제주지역 망아지에서 *Rhodococcus equi* 감염증의 병리학적 특징

송경옥^{1,†} · 양형석^{2,†} · 손원근³ · 김재훈^{3,*}

¹제주특별자치도 동물방역과, ²제주특별자치도 동물위생시험소, ³제주대학교 수의과대학 및 수의과학연구소

Pathologic characteristics for the *Rhodococcus equi* infection in foals in Jeju

Kyung-Ok Song^{1,†}, Hyung-Seok Yang^{2,†}, Won-Geun Son³, Jae-Hoon Kim^{3,*}

¹Animal Health Division, Jeju Special Self-Governing Province, Jeju 63122, Korea

²Jeju Special Self-Governing Provincial Veterinary Research Institute, Jeju 63344, Korea

³College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Abstract: From 1996 to 2014, 14 foals from nine farms in Jeju were diagnosed with a *Rhodococcus equi* infection. Clinically, most foals showed characteristic respiratory signs, including hyperthermia and dyspnea. The seasonal occurrence of *R. equi* infection in foals was higher in summer, such as June (eight foals; 57.1%) and July (four foals; 28.6%), than in the other seasons. The major cases of *R. equi* infections were observed among two-month-old (eight foals; 57.1%) and three-month-old (three foals; 21.4%) foals. Histopathologically, bronchopneumonia, abscess, and granulomatous pneumonia were the most prevalent lesions in the lungs of foals. Colonic ulcers and submucosal abscesses were found in a foal. Some foals showed granulomatous lymphadenitis and abscesses in the mesenteric and other lymph nodes. According to the polymerase chain reaction using 10 tissue samples of foals and nine *R. equi* isolates, the *vapA* gene was detected in 11/11 (100%) foals. Immunohistochemical staining using the anti-VapA monoclonal antibody was applied to detect the *R. equi* VapA antigen in the organs of foals. *R. equi* VapA antigens were demonstrated in most lungs and some mesenteric and hilar lymph nodes of 13 foals. Isolated virulent *R. equi* VapA bacteria showed high sensitivity to gentamicin, quinolones, rifampin, and vancomycin.

Keywords: foal; immunohistochemistry; polymerase chain reaction; *Rhodococcus equi*; VapA

서 론

*Corresponding author

Jae-Hoon Kim
College of Veterinary Medicine and
Veterinary Medical Research Institute, Jeju
National University, 102 Jejudaehak-ro,
Jeju 63243, Korea

Tel: +82-64-754-3387
Fax: +82-64-702-9920
E-mail: kimjhoon@jejunu.ac.kr

[†]The first two authors contributed equally
to this work.

ORCID:
Kyung-Ok Song
https://orcid.org/0000-0003-2195-5060
Hyung-Seok Yang
https://orcid.org/0000-0003-4500-8826
Won-Geun Son
https://orcid.org/0000-0003-2513-2328
Jae-Hoon Kim
https://orcid.org/0000-0002-4410-9126

Conflict of Interest
There is no conflict of interest.

Received: April 29, 2019
Revised: June 24, 2019
Accepted: June 27, 2019

*Rhodococcus equi*는 방선균목의 노카르디아과에 속하는 그람양성의 편성 세포내 기생성 세균이며, 전 세계적으로 토양 및 초식동물의 분변 등에서 발견되고, 여름철 고온 환경에서 잘 증식하여 방목지 동물과 이들의 사육환경 속에 널리 분포되어 있다[1-3].

*R. equi*는 1923년 스웨덴에서 Magnusson에 의해 망아지의 화농육아중성 폐렴 병변에서 처음 분리되었고, 과거에는 *Corynebacterium equi*라고 불렸다[3]. 이 후에는 소, 염소, 돼지, 고양이 등에서 산발적인 감염을 유발하기도 하였다[3,4]. 사람에서는 1967년 Golub에 의해 면역계가 손상된 사람의 폐 농양과 피하 농양에서 처음 분리 보고되었으며[2], 최근에는 사람 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus)에 감염된 환자와 같이 면역력이 저하된 사람에서 기회감염을 일으키는 중요한 병원체로 부각되었다[2,3]. 국내에서도 이 병원체로 인한 인체 감염 예가 2건 보고된 바 있다[5,6].

*R. equi*는 6개월령 이하의 망아지에서 주로 농양을 동반한 만성 화농성 기관지폐렴을 유발한다. 폐장 병변이 있는 망아지의 약 50%에서는 폐양성 장염과 결장 또는 장간막 림프절의 염증 소견 등 장 병변이 수반되어 관찰되지만 이와 관련된 특별한 임상증상은 나타내지 않는다. 또한 약 4%의 망아지에서는 폐장 병변 없이 장에만 국한된 병변이 나타나기도 한다. 이외에도 다발성 관절염, 피부 농양, 간 또는 비장의 농양, 골수염, 폐양성 림프관염, 임신마에서의 태반염과 유산 등을 일으키기도 한다[1,3].

최근에는 병독성 관련 단백질(virulence-associated proteins; Vap)과 병독성 플라스미드(virulence plasmids)의 발견[7]을 토대로 *R. equi*를 병독성, 중간 병독성, 무병독성의 세 가지로 분류한다. 병독성 관련 85~90 kb의 플라스미

드와 VapA 항원은 *R. equi*에 감염된 망아지의 화농성 폐렴 또는 장 병변에서 주로 분리되어 망아지에서 병원성을 나타내는 주요 인자로 밝혀졌다. 따라서 이 두 가지 병원성 관련 인자의 검출은 말과 주위 환경에서 병독성 *R. equi* 균체의 존재를 확인하는데 있어서 역학적 지표로 사용되고 있다[7].

국내에서 사육되는 말에 대한 *R. equi* 연구는 그다지 많지 않다. Takai 등[8]은 제주지역의 말 분변과 말 사육 목장의 토양에서 병원성 *R. equi*를 분리하였고, Son 등[9]은 제주지역 말의 분변, 토양 및 폐렴 병소에서 분리한 병원성 균주와 일본 Kiso 지역에서 분리한 병원성 균주의 분자생물학적 차이점을 보고하였다. 그리고 Kim 등[10]은 경기도와 인천 지역에서 사육되고 있던 망아지에서 *R. equi* 감염 증례와 분리된 균주에 대한 특징을 보고하였다.

본 연구는 제주지역 말 사육목장에서 발생한 망아지 *R. equi* 감염증의 병리조직학적 특징을 파악하고 병변 형성에 관여하는 균체의 유전자형을 규명함과 동시에 면역조직화학적 검사를 통해 내부 실질 장기 병변에서 *R. equi* 병독성 균주 VapA 단백질의 존재를 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

공시동물은 1996년부터 2014년까지 제주도내 9개 말 사육 목장으로부터 제주대학교 수의병리학교실 및 제주특별자치도 동물위생시험소에 병성감정 의뢰된 망아지를 대상으로 하였다. 그 중 조직검사, 세균배양 검사 및 중합효소연쇄반응법에 의해 *R. equi* 감염증으로 진단된 13마리의 부검축과 1마

리의 기관 삼출물 등 총 14마리의 망아지 시료를 실험에 공여하였다. 각 개체에 대한 검사시료 세부내역은 Table 1과 같다.

육안 및 병리조직학적 검사

폐사되어 의뢰된 13마리의 망아지는 일반적인 절차에 따라 부검을 수행하여 외관검사 및 내부장기의 육안병변을 확인하였다. 폐장, 심장, 간장, 비장, 신장, 림프절, 소화기계 등의 내부장기를 채취하였고, 10% 중성완충포르말린에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 조직 처리과정에 따라 파라핀 포매하여 3-4 µm로 절편을 제작하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 또한 조직 병변 내 세균의 감염 여부 확인 및 다른 질병과의 감별진단을 위한 특수염색으로 Gram, Periodic Acid-Schiff (PAS) 및 Ziehl-Neelsen 염색을 실시하였다.

세균 배양 검사

부검축 13마리에서 병변이 확인된 폐장, 대장 및 장간막 림프절과 환축 1마리의 기관 삼출물로부터 원인균을 분리하기 위해 무균적으로 시료를 채취하여 혈액배지와 MacConkey agar에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 호기배양하였다.

중합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction; PCR)

1) 신선 조직에서의 핵산 추출

부검축 13마리 중 -70°C에 보관되어 있던 10마리의 폐장 등 신선 생조직에서 QIAamp DNA mini kit (Qiagen,

Table 1. Tested internal tissues and samples of foals

Case No.	Tested tissues									
	Lung	Large intestine	MS/LN	LN	Liver	Heart	Kidney	Spleen	Skin	Brain
1	○	○	○	○	○	○	○	○		○
2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
3	○				○		○	○		
4	○	○	○	○	○	○	○	○		○
5	○	○	○	○	○	○	○	○		○
6	○	○	○	○	○	○	○	○		
7	○									
8	○									
9	○	○	○	○	○	○	○	○		
10	○									
11	○			○	○		○	○		
12	○	○		○		○	○	○		○
13	○				○		○	○		
14*										
Total	13	7	6	8	9	7	10	10	1	4

MS, mesenteric; LN, lymph node.

*Tested sample: tracheal exudates.

Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출 시료는 냉동 보관된 생조직과 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA)를 1:10 비율로 혼합하여 균질화 시킨 후 상층액을 이용하였다. 1.5 mL eppendorf tube에 시료의 상층액 200 µL, proteinase K 20 µL 및 buffer AL 200 µL를 첨가하여 잘 혼합한 다음 56°C에서 10분 동안 정치하였다. 시료에 100% 에탄올 200 µL를 넣고 혼합한 후 QIAamp spin column에 혼합물을 조심스럽게 옮긴 후, 8,000 rpm에 1분간 냉장원심분리하고 새로운 2 mL collection tube에 QIAamp spin column을 장착하였다. 완충액 AW1 500 µL를 분주한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 새로운 2 mL collection tube에 QIAamp spin column을 장치하고 buffer AW2 500 µL를 분주한 후 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 새로운 1.5 mL eppendorf tube에 QIAamp spin column을 장치하고 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA) 200 µL를 첨가한 후 실온에서 1분간 정치한 다음 마지막으로 8,000 rpm에 1분간 원심분리를 실시하였다. 최종 추출물은 PCR 검사 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다.

2) 균체로부터의 핵산 추출

폐장 병변 및 기관 삼출물에서 분리되어 -70°C에 보관 중이던 9개의 *R. equi* 균주를 혈액배지에 재도말하여 증식된 신선한 세균집락으로부터 핵산을 추출하였다. 1.5 mL eppendorf tube에 1 mL의 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA)를 넣고 각각의 세균 집락을 현탁하였다. 각 현탁액을 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 침전물에 DNase RNase free distilled water 300 µL를 넣은 후 100°C에 10분간 정치한 다음 -20°C에 냉동시켰다. 해동된 침전물을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액에서 DNA를 추출하였다.

3) Oligonucleotide primer의 염기서열 및 PCR 반응조건

R. equi 균주의 병독성 *vapA* 유전자 검출을 위한 primer는 Takai 등[11,12]의 방법에 따라 forward primer (5'-GACTCTTCACAAGACGGT-3') 및 reverse primer (5'-TAG GCG TTG TGC CAG CTA-3')를 제작하여 이용하였다.

분리 세균 또는 조직에서 추출한 DNA 2 µL와 각각의 primer 0.5 µL (20 pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17 µL를 AccuPower HotStart PCR PreMix (Bioneer K-5050, Korea)에 첨가하여 최종 반응 용량이 20 µL가 되도록 하였다. PCR 반응조건은 94°C에 10분간 반응한 다음 94°C 1분 30초, 55°C 1분 및 72°C에 각 2분씩 40회 반복하고 최종 72°C에서 5분간 반응하였다[11,12].

반응 종료 후, 각각의 반응액 7 µL씩을 취하여 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 다음 RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Intron biotechnology, Korea) 용액(0.5 µL/mL in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator로 *R. equi vapA* 유전자에 대한 특이적인 564 bp의 밴드

유무를 확인하였으며, 증폭산물의 크기를 확인하기 위하여 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea)를 마커로 사용하였다.

면역조직화학적 검사(Immunohistochemistry; IHC)

부검축 13마리의 조직 내에서 *VapA* 항원의 분포를 조사하고 *R. equi* 감염에 따른 세포학적 변화상을 확인하기 위하여 Envision polymer reagent (Dako, Denmark) 방법으로 IHC를 수행하였다. 각 조직을 4-5 µm 두께로 절편하여 silane 코팅 슬라이드에 부착한 후, 탈파라핀 및 함수과정을 거쳤다. 조직 내 존재하는 peroxidase를 제거하기 위해 3% H₂O₂가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 10분간 반응시켰으며, 항원성의 부활을 위해 0.05% protease XIV (Sigma, USA)로 37°C에서 20분간 반응시켰다. 일차 항체로는 mouse monoclonal anti-*VapA* (Mab 10G5) antibody (Kitsato University, Japan)를 사용하였으며 antibody diluent solution (Dako, USA)에 1:5,000의 농도로 희석한 다음 조직 절편에 적하하여 37°C에서 1시간 처리한 다음 이차 항체에 40분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS 수세를 거친 뒤 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (Dako, Denmark)로 발색하였으며, 대조염색은 Mayer's hematoxylin (Sigma, USA)으로 염색하였다.

항생제 감수성 검사

폐장 병변 및 기관 삼출물에서 분리된 9개의 *R. equi* 균체에 대하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 항생제 감수성 디스크는 BBL사 제품으로 chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazol/trimethoprim, tetracycline, vancomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, oxytetracycline, kanamycin, cefazolin, rifampin과 Oxoid사 제품으로 ceftiofur, penicillin G, erythromycin, ampicillin, neomycin, enrofloxacin 등 총 18종의 항생제를 사용하였으며, 감수성 여부는 각각의 제조회사에서 제시한 감수성 판정 기준을 따랐다. 균체는 0.5 McFarland 혼탁도를 기준으로 조정하여 혈액배지에 점종균액을 멸균멸봉으로 배지 전체에 균질하게 도말한 다음 항생제 디스크를 배지표면에 부착시키고 37°C에서 48시간 배양하였으며, 디스크 주위에 형성된 억제대의 직경으로 감수성 여부를 판정하였다.

결 과

R. equi 감염증 발생상황

임상적으로 *R. equi*에 감염된 망아지들은 고열을 동반한 식욕저하, 호흡곤란, 비루, 기침 등의 호흡기 증상을 보였다. *R. equi*에 감염된 14마리에 대하여 계절별 및 연령별 발생 시기를 분석한 결과 계절적으로는 6월이 가장 많은 8마리(57.1%), 7월이 4마리(28.6%), 5월 및 8월이 각각 1마리(7.1%) 순으로 나타났다.

연령이 확인되지 않는 1마리를 제외하고 각 개체의 연령별로는 생후 2개월령이 가장 많은 8마리(57.1%), 3개월령 3

Table 2. Gross findings for foals infected with *Rhodococcus equi*

Tissues	Macroscopic lesions	Location	No. of cases (%)
Lung (n = 13)	Abscess	Cranial or caudal lobe	12 (92.3)
Large intestine (n = 7)	Ulcer and abscess	Cecum, colon	1 (14.3)
Mesenteric lymph node (n = 6)	Swelling and abscess	Mesenteric lymph node	4 (66.7)
Lymph node (n = 8)	Swelling and abscess	Hilar lymph node	2 (25.0)
Skin (n = 1)	Abscess	Mandibular area	1 (100)

Number of cases according to the anatomic distribution of pulmonary abscesses: cranioventral 2, caudodorsal 5, diffuse 3, unknown 2.

Fig. 1. Gross findings. (A and B) White to tan multifocal abscesses (arrows) ranged from 1 to 10 cm in diameter in the lungs. (C) Note the abscess (arrow) in the enlarged mesenteric lymph node. (D) Multifocal ulcerations (arrow) on the colonic mucosa.

마리(21.4%), 1개월령 2마리(14.3%)의 순으로 나타났다. 또한 목장의 위치가 확인되지 않은 1마리를 제외하고 제주도에서 지역별 질병 발생 분포를 살펴보았을 때 한림지역이 가장 많은 5마리, 조천지역 4마리, 구좌와 제주시 해안동에서 각각 2마리가 발생하였다. 특히 한림 지역의 4마리는 동일한 목장에서 발생하고 있었다.

육안소견

*R. equi*에 감염된 망아지의 육안병변으로 폐장에 농양소견이 부검축 13마리 중 12마리(92.3%)에서 확인되어 가장 빈번하였다(Table 2). 폐 농양은 주로 전복측엽 내지 후복측엽에 1–10 cm의 용기된 유백색 결절성 병소가 국소 다발성으로 관찰되었고(Fig. 1A and B), 단면상에서는 암황색의 비지 또는 크림양 병소를 유백색의 결제질이 둘러싸고 있었다.

복강 내에서는 장간막 림프절의 종대 및 농양이 6마리 중 4마리(66.7%)에서 확인되었고, 결장의 농양은 7마리 중 1마리(14.3%)에서 관찰되었다. 종대된 장간막 림프절은 화농성

병소를 함유하고(Fig. 1C), 결장 점막은 발적되고 3 mm 내외의 용기된 궤양이 다발성으로 관찰되었다(Fig. 1D). 또한 한 개체의 하악부 피부에 5 cm 정도의 용기된 병소가 관찰되었으며, 단면 절개 시 유백색의 화농성 삼출물로 충만되어 있었다.

병리조직학적 소견

부검축 13마리에 대한 병리조직학적 검사 결과, *R. equi* 감염 시 주된 병변은 폐장에서 관찰되었으며 기관지폐렴, 농양 및 화농육아종성 폐렴 등의 세 가지 병변이 단독보다는 혼재되어 분포하고 있었다(Table 3). 폐장의 기관지 및 폐포강 내에 중성호성 백혈구와 단핵세포들이 침윤되어 있는 기관지폐렴이 9마리에서 관찰되었다. 또한 변성 또는 붕괴된 중성호성 백혈구로 구성된 폐농양(Fig. 2A) 또는 폐포강 내에 중성호성 백혈구, 단핵세포, 다핵거대세포를 함유하고 폐포벽의 상피화(epithelialization)가 동반되어 있는 화농육아종성 폐렴(Fig. 2B)이 각각 11마리의 개체에서 관찰되었다. 전

Table 3. Histopathologic findings of foals infected with *Rhodococcus equi*

Tissue	Microscopic lesions	No. of cases (%)	Notes
Lung (n = 13)	Bronchopneumonia (A)	9 (69.2)	A + B = 2 (15.4%)
	Abscess (B)	11 (84.6)	A + B + C = 7 (53.8%)
	Granulomatous pneumonia (C)	11 (84.6)	B + C = 2 (15.4%)
Colon (n = 7)	Abscess	1 (14.3)	
Mesenteric lymph node (n = 6)	Abscess (A)	4 (66.7)	A + B = 3 (50.0%)
	Granulomatous lymphadenitis (B)	3 (50.0)	
Lymph node (n = 8)	Abscess (A)	2 (25.0)	A + B = 1 (12.5%)
	Granulomatous lymphadenitis (B)	1 (12.5)	
Liver (n = 9)	Chronic hepatitis	7 (77.8)	
Skin (n = 1)	Subcutaneous abscess	1 (100)

Fig. 2. Histopathologic findings. (A) The lungs. Note the large pulmonary abscesses (a) (H&E; scale bar = 200 μ m). (B) The lungs. The alveolar lumens contained neutrophils, mononuclear cells and multinucleated giant cells (arrows) (H&E; scale bar = 50 μ m). (C) The colon. Note the mucosal ulceration (arrow) and submucosal abscess (a) (H&E; scale bar = 200 μ m). (D) The mesenteric lymph node. Severe infiltration of mononuclear cells and multinucleated giant cells (arrows) in the lymph node (H&E; scale bar = 50 μ m). (E) Macrophages contained intra-cytoplasmic coccobacilli (arrows) (H&E; scale bar = 10 μ m). (F) Note the cytoplasmic Gram-positive coccobacilli in the macrophages and giant cells (arrows) (Gram stain; scale bar = 10 μ m). H&E, Hematoxylin and eosin.

체적으로 7마리의 망아지 폐장에서 기관지폐렴, 폐농양 및 육아종성 폐렴이 공존하고 있었다.

소화기 병변으로 결장 점막에서는 심한 궤양으로 인하여 상피세포가 소실되고 점막하층의 농양 형성(Fig. 2C)이 1마

리에서 관찰되었다. 또한 장간막 림프절에서는 농양 또는 단핵세포와 다핵거대세포가 침윤되어 있는 육아종성 림프절염 (Fig. 2D)이 관찰되기도 하였다. 경부 또는 폐문 림프절에서도 농양이 2마리에서, 육아종성 림프절염이 1마리에서 관찰

Fig. 3. (A) Isolated mucoid and salmon-pink colonies on blood agar were confirmed as Gram-positive coccobacilli (B). (C) PCR products of VapA (PC, VapA positive control; Lane M, 100 bp DNA ladder; NC, negative control; lane 1, isolated bacterial colony; lane 2, pulmonary exudates from case No. 14 foal). PCR, polymerase chain reaction.

Table 4. Immunohistochemical results of VapA antigen expression in the internal tissues of foals in comparison with the results of PCR

Case No.	Lung (n = 13)	Intestine (n = 7)	Mesenteric lymph node (n = 6)	Lymph node (n = 8)	Skin (n = 1)	Note (PCR results)
1	-	-	-	-	NT	VapA
2	+	-	+	-	+	VapA
3	+	NT	NT	NT	NT	VapA
4	+	-	+	-	NT	VapA
5	+	+	+	-	NT	VapA
6	+	-	-	-	NT	VapA
7	+	NT	NT	NT	NT	VapA
8	+	NT	NT	NT	NT	VapA
9	+	-	+	-	NT	VapA
10	+	NT	NT	NT	NT	VapA
11	+	NT	NT	+	NT	NT
12	+	-	NT	+	NT	NT
13	+	NT	NT	NT	NT	NT
Total (%)	12 (92.3)	1 (14.3)	4 (66.7)	2 (25.0)	1 (100)	

PCR, polymerase chain reaction; NT, not tested.

되었다.

간의 경우 간 실질에 국소적으로 중성호성 백혈구와 단핵세포가 침윤된 만성 간염이 관찰되었다. 하악부 피부에 융기된 병소가 있던 개체의 피하조직에서는 농양과 함께 수양성 염증 삼출물이 들어 있는 낭상구조물이 관찰되기도 하였다.

폐장, 결장 및 림프절의 농양 또는 육아종성 병변에 침윤된 다핵거대세포 또는 큰포식세포의 세포질에서는 다수의 구간균(Fig. 2E)이 관찰되었다. 이 균체들은 Gram 염색 결과 양성 구간균(Fig. 2F)으로 확인되었으며, PAS 및 Ziehl-Neelsen 염색 시 모두 음성반응을 나타내었다.

세균 배양 검사 및 PCR결과

세균분리를 시도한 결과 의뢰된 14마리의 시료 중 부검축 8마리의 실질장기와 1마리의 기관 삼출물에서 총 9개의 *R. equi* 균주를 분리할 수 있었다. 균체들은 혈액배지에서 점액성이 강하고 연어살색인 전형적인 *R. equi* 양 집락(Fig. 3A)을 형성하였으나 MacConkey 배지에서는 자라지 않았다. 혈액배지에 증식한 세균 집락은 염색 결과 Gram 양성의 구간균으로 확인되었다(Fig. 3B).

부검축 13마리 중 -70°C에 보관되어 있던 10마리의 폐장을 포함한 신선 조직과 분리된 9개의 *R. equi* 균주의 유전

Fig. 4. Immunohistochemistry. (A) The lungs. Numerous positive reactions for VapA antigens of inflammatory cells in the alveoli and abscess (IHC; scale bar = 100 μ m). Note the positive reactions in the macrophages (insert) (IHC; scale bar = 20 μ m). (B) The lymph node. Strong positive reactions for VapA antigens in the abscess (a) (IHC; scale bar = 100 μ m). Note the positive reactions in the macrophage and multi-nucleated giant cells (insert) (IHC; scale bar = 20 μ m). IHC, immunohistochemistry.

Table 5. Results of the antimicrobial susceptibility for *Rhodococcus equi* isolates from foals

Antimicrobial agents	Disc contents (μ g)	No. of isolates (n = 9)			Sensitivity (%)
		R	I	S	
Amoxicillin/Clavulanic acid	20/10	0	0	9	100
Ceftiofur	30	0	0	9	100
Ciprofloxacin	5	0	0	9	100
Enrofloxacin	5	0	0	9	100
Gentamicin	10	0	0	9	100
Neomycin	30	0	0	9	100
Rifampin	5	0	0	9	100
Vancomycin	30	0	0	9	100
Erythromycin	15	0	1	8	88.9
Kanamycin	30	0	1	8	88.9
Streptomycin	10	0	1	8	88.9
Chloramphenicol	30	1	1	7	77.8
Ampicillin	10	0	3	6	66.7
Penicillin	10	3	0	6	66.7
Cefazolin	30	6	2	1	11.1
Oxytetracycline	30	9	0	0	0
Sulfamethoxazole/trimethoprim	23.72/1.25	9	0	0	0
Tetracycline	30	9	0	0	0

R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

자형을 확인하기 위한 PCR 검사 결과 검사한 시료 모두에서 564 bp의 특이 밴드가 검출되어 총 11마리에서 *vapA* 유전자(Fig. 3C)가 확인되었다.

면역조직화학 검사 결과

IHC 기법을 이용하여 VapA 항원의 조직 내 발현 양상을 검사한 결과 폐장(92.3%)과 장간막 림프절(66.7%)에서는 항원 발현이 높은 반면 기타 림프절(25.0%)과 대장(14.3%)에서는 낮게 검출되었다(Table 4). VapA 항원은 폐장, 장간막 림프절 및 대장의 농양 병소와 육아종성 염증 병변에 침윤

된 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질 내에서 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 간, 비장, 신장, 뇌 등의 기타 조직에서는 음성반응을 보였다.

항생제 감수성 검사 결과

분리된 *R. equi* 9개 균체를 대상으로 항생제 감수성 여부를 검사한 결과 가장 효과적인 항생제로는 amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur, gentamicin, neomycin, quinolones 계열, rifampin, vancomycin임을 알 수 있었다. 그러나 sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline 계열 및 cefazolin에

는 강한 내성을 가지는 것으로 확인되었다(Table 5).

고 찰

*R. equi*가 망아지에 감염되기 용이한 환경적 요인으로서는 고온의 여름 환경, 건조한 방목장, 과밀 사육, 중성 pH 토양 등이 있다[1,3,13]. 대체로 본 균체는 주로 어린 망아지에서 모체이행항체가 감소하거나 세포성 면역이 저하될 때 기회 감염되어 질병을 유발하게 된다[14]. 말은 단발정의 계절성 번식을 하는 특성을 가지기 때문에 제주도 내에서는 주로 3월 초순에서 7월 초순까지 교배를 하고 335-350일의 임신기간을 거쳐 이듬해 봄에서 여름 사이 망아지가 태어나게 된다. 본 연구에서는 *R. equi*에 감염된 총 14마리의 망아지에 대하여 질병 발생 시기를 분석한 바, 계절적으로는 온도가 높아지는 6-7월(85.7%)에 개체의 연령별로는 모체이행항체가 떨어지는 시기인 생후 2-3개월령(78.5%)에서 주로 발생하는 양상을 보였다. 특히 제주도에 6-7월은 계절적으로 본 병원체의 증식과 전파에 용이한 환경을 조성하는 고온기에 해당하고, 봄에 태어난 개체에서는 모체이행 항체 수준이 떨어져 면역이 저하되고 질병에 대한 감수성이 높아질 수 있는 시기에 접어들기 때문에 *R. equi* 감염이 많이 발생하는 것으로 판단된다.

균체 감염에 따른 말 폐장의 병리학적 병변은 *R. equi*의 감염 시기, 개체 면역상태, 감염연령에 따라서 화농성 기관지폐렴부터 건락괴사를 동반한 육아종성폐렴까지 다양하게 발생할 수 있다[4]. 폐렴 병소는 주로 폐의 전복측엽에 발생하지만 심한 경우 폐장의 전반에 걸쳐 분포한다[13]. 감염된 균체로 인해 화농성 기관지폐렴이 유발되어 농양으로 진행되고 시간이 지나면서 점차 만성화되어 화농육아종성 결절로 변형되며 일부의 병소들은 서로 융합하여 건락성 삼출물을 포함한 큰 결절들을 형성할 수도 있다[4]. 본 실험에서 *R. equi*에 감염된 망아지에서는 육안적으로 폐장의 농양이 가장 많이 나타났으며 주로 전복측엽 내지 후배측엽에 용기된 유백색의 결절성 병소가 국소 다발성으로 관찰되었다. 병리조직학적으로 폐장 병변의 유형을 세분하여 관찰한 결과 기관지폐렴, 화농육아종성 폐렴 및 농양 등 3가지 소견으로 구분되었다. 각 개체는 한 가지의 폐 병변이 독립적으로 존재하기 보다는 주로 세 가지 병변이 혼재되어 나타났고 초기 변화상인 기관지폐렴에서 만성의 화농육아종성폐렴으로 진행되는 양상을 보였다. *R. equi* 감염에 의한 소화기 병변은 결장, 맹장 및 장간막 림프절에서 가장 흔하게 발생하지만 소장에서도 병변이 형성될 수 있다. 대장 점막면에 궤양이 발생하고, 이와 연결된 장 관련 림프조직(gut-associated lymphatic tissue; GALT)에는 괴사와 농양이 분포하며, 세균을 탐식한 큰포식세포가 주위 림프절로 파급된다. 따라서 장간막 또는 결장 관련 림프절이 종창되고 조직학적으로 농양과 육아종을 형성한다[15]. 본 실험에서도 1마리의 결장에서 궤양과 농양이 관찰되었고 결장 내 농양은 GALT를 중심으로 분포하고 있었다. 또한 66.7% (4/6)의 장간막 림프절에서

중성호성 백혈구로 구성된 농양과 함께 단핵세포와 다핵거대세포가 침윤된 육아종성 림프절염이 확인되어 전형적인 장염형 *R. equi* 감염임을 확인할 수 있었다.

망아지에서 폐렴이나 폐농양을 유발할 수 있는 병원체로는 *R. equi* 이외에도 *Streptococcus equi* subspecies (subsp.) *zooepidemicus*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 등이 있다. 특히 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*는 특징적으로 폐농양을 형성하기 때문에 이들 병원체에 대한 감별진단이 특별히 요구된다[16]. 장 병변의 경우에도 살모넬라균체, cyathostomes (small strongylus) 및 *Listeria monocytogenes*가 혼합 감염된 말에서 유사한 장점막 궤양과 육아종성 장염이 발생되어 이러한 질병과도 감별이 필요할 것으로 생각된다[17]. 본 연구에서는 세균배양검사, PCR, 병리조직 특수염색, IHC 검사 등을 통하여 *R. equi* 감염증으로 최종 진단되었다. 특히 특수 염색과 IHC를 통하여 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질에 감염되어 있는 편성 세포내 기생성 세균인 *R. equi*를 증명하였으며 다른 세균성 질병과의 감별 진단이 용이하였다.

본 연구에서 조직 내 *R. equi*의 VapA 항원을 확인하기 위하여 IHC에 이용된 단클론항체는 Takai 등[18]에 의해 개발되었다. 이후 Madarame 등[19]은 IHC 기법을 이용하여 폐장의 농양 부위에 침윤된 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질에 VapA 항원이 주로 분포하고 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 총 13마리의 폐장 중 농양이 형성되어 있지 않은 1마리를 제외한 12마리의 폐장에서 VapA 항원이 발현되었다. 이외에도 장간막 림프절, 림프절, 결장, 피부 등 주로 농양 또는 화농육아종성 병변이 관찰되었던 조직에서 항원 양성반응이 관찰되었다. 세포 수준에서는 폐장을 비롯한 여러 장기의 농양 병소 또는 인근의 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질에서 항원이 관찰되어 다른 연구자의 보고와 일치하였다. 따라서 IHC 검사 기법은 세균배양이 용이하지 않은 포르말린 고정 시료에서 병독성 *R. equi* 감염을 진단하기에 매우 유용한 진단법으로 판단된다.

본 연구에서 분리된 *R. equi* 9개 균주들이 가지는 항생제 감수성은 제주도 분리 균주[20] 및 경인 지역 분리 균주[10]와 대체로 유사한 것으로 확인되었다. 그러나 kanamycin, penicillin 제제 및 streptomycin항생제에는 중등도의 감수성을 나타내고 있었다. 일반적으로 야외에서 본 질병의 치료제로 추천되는 erythromycin과 rifampin의 경우 각각 100% 및 88.9%의 높은 감수성을 보이고 있었다. 실험적으로 시험관 내에서의 균체에 대한 다양한 항생제의 적용은 가능하지만, *R. equi* 균체는 세포 내에 기생하고 병변도 결합조직에 둘러싸인 만성 육아종성 병소를 만들기 때문에 감염된 말에서의 실질적인 항생제 효능은 실험실 결과와 다소간의 차이가 있을 것으로 추정된다. 특히 rifampin과 erythromycin은 지용성 항생제로서 건락화된 물질 및 세포 내로의 침투가 용이하기 때문에 병용 시 서로의 내성을 줄여주고 상승효과를 발휘하여 *R. equi* 감염 망아지의 치료에 적극 활용할 수 있을 것으로 사료된다[1,2].

말은 다른 동물에 비해 개체별 특이성이 높은 반면, 가축 중에서 가장 생산효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 국내에서 매년 교배하는 더리브렛 씨암말의 임신율은 약 85%~90% 정도이나 이듬해 태어나는 망아지는 임신한 씨암말 대비 65%~79% 정도에 불과하다[21]. 전 세계적으로 망아지에서 이환율과 치사율에 매우 높은 병원체로 작용하고 있는 *R. equi*의 목장 내 감염은 적게는 말 사육 농가에 경제적으로 손실을 유발하고, 장기적으로는 말 산업 전반에 악영향을 초래할 수 있다[4]. 제주도에서는 제주마, 한라마 및 경주마 등 전국 대비 60% 정도의 말을 사육하고 있어 말 산업의 메카로 알려져 있으며, 2014년에는 군내 최초로 말산업 특구로 지정되었다. 그러므로 본 질병에 대한 전반적인 이해를 통한 조기진단과 적절한 치료 및 질병예방을 위한 농장 및 마필의 체계적인 관리가 반드시 필요한 것으로 사료된다.

References

- Hines MT. *Rhodococcus equi*. In: Sellon DC, Long M (eds.). Equine Infectious Disease. pp. 281-316, Saunders Elsevier, St. Louis, 2007.
- McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev 1994;7:357-417.
- Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin Microbiol Rev 1991;4:20-34.
- López A. Respiratory system. In: McGavin MD, Zachary JF (eds.). Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4th ed. pp. 519-521, Mosby Elsevier, St. Louis, 2007.
- Lee YM. A case of empyema and metastatic abscess by *Rhodococcus*. Inje Med J 2002;23:665-670.
- Yoo SJ, Sung H, Chae JD, Kim MN, Pai CH, Park J, Kim JJ. *Rhodococcus equi* pneumonia in a heart transplant recipient in Korea, with emphasis on microbial diagnosis. Clin Microbiol Infect 2003;9:230-233.
- Takai S, Koike K, Ohbushi S, Izumi C, Tsubaki S. Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. J Clin Microbiol 1991;29:439-443.
- Takai S, Son WG, Lee DS, Madarame H, Seki I, Yamatoda N, Kimura A, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, Lim YK. *Rhodococcus equi* virulence plasmids recovered from horses and their environment in Jeju, Korea: 90-kb type II and a new variant, 90-kb type V. J Vet Med Sci 2003;65:1313-1317.
- Son WG, Lee DS, Yamatoda N, Hatori F, Shimizu N, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, Takai S. Molecular typing of VapA-positive *Rhodococcus equi* isolates from Jeju native horses, Korea. J Vet Med Sci 2006;68:249-253.
- Kim SJ, Yook SY, Hwang JS, You MJ, Jun MH. *Rhodococcus equi* pneumonia in foals in Gyeonggi-do and characterization of the isolates from lesions and environment. Korean J Vet Res 2008;48:139-143.
- Takai S, Chaffin MK, Cohen ND, Hara M, Nakamura M, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, Martens RJ. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. J Vet Diagn Invest 2001;13:489-494.
- Takai S, Tharavichitkul P, Takarn P, Khantawa B, Tamura M, Tsukamoto A, Takayama S, Yamatoda N, Kimura A, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Maneekarn N, Sirisanthana T, Kirikae T. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. J Infect Dis 2003;188:1717-1723.
- Caswell JL, Williams KJ. Respiratory system. In: Maxie MG (ed.). Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals Volume 2, 5th ed. pp. 630-632, Saunders Elsevier, New York, 2007.
- Takai S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. Vet Microbiol 1997;56:167-176.
- Gelberg HB. Alimentary system. In: McGavin MD, Zachary JF (eds.). Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4th ed. pp. 368-369, Mosby Elsevier, St. Louis, 2007.
- Davis EG, Freeman DE, Hardy J. Respiratory infections. In: Sellon DC, Long M (eds.). Equine Infectious Disease. pp. 1-20, Saunders Elsevier, St. Louis, 2007.
- Nemeth NM, Blas-Machado U, Hopkins BA, Phillips A, Butler AM, Sánchez S. Granulomatous typhlocolitis, lymphangitis, and lymphadenitis in a horse infected with *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and cyathostomes. Vet Pathol 2013;50:252-255.
- Takai S, Iie M, Kobayashi C, Morishita T, Nishio T, Ishida T, Fujimura T, Sasaki Y, Tsubaki S. Monoclonal antibody specific to virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*. J Clin Microbiol 1993;31:2780-2782.
- Madarame H, Takai S, Morisawa N, Fujii M, Hidaka D, Tsubaki S, Hasegawa Y. Immunohistochemical detection of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* in pulmonary lesions of foals. Vet Pathol 1996;33:341-343.
- Song HH, Moon JH, Kang TY, Son WG. *Rhodococcus equi* infections in foals. J Vet Clin 2006;23:169-174.
- Yang YJ, Cho GJ, Nam TC. A survey on characteristics of reproduction in Jeju Thoroughbred mares. Korean J Vet Res 2004;44:105-111.