birds presented presumptive clinical signs of botulism, such as ruffled hackle feathers, abnormal posture of the head, weakness, and flaccid paralysis. At that time, pond water in the breeding facilities was drained for 7 days, but there were still remained water containing sediment of feed and feces. Therefore, botulism was suspected and an experimentation were made to detect *C. botulinum* in the dead mute swan. Gross post-mortem findings of a mute swan showed jelly-like hemorrhagic contents in the intestine, sands and vegetations in the stomach. *C. botulinum* was isolated from the liver, small intestine and large intestine samples. Botulism was also confirmed by mouse inoculation test with the organ samples. With PCR, a gene encoding *C. botulinum* type C toxin was detected for the several organs of the mute swan died. These results suggested that death of mute swan was caused by *C. botulinum* type C.

Keywords : botulism, clostridium botulinum, cygnus olor, mute swan

서 론

*Clostridium botulinum*은 그람양성 혐기성 간균으로 아포를 형성하며 토양 속에 광범위하게 존재한다. 이 균은 균체의독소를 생산하는데 이 독소의 혈청형은 A, B, C, D, E, F 및 G형이 있으며 조류에서는 A, C 와 E형 독소가 중독을 일으킨다 [12].

Botulism은 *C. botulinum*이 생산하는 독소의 섭취에 의한 중독으로 운동신경이 마비되고 폐사율이 높은 급성 중독증이다 [6, 12]. 독소는 장관에서 흡수되어 혈류를 통해 말초 신경세포에 전달되어 신경근 연결부에 아

세틸콜린의 신경세포 자극전달부의 방출을 차단 한다 [6, 12]. 중독된 물새(waterfowl)의 경우 호홉마비나 물에 빠져 폐사되며, 사육조류 및 야생조류는 대부분 *C. botulinum* type C의 독소에 의해 많이 발생한다 [6, 7, 12].

국내에서 동물의 보툴리눔독소증이 발생한 사례보고는 없으나 사람에서 보툴리눔독소증은 진공 포장된 소세지를 먹은 후 발생한 사례가 있다 [4, 5]. 야생동물에서는 조류의 C형 독소로 오염된 닭고기를 먹은 원숭이가 폐사된 보고가 있으며 [15], 육식동물은 비교적 모든 형태의 독소에 저항성이 있다 [12].

야생조류, 오리, 육계, 꿩에서는 주로 더운 계절에 더

*Corresponding author: Nam Shik Shin

KRF Zoonotic Disease Priority Research Institute, and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1260, Fax: +82-2-880-1216, E-mail: nsshin@snu.ac.kr]

많이 발생하지만 육계에서는 겨울철에 발생하는 경우도 있고 [4], 오리에서는 늦가을이나 이른 봄에도 발생하기도 한다 [10, 17]. 야생조류는 오리 종류에서 특히 많이 발생한다 [7, 14, 16]. 물새(waterfowl)는 연못에 버려진 채소나 구더기를 섭취하여 발생되기 쉬우며 [1, 6], 물속의 무척추동물(파리 유충이나 거머리 등)을 먹은 후 발생하기도 한다. 특히 독소가 들어있는 구더기를 섭취한 후 많이 발생한다 [5, 6, 12, 16].

보툴리눔독소증이 발생할 가능성이 높은 환경 요인은 수심이 낮은 연못 [16], 물의 온도가 높은 연못, 순환이 안 되는 연못, 혐기성 상태의 연못, 유기물이 풍부한 침전물이 많은 연못, 연못 수심의 갑작스런 변경 등이다 [6, 7].

임상증상으로는 날개의 마비로 인하여 날지 못하고 목의 마비, 사경이 특징이며 물새는 발병 후 약 10~20%만이 생존하나, 치료할 경우는 75~90%가 회복된다 [11].

C. botulinum 독소에 의한 폐사를 정확히 증명하기 위해서는 독소나 균을 검출하여 확진하여야 하나 그 민감도는 낮아 검사실 소견보다는 병력과 임상증상이 더 중요하며 [2], 독소 유전자의 검출을 위해서는 분자생물학적 방법이 훨씬 효율적이다 [11].

저자들은 Botulism으로 폐사한 흑고니의 임상증상, 병리해부학적 소견, 미생물 검사, 마우스접종 실험, PCR 실험, 역학조사 결과를 보고하여 임상자료로 활용하도록 하고자 한다.

이 보고는 국내 야생동물에서 최초의 보툴리눔독소증 사례이다.

증 례

병력 및 부검소견

2005년 6월 5일 오전 서울대공원 큰물새장에서 9kg의 수컷 흑고니가 갑자기 다리, 날개, 목의 마비 및 깃털의 역립 증상을 나타내어 치료를 하였으나 오후에 폐사되었다.

폐사직후 곧바로 부검을 실시하였으며, 육안 소견상 위내는 모래와 식물의 줄기가 잘게 부서져 있었고(Fig. 1), 심근에는 광범위한 점상출혈이 있었다. 십이지장에는 젤리양 출혈이 있었고(Fig. 2), 소장과 대장에는 점액을 함유한 출혈이 있었다(Fig. 3). 항문주변의 깃털에는 초록색 변이 부착되어 있었다.

미생물학적 검사

연못의 수초 및 바닥 슬러지를 수거 후 직접 도말하여 그람염색을 실시한 결과 연못 바닥의 슬러지에는 여러 종류의 세균과 다수의 그람양성 간균이 보였고, 흙이



Fig. 1. Vegetation and sand in the stomach of the mute swan died.

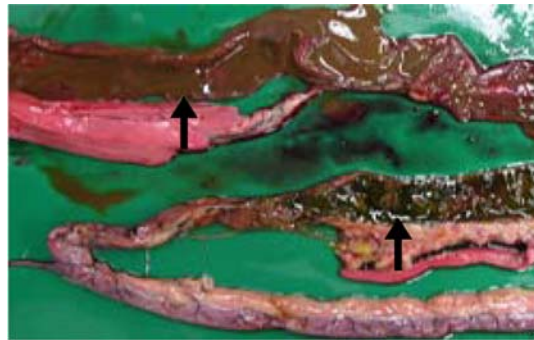


Fig. 2. Jelly-like hemorrhagic contents in the duodenum of the mute swan died.

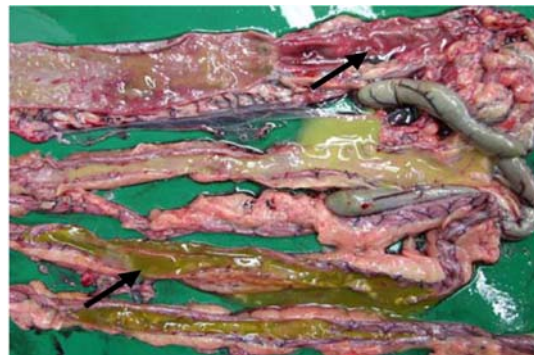


Fig. 3. Hemorrhage with mucoid fluid contents in the colon (above) and small intestine (below) of the mute swan died.

부착된 수초 또한 *Clostridium spp.*로 추정되는 그람양성 간균이 다수 보였다. 물이 빠진 연못의 바닥은 많은 침전물이 슬러지를 형성하고 있었고(Fig. 4), 이 슬러지에는 물속에서 부유하던 조류의 분뇨와 미세한 사료찌꺼기 등 유기물이 침전되어 있었고 더운 날씨에 부패되었다.



Fig. 4. Vegetation and sludge in the pond of large bird cage.

폐체의 간, 소장, 결장의 점막에서 세균검사를 위해 혐기성 및 호기성 배양을 하였고, 각각의 시료를 직접 도말 후 그람 염색한 결과, 소장 및 결장에서 그람양성 대형 간균이 검출되었다. 혐기성 배양 후, 세균확정을 위해 API 20E kit(bioMerieux, France)를 사용하여 조사한 결과 소장 및 결장에서 *C. botulinum*이 검출되었다. 또한 간에서는 *C. beijerinckii*, 소장 및 결장에서는 *C. ramosum*이 함께 검출되었다. 호기성 배양에서는 간, 소장, 대장에서 *Actinomyces israelii*가 검출되었다.

독소의 존재 여부를 확인을 위해, 폐사전의 혈청, 폐사 후의 위내용물, 혈액을 함유한 장내용물, 간에서 흘러나온 혈액에 증류수 10ml을 넣어 멸균 사발에서 교반 후 6,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였고, 상층액을 0.2 µm의 마이크로 필터로 여과한 다음 평균 26g의 마우스(ICR) 5수의 복강 내 접종한 결과, 폐사 전 채혈한 혈액의 혈청 0.5 ml를 접종한 마우스는 60시간 후 폐사되었고, 위내용물 12g을 증류수 10ml에 희석하여 6ml를 접종한 마우스는 48시간 후 폐사되었으나 2ml를 접종한 마우스는 생존하였다. 장내용물 2g을 증류수 10ml에 희석하여 5ml를 접종한 마우스는 24시간 후에 폐사되었으나 간 100g을 냉장고에 10시간 방치 후 흘러나온 혈액 3ml중 2ml를 접종한 마우스는 12시간 이내 폐사되었다.

폐사 전날 채혈한 흑고니 혈액의 생화학적검사 결과 (Table 1), Aspartate Aminotransferase(AST)만 148.8(U/l)로 약 4배 증가하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

C. botulinum type C 독소 유전자를 검사하기 위하여 검체의 간, 폐, 소장, 근위에 조직시료를 채취하였다. 채취된 시료는 DNeasy Tissue kit(Qiagen, Germany)를 이

Table 1. Blood biochemical test

| Parameter | <i>Cygnus olor</i> (mean) | ISIS* standard |
|--------------------|---------------------------|----------------|
| T.P (g/dl) | 3.0 | 4.6 ± 0.9 |
| Alb (g/dl) | 2.1 | 1.7 ± 0.4 |
| D. bil (mg/dl) | 0.1 | 0.0 ± 0.0 |
| T. bil (mg/dl) | - | 0.3 ± 0.5 |
| GGT (U/l) | 51 | 15 ± 13 |
| AST (U/l) | 148.8 | 29 ± 17 |
| ALT (U/l) | 17.9 | 14 ± 9 |
| ALP (U/l) | 70 | 176 ± 163 |
| LDH (U/l) | 37 | 484 ± 475 |
| CPK (CK) (U/l) | 227 | 319 ± 272 |
| TG (mg/dl) | 139 | 126 ± 27 |
| T. cho (mg/dl) | 254 | 207 ± 42 |
| Glucose (mg/dl) | 295 | 164 ± 29 |
| UA (mg/dl) | 8.7 | 6.1 ± 3.4 |
| Creatinine (mg/dl) | 0.2 | 0.3 ± 0.1 |
| BUN (mg/dl) | 5.7 | 4 ± 3 |
| IP (mg/dl) | 0.9 | 4.5 ± 2.0 |
| Ca (mg/dl) | 14.3 | 10.3 ± 0.9 |

*International Species Information System; 12101 Johnny Cake Ridege Road. Apple Valley, MN 55124, USA. 2002.

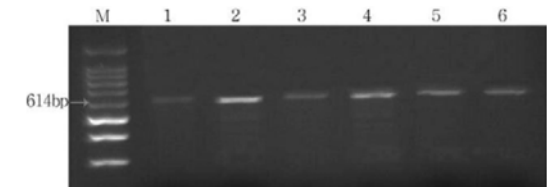


Fig. 5. PCR amplication of a 614-bp DNA sequence from mute swan samples infected with *C. botulinum* [Lane M: molecular size standards(1-kb DNA ladder, Gibco-BRL), Lane 1: Liver, Lane 2: Lung, Lane 3: Small Intestine, Lane 4: Liver, Lane 5: Lung, Lane 6: Gizzard].

용하여 25 mg을 50°C에서 3시간 lysis 후 70°C에서 10분 더 lysis하고 genomic DNA를 추출하였다. PCR 반응액 조성은 template DNA 2 µl(10 ng/µl), 각 primer 1 µl(10 ng/µl), 10 × buffer 2 µl, dNTP mix(Takara) 1.6 µl(0.2 mM), Taq polymerase(Takara) 0.2 µl(1 unit)를 넣은 후 ddH₂O를 추가하여 총량이 20 µl가 되게 하였다. 염기서열 증폭을 위한 Primer는 CB(5'-GCGGCACAAGAAGGATTTG-3')과 CB (5'-CGCCGTAACCGGAGTATAT-3')를 사용하였다.

PCR 반응은 94°C에서 10분간 denaturation을 실시한 후 95°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 1분간 annealing, 60°C에서 4분간 extension을 30 cycle 반복하

며 수행하였다. 그 후 마지막으로 60°C에서 15분간 extension을 실시한 후 PCR 반응을 끝마쳤다. 증폭산물은 0.5 × TBE buffer로 만든 3% Metaphor agarose gel에 100 volt로 30~50 min간 전기 영동한 후 PCR 결과의 특이성을 검증하기 위하여 3차례의 반복적인 실험을 실시하여, *C. botulism* type C toxin gene의 614 bp 특이 밴드를 확인하였다(Fig. 5).

고 찰

역학조사 결과, 큰물새장은 바다의 1/3 정도가 연못으로 형성되어 있는데 초여름 시설개선을 위해 연못에 물을 빼 후 약 7일간 비워둔 상태였고 연못 곳곳에는 수생 식물들이 식재되어 있었다. 물이 빠진 연못의 바닥은 많은 침전물이 슬러지를 형성하고 있었으며, 이 슬러지에는 물속에 부유하던 조류의 분뇨와 미세한 사료찌꺼기 등의 유기물들이 침전되어 있었고, 더운 날씨에 유기물이 부패되는 과정에서 *C. botulinum* 이 생산한 독소가 다량 함유되어 있을 것으로 추정되었다. 또한 큰물새장 지붕 바깥에서 살고 있는 야생 왜가리의 분뇨가 연못으로 떨어졌는데 이 분뇨가 여름철 고온으로 부패되어 발생의 유인이 되었을 것으로 추정되었다.

큰물새장에는 여러 종의 조류가 혼합 사육되고 있었으나 수초와 슬러지가 대량 형성된 지역을 주 활동 영역으로 생활하던 오리과에 속하는 조류에서 주로 발생하였는데, 오리류는 무더운 날에 수초를 다량 먹는 경향이 있으며, 물속에서 자라는 수초와 물속에 급여하는 배추 등의 야채에 부착된 독소를 식물과 함께 섭취하여 발생한 것으로 추정되었다.

보툴리눔독소증의 발생 방지를 위해서는 위생적인 수질관리, 부패된 물, 수초, 슬러지는 제거하고 야채는 물속에 급여하지 않는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

간의 혐기성 세균배양 결과 검출된 *C. beijerinckii* 및 소장 및 결장에서 혐기배양된 *C. ramosum*는 토양 상재균으로 추정되었으며 간, 소장, 대장의 호기성배양에서 검출된 *Actinomyces israelii* 또한 상재균으로 신경증상을 주로 나타낸 흑고니의 증상과 비교하여 볼 때 이들 세균은 폐사의 직접적인 원인은 아닌 것으로 추정되었다.

*C. botulinum*의 독소에 의한 폐사를 정확히 증명하기 위해서는 독소나 균을 검출하여 하여 확인하여야 하지만 그 민감도는 낮아 검사실 소견보다는 병력과 임상증상이 더 중요하다고 하였다 [2]. 우리의 실험에서는 독소검출을 시도하지 못한 대신에 가검물에서 누출되는 혈액을 모아 여과한 후 마우스에 접종하여 독소의 존재 여부를 확인하였다. *C. botulinum*의 독소가 함유된 혈청을 마우스의 정맥으로 주사하였을 때 수 시간에서 5일

정도에 특징적인 증상으로 호흡근의 마비로 인한 복식 호흡 때문에 복부가 훔쪽하게 보이는 “가는허리(wasp-waist)”를 나타낸다고 하였는데 [12], 우리의 실험에서는 5수 중 1수의 마우스에서만 접종 후 72시간 경부터 약 4시간 동안 좌후지의 마비증상과 허리가 약간 훔쪽한 상태로 구부리는 자세를 보인 후 회복하였고, 나머지는 야간에 증상을 발현하여 관찰하지 못하였다. 장관의 내용물과 간에서 흘러나온 혈액을 접종한 마우스는 빠른 폐사를 보였으나 위의 내용물과 폐사 전에 채혈한 혈청을 접종한 마우스가 느린 폐사를 보인 점은 각 장기의 독소 함유량 및 접종 량에 따른 차이인 것으로 추정되었다.

현재까지 *C. botulinum*의 배양이나 균 분리 동정에는 어려움이 많아 신경독소 유전자 검출을 목적으로 하는 분자생물학적 방법이 훨씬 효율적이며 [11], *C. botulinum*의 독소를 검출하기 위해서는 각 유형에 따른 독소 특이 유전자 검출 방법을 이용하고 있는데, 우리의 실험에서는 이미 알려진 *C. botulinum* type C 독소 특이유전자를 확인하기 위해 Franciosa 등 [8]의 방법으로 실험하였으며, 폐사된 흑고니의 간, 폐, 소장, 근위에서 유전자를 증폭하여 검사한 결과의 특이성을 검증하기 위하여 3번의 반복적인 실험을 실시한 결과 모두 동일한 614 bp 특이 밴드가 확인되었다(Fig. 5).

폐사 전 채혈한 혈액의 생화학적 검사결과 급성 간염 증상을 암시하는 AST 수치가 약 4 배 증가된 148.8(U/l)로 나타나 흑고니는 간과 관련된 급성 질환으로 폐사되었음을 추론할 수 있었다.

치료를 위한 방법으로 육계에서 sodium selenite, vitamin A, vitamin D3, vitamin E의 투여로 폐사율을 줄였다고 하였는데 [13], 본 증례의 흑고니와 동시에 신경 경증을 보인 오리 및 검은고니는 발병 당일부터 항생제 [바이트릴(Enrofloxacin 25 mg); 바이엘화학, 한국] 0.8 ml 근육주사와 비타민[올비탈 시럽(vitamin A, D3, E, C, B1, B2, B6, B12 합제); 영진약품, 한국]의 투여로 회복되었으나, 중증을 보인 흑고니는 다음날 폐사된 것으로 보아 초기 발견시 신속한 치료는 회복율을 높이는 것으로 보인다. 또한 *C. botulinum* C type 항독소의 사용으로 임상증상과 폐사율을 줄일 수 있다고 하였으나 [11] 본 증례에서는 시도하지 못하였다.

저자 등은 위와 같이 마우스접종 실험, 세균분리 및 PCR 검사, 전형적인 임상증상, 부검소견, 병리학적소견 등 여러 가지 실험 결과를 종합하여 Botulism으로 진단하였다.

결 론

서울대공원 큰물새장의 흑고니 한마리가 다리, 날개,

목의 마비, 깃털의 역립 증상을 보인 후 폐사되어 부검한 결과 위내는 모래와 수초만 있었고, 소장 및 결장에는 켈리상태의 혈액양 내용물이 다량 저류되어 있었다. 병리조직학적 검사결과 특이 병변은 없었으며, 소장 및 대장의 미생물 검사결과 *C. botulinum*이 검출되었다. 마우스접종실험은 독소에 의한 폐사로 추정되었다. *C. botulinum* type C 독소 특이 유전자를 확인하기 위해 폐체의 간, 폐, 소장, 근위에서 유전자를 증폭하여 검사한 결과 614 bp 특이 밴드가 확인되었다.

아포를 형성하는 세균으로 오염된 지역은 이 세균으로 인한 동일한 질병이 매년 반복하여 발생할 가능성이 높다. 본 증례보고가 이러한 질병의 예방관리에 도움이 되었으면 한다.

참고문헌

1. 김승곤, 김태운, 이건설. 최신병원미생물학. p. 193, 고문사, 서울, 1986.
2. 이현아, 임정근, 이재봉, 허재훈, 김현아, 신용익, 조용원, 이형, 이상도. 한 가족에서 식품에 의해 발생한 보툴리눔독소증. 대한신경과학회지 2004, **22**, 670-672.
3. 정경태, 강도현, 유천권, 최종현, 성원근. 국내 최초 보툴리누스 증독증 발생 1예. 대한임상미생물학회지 2003, **6**, 160-163.
4. Dohms JE, Cloud SS. Susceptibility of broiler chickens to *Clostridium botulinum* type C toxin. Avian Dis 1982, **26**, 89-96.
5. Duncan RM, Jensen WL. A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. J Wildl Dis 1976, **12**, 116-126.
6. Fowler ME, Miller RE. Zoo and Wild Animal Medicine. 5th ed. pp. 716-717, Saunders, St. Louis, 2003.
7. Fowler ME, Miller RE. Zoo and Wild Animal Medicine : Current Therapy. 4th ed. pp. 297-299, Saunders, St. Louis, 1999.
8. Franciosa G, Fencica L, Caldiani C, Aureli P. PCR for detection of *clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. J Clin Microbiol 1996, **34**, 882-885.
9. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. Clin Microbiol Rev 2006, **19**, 298-314.
10. Marion WR, O'Meara TE, Riddle GD, Berkhoff HA. Prevalence of *clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implications for epizootics of avian botulism. J Wildl Dis 1983, **19**, 302-307.
11. Martinez R, Wobeser G. Immunization of ducks for type C Botulism. J Wildl Dis 1999, **35**, 710-715.
12. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Donnelly WJ, Leonard FC. Clinical Veterinary Microbiology. pp. 196-199, Blackwell, Ames, 2002.
13. Schettler CH. Clostridium botulinum type C--toxic infection in broilers in North West Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1979, **92**, 50-57.
14. Shayegani M, Stone WB, Hannett GE. An outbreak of botulism in waterfowl and fly larvae in New York State. J Wildl Dis 1984, **20**, 86-89.
15. Smart JL, Roberts TA, McCullagh KG, Lucke VM, Pearson H. An outbreak of type C botulism in captive monkeys. Vet Rec 1980, **107**, 445-446.
16. Wobeser G. Avian botulism-another perspective. J Wildl Dis 1997, **33**, 181-186.
17. Wobeser G, Rainnie DJ, Smith-Windsor TB, Bogdan G. Avian botulism during late autumn and early spring in Saskatchewan. J Wildl Dis 1983, **19**, 90-94.