



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주지역 망아지에서  
*Rhodococcus equi* 감염증에 관한  
병리학적 특징

제주대학교 대학원

수의학과

송 경 옥

2015월 2월

제주지역 망아지에서  
*Rhodococcus equi* 감염증에 관한  
병리학적 특징

지도교수 김 재 훈

송 경 옥

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2014년 12월

송경옥의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ (印)

위 원 \_\_\_\_\_ (印)

위 원 \_\_\_\_\_ (印)

제주대학교 대학원

2014년 12월

# Pathologic Characteristics on *Rhodococcus equi* Infection in Foals in Jeju

Kyung-Ok Song

(supervised by professor Jae-Hoon Kim)

Department of Veterinary Medicine

Graduate school, Jeju National University, Jeju, Korea

## Abstract

*Rhodococcus (R.) equi* is an aerobic Gram-positive coccobacillus which frequently causes chronic bronchopneumonia with abscesses and ulcerative enteritis in foals less than 6 months old. *R. equi* is widespread in the environment of horse-breeding farms and has been isolated from the soil of paddocks and the feces of many herbivores. Endemic form of *R. equi* infection is regarded as economically important disease in the global horse industry today. The purpose of this study was to investigate the genotype of bacteria associated with the formation of lesions and pathologic characteristics on *R. equi* infection in foals in Jeju. From 1996 to 2014, a total 15 foals from 9 farms were diagnosed as *R. equi* infection at the Diagnostic Laboratory of Jeju Veterinary Research Institute and the Pathology Department of Veterinary Medicine, Jeju National University. Clinically, most foals showed characteristic respiratory signs including hyperthermia and dyspnea. Seasonal occurrence of *R. equi* infection in foals was higher in June (8 foals; 53.3%) and July (4 foals; 26.7%) than in other month. Major cases of *R. equi* infection were observed among 2 month-old (8 foals; 53.3%) and 3 month-old (3 foals; 20.0%) foals. Histopathologically, bronchopneumonia, abscess and granulomatous pneumonia were most prevalent lesions in the lungs of foal. Colonic ulcer and submucosal abscess were found in a foal. Some foals showed granulomatous

lymphadenitis and abscess in mesenteric and other lymph nodes. According to polymerase chain reaction using 11 tissue samples of foal and 9 *R. equi* isolates, *vapA* and *vapB* gene were detected in 11 (91.7%) foals and 1 (8.3%) foal, respectively. Therefore, this is the first report documenting that *R. equi* bacteria having *vapB* can induce pulmonary lesions and death in foals under natural condition. Immunohistochemical staining (IHC) method using anti-VapA monoclonal antibody was applied to detect *R. equi* VapA antigen in organs of foal. *R. equi* VapA antigens were demonstrated in most lung and some mesenteric and other lymph node of 14 foals. The positive signals of IHC were presented at the cytoplasm of infiltrated macrophages and multinucleated giant cells in or around abscess lesions. These results revealed that IHC method is useful diagnostic tools for virulent *R. equi* infections in the formalin-fixed tissue samples which isn't capable of bacterial cultivation. Virulent *R. equi* VapA bacteria isolated from lungs showed high sensitivity to gentamicin, quinolones, rifampin, vancomycin. However, sulfamethoxazol/trimethoprim, tetracyclines showed low susceptibility.

---

Key words : foal, *Rhodococcus equi*, VapA, VapB, immunohistochemistry, polymerase chain reaction

# 목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재	료 및	방법	----- 4
III. 결	과	-----	10
IV. 고	찰	-----	19
V. 결	론	-----	23
VI. 참	고문헌	-----	29
초	록	-----	34

## I. 서 론

*Rhodococcus (R.) equi*는 방선균목의 노카르디과에 속하는 그람양성의 편성 세포내 기생성 병원체이며, 전 세계적으로 토양 및 초식동물의 분변 등에서 발견되고, 여름철 고온 환경에서 잘 증식하여 방목지 동물과 이들의 사육환경 속에 널리 분포되어 있다 [10, 17, 19].

*R. equi*는 1923년 스웨덴에서 Magnusson에 의해 망아지의 화농육아종성 폐렴 병변에서 처음 분리되었고, 과거에는 *Corynebacterium equi*라고 불렀다 [19]. 이후에는 소, 염소, 돼지, 고양이 등에서 산발적인 감염을 유발하기도 하였다 [12, 19]. 사람에서는 1967년 Golub에 의해 면역계가 손상된 사람의 폐 농양과 피하 농양에서 처음 분리 보고되었으며 [17], 최근에는 사람 면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus; HIV)에 감염된 환자와 같이 면역력이 저하된 사람에서 기회감염을 일으키는 중요한 병원체로 부각되었다 [17, 19]. 국내에서도 이 병원체로 인한 인체 감염 예가 2건 보고된 바 있다 [4, 30].

*R. equi*는 6개월령 이하의 망아지에서 주로 농양을 동반한 만성 화농성 기관지 폐렴을 유발한다. 폐장 병변이 있는 망아지의 약 50%에서는 궤양성 장염과 결장 또는 장간막 림프절의 염증 소견 등 장 병변이 수반되어 관찰되지만 장 병변과 관련된 특별한 임상증상은 나타내지 않는다. 또한 약 4%의 망아지에서는 폐장 병변 없이 장에 국한된 병변이 나타나기도 한다. 이외에도 다발성관절염, 피부농양, 간 또는 비장의 농양, 골수염, 궤양성 림프관염, 임신마에서의 태반염과 유산 등을 일으키기도 한다 [10, 19].

거의 모든 말 사육목장이 *R. equi*에 노출되어 있지만 목장에서의 임상증상 발현은 각 목장의 환경 또는 관리적 요소와 병독성 균주의 분포 비율 등에 의해 지방병성 또는 산발성으로 목장 간 매우 다양하게 나타난다. 지방병성으로 발생하는 목장에서는 진단 및 치료 비용 상승, 망아지 폐사율 증가 등으로 큰 경제적 손실을 초래하게 된다. 더욱이 치료 후 회복된 망아지라 할지라도 경주에 출전할 가능성이 낮아지기 때문에 *R. equi* 감염은 말 산업에 지속적인 피해를 끼치게 된다 [10].

망아지에서 이 병원체의 주된 감염경로는 병원성 균주에 오염된 먼지의 흡입 감염이고 기타 분변에 오염된 토양 또는 풀의 섭취에 의한 경구감염과 창상감염으로 전파되기도 한다 [10, 22]. *R. equi*는 편성 세포내 기생 병원체로 단핵구와 큰포식세포에 감염되며, 이 균의 병원성은 큰포식세포 내에서 균체가 생존하고 증식하는 능력과 관련이 있다 [10, 19]. 이 균의 병독성 인자에는 협막다당류(capsular polysaccharide), 콜레스테롤 산화효소(cholesterol oxidase), 세포벽에 있는 미콜산(mycolic acid), 병독성 관련 항원 및 플라스미드가 있다 [10, 19].

최근에는 병독성 관련 단백질(virulence-associated protein; Vap)과 병독성 플라스미드(virulence plasmid)의 발견 [26, 27]을 기초로 하여 *R. equi*를 병독성, 중간 병독성, 무병독성의 세 가지로 분류한다. 병독성 *R. equi* (murine LD<sub>50</sub> = 10<sup>6</sup>)는 병독성 관련 단백질 15-17 kilodalton (KDa)의 항원(VapA)과 85~90 kilobases (kb) 크기의 병독성 플라스미드를 가지고 있고, 중간 병독성 *R. equi* (murine LD<sub>50</sub> = 10<sup>7</sup>)는 병독성 관련 단백질 20 KDa의 항원(VapB)과 75~100 kb의 플라스미드를 가지고 있다. 이에 반하여 무병독성 *R. equi* (murine LD<sub>50</sub> = 10<sup>8</sup>)는 병독성 관련 단백질과 플라스미드를 모두 가지고 있지 않지만, 토양 등의 환경에는 널리 분포하고 있다 [22]. 병독성 관련 85~90 kb의 플라스미드와 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 확인하는 역학적 지표로 사용되어지고 있다 [26]. 이에 비하여 중간 병독성과 관계되는 75~100 kb의 플라스미드와 VapB를 보유한 *R. equi* 균주는 돼지 또는 야생 멧돼지의 하악림프절과 주변 환경 및 사람에서 주로 분리되었으나 [14, 15, 24], 최근까지도 망아지의 병변과 인근 환경에서는 분리 되지 않았다.

말 사육목장에서 *R. equi* 감염으로 인해 발생한 질병에 대한 치료제로는 정균제인 erythromycin과 rifampin이 추천된다. 그러나 대개의 경우 본 병원체로 인한 폐렴은 만성적으로 진행된 단계에서 임상 증상 발현 후, 환축이 발견되기 때문에 치료가 어렵게 된다. 그러므로 환축의 조기 발견, 격리 사육 및 적절한 치료 대책의 강구를 통해 망아지의 폐사를 줄이고 병독성 병원체의 확산을 방지하는 목장 내 방제 대책 마련이 매우 중요하다 [10].



국내 사육 말을 대상으로 한 *R. equi*에 대한 연구는 그리 많지 않다. Takai 등 [28]은 제주지역의 말 분변과 말 사육 목장의 토양에서 병원성 *R. equi*를 분리하였고, Son 등 [21]은 제주지역 말의 분변, 토양 및 폐렴 병소에서 분리한 병원성 균주와 일본 Kiso 지역에서 분리한 병원성 균주의 분자생물학적 차이점을 보고하였다. 그리고 Kim 등 [11]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 병변형성에 관여하는 본 균체의 유전자형을 규명함과 동시에 면역조직화학적 검사를 통해 망아지 병변 내에서 *R. equi* 병독성 균주 VapA 단백질의 존재를 확인하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

공시동물은 1996년부터 2014년까지 제주도내 말 사육목장으로부터 제주대학교 수의병리학교실 및 제주특별자치도 동물위생시험소에 병성감정 의뢰된 망아지를 대상으로 하였다. 그 중 조직검사, 세균배양 검사 및 중합효소연쇄반응법에 의해 *R. equi* 감염증으로 진단된 14마리의 부검축과 1마리의 기관 삼출물 등 총 15 마리의 망아지를 실험에 공여하였다. 각 개체에 대한 검사시료 세부내역은 Table 1 과 같다.

Table 1. Tested organs and sample of foals

Case No.	Main tissues					Other 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	○				○		○	○		
15†										
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>5</b>

\* MS: mesenteric

§ LN: lymph node

† Tested sample: tracheal exudate

## 2. 병리조직학적 검사

폐사되어 의뢰된 14마리의 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  $\mu\text{m}$ 로 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 또한 조직 병변 내 세균의 감염 여부 확인 및 다른 질병과의 감별검사를 위해 Gram, Periodic Acid-Schiff (PAS) 및 Ziehl-Neelsen 염색을 실시하였다.

## 3. 미생물학적 검사

부검축 14마리에서 병변이 확인된 폐장, 대장 및 장간막 림프절과 환축 1마리의 기관 삼출물로부터 원인균을 분리하기 위해 무균적으로 시료를 채취하여 혈액 배지와 MacConkey agar에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 호기배양하였다.

#### 4. 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction: PCR)

##### 1) 생 조직에서의 핵산 추출

부검축 14마리 중  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관되어 있던 11마리의 폐장 등 생 조직에서 DNA 추출은 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사가 제시한 실험방법에 준하여 수행하였다. 추출 시료는 냉동 보관된 생 조직과 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA)를 1:10 비율로 혼합하여 균질화 시킨 후 상층액을 이용하였다. 1.5 ml eppendorf tube에서 시료의 상층액 200  $\mu\text{l}$ , proteinase K 20  $\mu\text{l}$  및 Buffer AL 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 잘 혼합한 다음  $56^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 정치하였다. 시료에 100% 에탄올 200  $\mu\text{l}$ 를 넣고 혼합한 후 QIAamp spin column에 혼합물을 조심스럽게 옮긴 후, 8,000 rpm에 1분간 냉장원심분리하고 새로운 2 ml collection tube에 QIAamp spin column을 장착하였다. Buffer AW1 500  $\mu\text{l}$ 를 분주한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 새로운 2 ml collection tube에 QIAamp spin column을 장치하고 buffer AW2 500  $\mu\text{l}$ 를 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  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 실온에서 1분간 정치한 다음 마지막으로 8,000 rpm에 1분간 원심분리를 실시하였다. 최종 추출물은 PCR 검사 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관하였다.

##### 2) 균체로부터의 핵산 추출

폐장 병변 및 기관 삼출물에서 분리되어  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 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  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후  $100^{\circ}\text{C}$ 에 10분간 정치하고 바로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동시켰다. 해동된 침전물을 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액에서 DNA를 추출하였다.

### 3) Oligonucleotide primer의 염기서열

*R. equi* 균주의 병독성과 관련된 유전자 검출을 위한 primer는 Takai 등 [24, 29]의 방법에 따라 제작하였다(Table 2).

Table 2. Oligonucleotide primer pairs for the detection of *Rhodococcus equi* *vapA* and *vapB* gene (Takai *et al.*, 2001; Takai *et al.*, 2003b)

Target	Primer	Sequences (5'-3')	Products (bp)
<i>R. equi</i> <i>vapA</i>	<i>RhoA</i>	GAC TCT TCA CAA GAC GGT	564
		TAG GCG TTG TGC CAG CTA	
<i>R. equi</i> <i>vapB</i>	<i>RhoB</i>	AAC GTA GTC GCG GTG AGA A	827
		ACC GAG ACT TGA GCG ACT A	

### 4) PCR 반응조건

*R. equi* 균주의 병독성과 관련된 유전자 동정을 위하여 세균 또는 조직에서 추출한 DNA 2  $\mu$ l와 각각의 primer 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17  $\mu$ l를 AccuPower HotStart PCR PreMix (Bioneer K-5050, Korea)에 첨가하여 최종 반응 용량이 20  $\mu$ l가 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 [24, 29].

### 5) PCR 증폭산물의 확인

반응 종료 후, 각각의 반응액 7  $\mu$ l씩을 취하여 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 다음 RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Intron biotechnology, Korea) 용액(0.5  $\mu$ l/ml in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator로 각각의 유전자에 대한 특이적인 밴드 유무를 확인하였으며, 증폭산물의 크기를 확인하기 위하여 100 bp DNA Ladder (Bioneer, Korea)를 molecular size marker로 사용하였다.

## 5. 면역조직화학적 검사(Immunohistochemistry; IHC)

부검축 14마리의 조직 내에서 *R. equi*의 병독성 인자인 VapA 항원의 분포를 조사하고 *R. equi* 감염에 따른 세포학적 변화상을 확인하기 위하여 Envision polymer reagent (Dako, Denmark) 방법으로 IHC를 수행하였다. 각 조직을 4~5  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 silane 코팅 슬라이드에 부착한 후, 탈파라핀 및 함수과정을 거쳤다. 조직 내 존재하는 peroxidase를 제거하기 위해 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 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 (Table 3). 병독성 균주인 *R. equi* VapA 항원을 확인하기 위한 1차 항체로는 mouse monoclonal antibody (Mab 10G5)를 사용하였으며 antibody diluent solution (Dako, USA)에 1:5,000의 농도로 희석한 다음 조직 절편에 적하하여 37°C에서 1시간 처리한 다음 2차 항체에 40분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS 수세를 거친 뒤 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako, Denmark)로 발색하였으며, 대조염색은 Mayer's hematoxylin (Sigma, USA)으로 염색하였다. 염색이 끝난 조직 슬라이드는 광학현미경으로 발색여부를 관찰하여 항원의 분포를 조사하였다.

Table 3. Primary antibody used for the detection of *Rhodococcus equi* VapA antigen

Target	Antibody	Source	Dilution	Antigen retrieval
<i>R. equi</i> VapA antigen	Mouse anti-VapA (monoclonal antibody)	Kitasato University, Japan	1 : 5,000	Digestion: protease XIV 0.05%; 10 min, 37°C

## 6. 항생제 감수성 검사

폐장 병변 및 기관 삼출물에서 분리된 9개의 *R. equi* 균체에 대하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 항생제 감수성 디스크는 BBL사 제품으로 chloramphenicol (30  $\mu$ g), streptomycin (10  $\mu$ g), sulfamethoxazol /trimethoprim (23.75  $\mu$ g/1.25  $\mu$ g), tetracycline (30  $\mu$ g), vancomycin (30  $\mu$ g), ciprofloxacin (5  $\mu$ g), amoxicillin/clavulanic acid (20  $\mu$ g/10  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), oxytetracycline (30  $\mu$ g), kanamycin (30  $\mu$ g), cefazolin (30  $\mu$ g), rifampin (5  $\mu$ g)과 Oxoid사 제품으로 ceftiofur (30  $\mu$ g), penicillin G (10  $\mu$ g), erythromycin (15  $\mu$ g), ampicillin (10  $\mu$ g), neomycin (30  $\mu$ g), enrofloxacin (3  $\mu$ g) 등 18종의 항생제를 사용하였으며, 감수성 여부는 각각의 제조회사에서 제시한 감수성 판정 기준을 따랐다. 균체는 0.5 McFarland 혼탁도를 기준으로 조정하여 혈액배지에 접종균액을 멸균멸봉으로 배지 전체에 골고루 도말한 다음 항생제 디스크를 배지표면에 부착시키고 37°C에서 48시간 배양하였으며, 디스크 주위에 형성된 억제대의 직경으로 감수성 여부를 판정하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. *R. equi* 감염증 발생상황

임상적으로 *R. equi*에 감염된 망아지들은 고열을 동반한 식욕저하, 호흡곤란, 비루, 기침 등의 호흡기 증상을 보였다. *R. equi*에 감염된 15마리에 대하여 계절별 및 연령별 발생 시기를 분석한 결과 계절적으로는 6월이 가장 많은 8마리(53.3%), 7월 4마리(26.7%), 5월과 8월 및 9월 각각 1마리(6.7%)의 순으로 나타났다(Fig. 1).

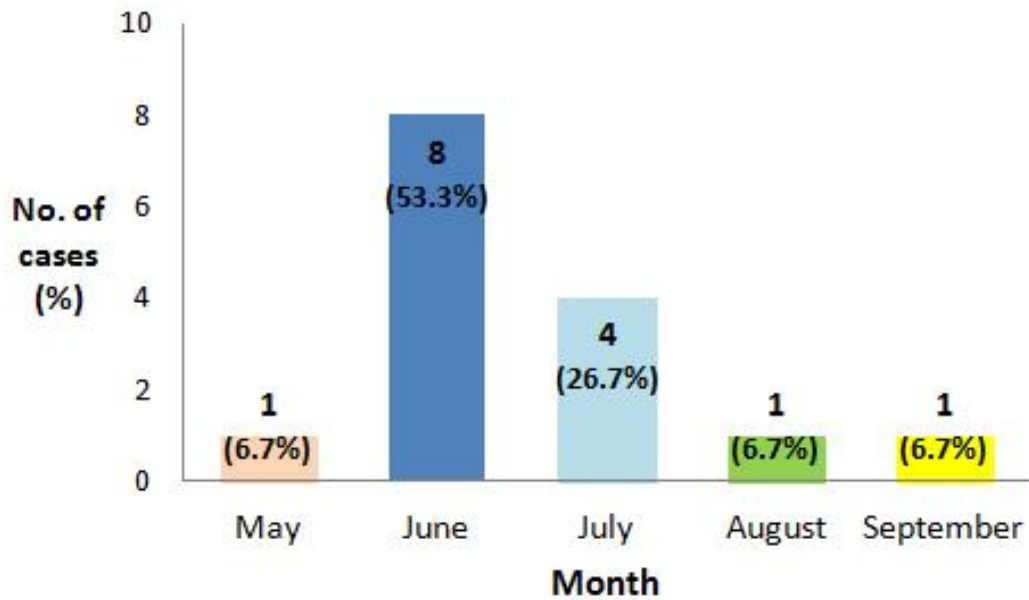


Fig. 1. Monthly (seasonal) prevalence of *Rhodococcus equi* infection in foals.



연령이 확인되지 않는 1마리를 제외하고 각 개체의 연령별로는 생후 2개월령이 가장 많은 8마리(53.3%), 3개월령 3마리(20.0%), 1개월령 2마리(13.3%), 4개월령 1마리(6.7%)의 순으로 나타났다(Fig. 2). 또한 목장의 위치가 확인되지 않은 1마리를 제외하고 제주도에서 지역별 질병 발생 분포를 살펴보았을 때 한림지역이 가장 많은 6마리, 조천지역 4마리, 구좌와 제주시 해안동에서 각각 2마리가 발생하였다. 특히 한림 지역의 6마리는 모두 동일한 목장에서 발생하고 있었다.

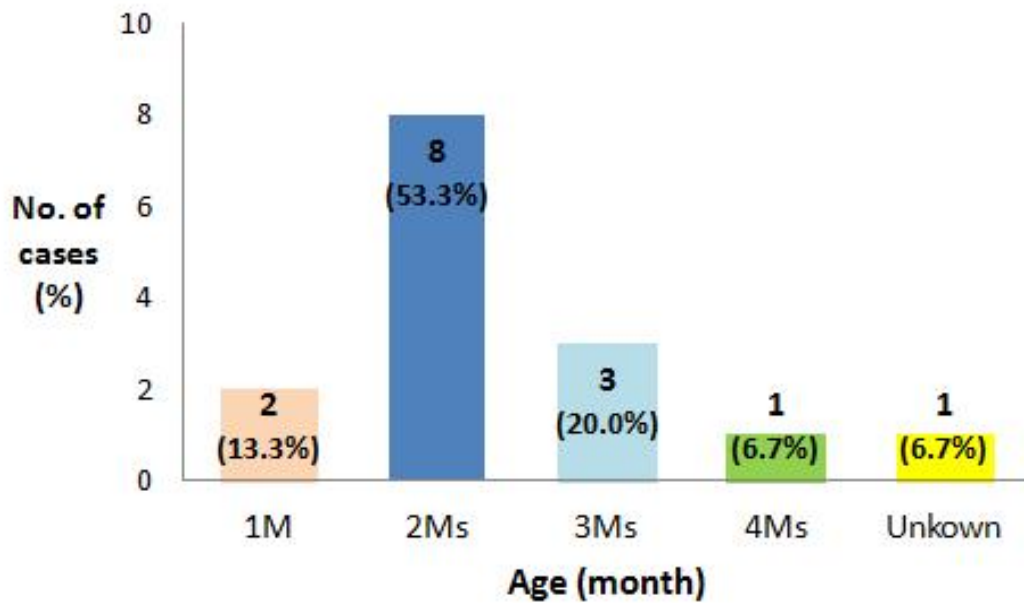


Fig. 2. Incidence of *Rhodococcus equi* infection in foals according to their age.

## 2. 육안소견

*R. equi*에 감염된 망아지의 부검 시 육안병변으로는 폐장의 농양소견이 부검축 14마리 중 12마리(85.7%)에서 확인되어 가장 많았다(Table 4). 폐 농양은 주로 전복측엽 내지 후배측엽에 1~10 cm의 용기된 유백색 결절성 병소가 국소 다발성으로 관찰되었고(Fig. 3), 단면상에서는 유백색의 결제적으로 둘러싸인 암황색의 비지 또는 크림양 병소로 확인되었다. 그러나 2마리(14.3%)의 폐장에서는 농양 병소가 없는 상태로 미만성으로 발적되고 고무양 경도를 가지는 퇴축부전 소견만 관찰되기도 하였다(Fig. 4).

복강 내에서는 장간막 림프절의 종대 및 농양소견이 6마리 중 4마리(66.7%)에서 확인되었고, 결장의 농양은 8마리 중 1마리(12.5%)에서 관찰되었다. 종대된 장간막 림프절에서는 화농성 병소를 나타내고(Fig. 5A), 결장 점막의 충혈 및 3 mm 정도의 용기된 다발성의 궤양이 관찰되기도 하였다(Fig. 5B). 또한 한 개체에서는 하악부 피부에 5 cm 정도의 용기된 병소가 관찰되었으며, 단면 절개 시 유백색의 화농성 삼출물로 충만되어 있었다.

Table 4. Gross findings for foals infected with *Rhodococcus equi*

Organs	Macroscopic lesions	Location	No. of cases (%)
Lung (n=14)	Abscess	Cranial or caudal lobe	12 (85.7)
Intestine (n=8)	Ulcer and abscess	Cecum, colon	1 (12.5)
Mesenteric lymph node (n=6)	Swelling and abscess	Mesenteric lymph node	4 (66.7)
Lymph node (n=9)	Swelling and abscess	Hilar lymph node	2 (22.2)
Skin (n=1)	Abscess	Mandibular portion	1 (100)

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

### 3. 병리조직학적 소견

부검축 14마리에 대한 병리조직학적 검사 결과, *R. equi* 감염증의 주된 병변은 폐장에서 관찰되었으며 기관지폐렴, 농양 및 화농육아종성 폐렴 등의 세 가지 병변이 단독보다는 혼재되어 분포하고 있었다(Table 5). 병리조직학적 소견으로 폐장에서는 기관지와 폐포강 내에 중성호성 백혈구와 단핵세포들이 침윤되어 있는 기관지폐렴이 10마리에서 관찰되었다(Fig. 6). 또한 중성호성 백혈구로 구성된 농양소견(Fig. 7) 및 폐포강 내에 중성호성 백혈구 및 단핵세포와 다핵거대세포를 함유하고 있으며 만성경과로 인해 폐포벽의 상피화(epithelialization)가 동반되어 있는 화농육아종성 폐렴(Fig. 8)이 각각 11마리의 개체에서 관찰되었다.

장 병변으로는 장간막 림프절의 육아종성 림프절염 및 농양과 결장의 농양소견 등이 관찰되었다. 장의 경우 결장 점막의 상피세포가 소실된 궤양병변과 점막하 조직의 농양이 1마리에서 관찰되었다. 그리고 장간막 림프절에서는 중성호성 백혈구로 구성된 농양과 단핵구와 다핵거대세포가 침윤되어 있는 육아종성 림프절염 소견이 관찰되기도 하였다(Fig. 9).

림프절에서는 중성호성 백혈구로 구성된 농양이 2마리에서 관찰되었고, 단핵세포와 다핵거대세포들이 침윤되어 있는 육아종성 림프절염 소견이 1마리에서 관찰되었다.

간의 병리조직학적 소견으로 간 실질조직에 국소적으로 중성호성 백혈구와 단핵세포가 침윤된 만성 간염이 관찰되었다. 하악부 피부에 융기된 병소가 있던 개체에서는 피하조직에 중성호성 백혈구로 구성된 농양과 수양성 염증 삼출물이 들어있던 낭상구조물이 관찰되기도 하였다.

Table 5. Histopathologic findings for foals infected with *Rhodococcus equi*

Tissues	Microscopic lesions	No. of cases (%)	Notes
Lung (n=14)	Bronchopneumonia (A)	10 (71.4)	
	Abscess (B)	11 (78.6)	A+B=2 (14.3%) A+B+C=7 (50.0%)
	Granulomatous pneumonia (C)	11 (78.6)	B+C=2 (14.3%)
Colon (n=8)	Abscess	1 (12.5)	
Mesenteric lymph node (n=6)	Abscess (A)	4 (66.7)	
	Granulomatous lymphadenitis (B)	3 (50.0)	A+B=3 (50.0%)
Lymph node (n=9)	Abscess (A)	2 (22.2)	
	Granulomatous lymphadenitis (B)	1 (11.1)	A+B=1 (11.1%)
Liver (n=10)	Chronic hepatitis	8 (80.0)	
Skin (n=1)	Subcutaneous abscess	1 (100)	

농양 또는 육아종성 병변이 있는 폐장, 결장 및 림프절 등의 조직에 대한 광학 현미경 고배율 시야에서는 다핵거대세포 또는 큰포식세포의 세포질 내에 다수의 구간균이 관찰되었다(Fig. 10). 이 균체들은 염색 결과 Gram 양성 구간균으로 확인되었고(Fig. 10, insert). 곰팡이에 대한 PAS 염색 및 결핵균과 같은 항산성 세균에 대한 Ziehl-Neelsen 염색에서는 모두 음성반응을 나타내었다.

#### 4. 세균배양검사 및 PCR 결과

15마리의 시료에서 세균분리를 시도하여 총 9개의 *R. equi* 균주를 분리할 수 있었다. 균체들은 혈액배지에서 점액성이 강하고 연어살색인 전형적인 *R. equi* 양 집락으로 증식되었고, MacConkey 배지에서는 증식하지 않았다. 연어살색 세균 집락에 대한 Gram염색 결과 Gram양성의 구균으로 확인되었다.

부검축 14마리 중 -70°C에 보관된 11마리의 폐장을 포함한 조직과 9개의 *R. equi* 균주의 유전자형을 확인하기 위한 PCR 검사결과 *vapA* 유전자(Fig. 11A)는 11마리, *vapB* 유전자(Fig. 11B)는 1마리에서 확인되었다(Table 6).

Table 6. Results of polymerase chain reaction to detect *vapA* and *vapB* gene of *Rhodococcus equi* using focal tissues and isolated bacteria

	<i>vapA</i> gene		<i>vapB</i> gene		Total
	Tissue	Isolated bacteria	Tissue	Isolated bacteria	
No. of cases	10	9	1	0	12
Total (%)	11 (91.7%)		1 (8.3%)		12 (100%)

## 5. *R. equi vapA* 및 *vapB* 유전자 검출 망아지의 병변 비교

PCR 결과에 근거하여 *R. equi vapA*와 *vapB* 유전자가 검출된 망아지로 구분하여 각각의 *R. equi* 감염 유형에 따른 발생 연령과 시기, 육안 및 병리조직학적 특징을 비교하였다(Table 7). *R. equi vapA* 양성인 개체들은 총 11마리로 육안적 병변으로는 화농육아종성 폐렴과 폐장 및 림프절의 농양소견 등 전형적인 *R. equi* 감염 병변을 보이는 반면, *R. equi vapB* 양성 개체 한마리에서는 병변이 폐장에 국한되고 전반적인 육안 병변 또한 약한 경향을 보였다. *vapA*와 *vapB* 양성개체의 폐장에 대한 병리조직학적 병변을 비교하였을 때 *vapA* 양성개체는 미만성 화농성 기관지폐렴과 육아종성 병변을 나타내었고, *vapB* 양성개체는 국소적인 경미한 기관지폐렴 소견만 관찰되었다.

Table 7. Comparisons of clinical aspects and pathologic lesions in foals detected *Rhodococcus equi vapA* or *vapB* gene

Classifications		<i>vapA</i>	<i>vapB</i>
Age		1~3 months	4 months
Occurrence		June ~ August	September
Gross findings	Lung	Abscess nodules	Cranioventral consolidation
	Lymph node	Swelling and abscess	No lesions
Histopathologic findings	Lung	Suppurative bronchopneumonia to granulomatous pneumonia	Bronchopneumonia
	Lymph node	Abscess or granulomatous lymphadenitis	No lesions

## 6. 면역조직화학적 검사 결과

IHC 기법을 이용하여 부검축 14마리를 대상으로 장기별로 *R. equi*의 병독성 인자인 VapA 항원의 발현 양상을 확인하였다. 검사결과 14개의 폐장 조직 중 12개 (85.7%), 6개 장간막 림프절 조직 중 4개(66.7%) 및 일부 림프절과 대장, 피부조직 등 농양과 화농육아종성 병변이 관찰되었던 조직에서 주로 항원 양성반응이 관찰되었다(Table 8). 병독성 인자인 VapA 항원은 각 장기에서 특징적인 병리조직학적 병변인 농양병소와 그 인근에 침윤된 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질 내에서 관찰되었다(Fig. 12 to 13). 그러나 간, 비장, 신장, 뇌 등의 기타 조직에서는 음성 반응을 보였다.

Table 8. Results of VapA antigen expressions in foal organs using immunohistochemistry

Case No.	Lung (n=14)	Intestine (n=8)	Mesenteric lymph node (n=6)	Lymph node (n=9)	Skin (n=1)	Note (PCR results)
1	-	-	-	-	NT	VapA
2	+	-	+	-	+	VapA
3	+	NT	NT	NT	NT	VapA
4	-	-	NT	-	NT	VapB
5	+	-	+	-	NT	VapA
6	+	+	+	-	NT	VapA
7	+	-	-	-	NT	VapA
8	+	NT	NT	NT	NT	VapA
9	+	NT	NT	NT	NT	VapA
10	+	-	+	-	NT	VapA
11	+	NT	NT	NT	NT	VapA
12	+	NT	NT	+	NT	NT
13	+	-	NT	+	NT	NT
14	+	NT	NT	NT	NT	NT
Total (%)	12 (85.7)	1 (12.5)	4 (66.7)	2 (22.2)	1 (100)	

NT : Not tested

## 7. 항생제 감수성 검사 결과

폐장 병변 및 삼출물에서 분리된 *R. equi* 9개 균주를 대상으로 18종의 항생제에 대한 감수성 여부를 검사한 결과 가장 효과적인 항생제로는 amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur, gentamicin, neomycin, quinolones 계열, rifampin, vancomycin 임을 알 수 있었다. 반면 sulfamethoxzol/trimethoprim, tetracycline 계열 및 cefazolin에는 내성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(Table 9).

Table 9. Results of antimicrobial susceptibility for *Rhodococcus equi* isolates from foals

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

R : Resistant, I : Intermediate, S : Susceptible



## IV. 고 찰

말은 다른 동물에 비해 개체별 특이성이 높은 반면, 가축 중에서 가장 생산 효율이 낮은 것으로 알려져 있다 [9]. 국내에서 매년 교배하는 더러브렛 씨암말의 임신율은 약 85~90% 정도이나 이듬해 태어나는 망아지는 임신한 씨암말 대비 65~79% 정도에 불과하다 [3]. 전 세계적으로 망아지에서 이환율과 치사율에 매우 높은 원인체로 알려져 있는 *R. equi* [12]의 목장 내 발생은 작게는 말 사육 농가에 경제적으로 손실을 유발하고, 장기적으로는 말 산업 전반에 악영향을 초래할 수 있다. 그러므로 본 질병의 전반적인 이해를 통한 조기진단과 적절한 치료 및 질병예방을 위한 체계적인 관리가 필요하다.

망아지에서 *R. equi* 감염에 유리한 환경적 요인으로는 고온의 여름 환경, 건조한 방목장, 과밀 사육, 중성 pH 토양 등이 있다 [6, 10, 19]. 대체로 본 군체는 어린 망아지에서 모체이행항체가 감소되거나 세포성 면역이 저하될 때 기회감염으로 질병을 유발한다 [22]. 말은 단발정의 계절성 번식을 하는 특성을 가지기 때문에 제주도 내에서는 주로 3월 초순에서 7월 초순까지 교배를 실시하고 335~350일의 임신기간을 거쳐 이듬해 봄에서 여름사이 망아지가 태어나게 된다. 본 연구에서는 *R. equi*에 감염된 총 15마리의 망아지에 대하여 질병 발생 시기를 분석한 바, 계절적으로는 온도가 높아지는 6~7월(80.0%)에 개체의 연령별로는 모체이행항체가 떨어지는 시기인 생후 2~3개월령(73.3%)에서 주로 발생하는 양상을 보였다. 특히 제주도에 6~7월은 계절적으로 본 병원체의 증식과 전파에 용이한 높은 환경 온도를 조성하는 시기와 대체로 일치하고, 봄에 태어난 개체에서는 모체이행 항체 수준이 낮아져 면역이 저하되고 질병에 대한 감수성이 높아질 수 있는 시기에 해당되기 때문에 *R. equi* 감염이 많이 발생하는 것으로 판단된다.

*R. equi* 감염에 따른 폐장의 병리학적 병변은 *R. equi*의 감염 시기, 개체 면역 상태, 감염연령에 따라서 화농성 기관지폐렴부터 건락괴사를 동반한 육아종성폐렴까지 다양하게 발생할 수 있다 [12]. 폐렴 병소는 주로 폐의 전복측엽에 발생하지만 심한 경우 폐장의 전반에 걸쳐 분포한다 [6]. 감염된 군체로 인해 화농성 기관지폐렴이 유발되어 농양으로 진행되고 시간이 지나면서 점차 만성화되어 화농

육아종성 결절로 변형되며 일부의 병소들은 서로 융합하여 건락성 삼출물을 포함한 큰 결절들을 형성할 수도 있다 [12]. 본 실험에서 *R. equi*에 감염된 망아지에서는 육안적으로 폐장의 농양이 가장 많이 나타났으며 주로 전복측엽 내지 후배측엽에 용기된 유백색의 결절성 병소가 국소 다발성으로 관찰되었다. 반면 2마리(14.3%)의 폐장에서는 농양병소 없이 경미한 기관지 폐렴 소견만 관찰되었는데, 이는 질병의 감염 초기에 해당하거나 병원성이 낮은 균체에 감염되어 병변의 차이가 있었던 것으로 판단된다. 병리조직학적으로 폐장 병변의 유형을 세분하여 관찰한 결과 기관지폐렴, 화농육아종성 폐렴 및 농양 등 3가지 소견으로 구분되었다. 각 개체는 한가지의 폐 병변이 독립적으로 존재하기 보다는 주로 세 가지 병변이 혼재되어 나타났고 초기 변화상인 기관지폐렴에서 만성의 화농육아종성 폐렴으로 진행되는 양상을 보였다. *R. equi* 감염에 의한 장관 병변은 결장, 맹장 및 장간막 림프절에서 가장 흔하게 발생하지만 소장에서도 병변이 형성될 수 있다. 점막 면에 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 [8]. 본 실험에서도 비교적 적은 수에 불과하지만, 1마리의 결장에서 궤양 및 농양이 관찰되었고 결장 내 농양은 GALT를 중심으로 분포하고 있었다. 하지만 검사한 장간막 림프절의 66.7%에서는 중성호성 백혈구로 구성된 농양소견과 함께 단핵세포와 다핵거대세포가 침윤된 육아종성 림프절염이 확인되는 등 전형적인 장염형 *R. equi* 감염 병변을 관찰할 수 있었다.

망아지에서 폐렴이나 농양을 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 폐장에 농양을 형성하기 때문에 이들 병원체에 대한 특별한 감별진단이 요구된다 [7]. 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 [18]. 본 연구에서는 세균배양검사, PCR, 병리조직검사, 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 병독성 인자인 VapA 항원을 확인하기 위하여 IHC에 이용된 단클론항체는 Takai 등 [25]에 의해 개발되었다. 이후 Madarame 등 [13]과 Mariotti 등 [16]은 IHC 기법을 이용하여 폐장 및 장관 등의 농양 부위에 침윤된 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질에 VapA 항원이 주로 분포하고 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 총 14마리의 폐장 조직 중 VapB 항원이 확인된 1마리와 농양이 형성되어 있지 않은 1마리를 제외한 12마리 폐장 조직 모두에서 VapA 항원이 발현되었다. 이외에도 장관막 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 보고들과 일치하였다. 따라서 IHC 검사 기법은 세균배양이 용이하지 않은 포르말린 고정 시료에서 병독성 *R. equi* 감염을 진단하기에 매우 유용한 진단법으로 판단된다.

본 연구에서 폐장 병변 및 기관 삼출물에서 분리된 *R. equi* 9개 균주들이 가지는 항생제 감수성은 제주도 분리 균주 [2] 및 경인 지역 분리 균주 [11]와 대체로 유사한 것으로 확인되었다. 그러나 kanamycin, penicillin 제제 및 streptomycin의 경우에는 다른 보고자들의 균주와 달리 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 세포내에 기생하고 병변도 만성화되어 결합조직에 둘러싸인 육아종성 병소를 만들기 때문에 *R. equi*에 감염된 말 생체에서의 항생제 효능은 실험실 결과와 다소간의 차이가 있을 것으로 추정된다. Rifampin과 일부의 erythromycin은 지용성 항생제로 세포내로의 침투가 용이하고, 병용 시 서로의 내성을 줄여주고 상승 효과를 발휘하기 때문에 *R. equi* 감염 망아지의 치료에 적극 활용해야 할 것으로 사료된다 [10, 17].

중간 병독성 *R. equi* VapB 균주는 주로 HIV 환자나 돼지 또는 야생 멧돼지에서 분리되었으나, 아직까지 자연 감염된 망아지 증례는 보고된 바 없다. 그러나

본 연구에서는 PCR 및 IHC를 통하여 망아지 15마리 중 1마리에서 *R. equi* VapB 균주로 확인되었다. Takai 등 [23]은 42~50일령의 망아지에 *R. equi* VapA 균주와 VapB 균주를 기관 내에 실험 접종한 결과 VapA 균주에 비하여 VapB 균주가 병원성이 낮아 병변이 매우 경미하지만, VapB 균주의 접종량을 증가시켰을 때에는 육안적인 경화소 병변과 조직학적 육아종성 폐렴 병변이 심해지고 있음을 보고하였다. 본 연구에서 VapB 항원 양성으로 판명된 개체는 4개월령으로 VapA 양성 망아지보다 약간 개월수가 많았고, 전형적인 *R. equi* 감염 병변을 보이기 보다는 전체적인 병변이 폐장에 국한되고 대체로 경미한 국소적인 기관지폐렴을 나타내고 있었다. 그러나 *R. equi* VapB 균주도 망아지에 자연 감염되어 폐렴 병변을 유발할 수 있고 폐사에까지 이르게 하고 있음이 최초로 확인되었다.

일반적으로 사람에서 *R. equi* 감염은 주로 HIV 환자나 장기 이식 환자와 같이 면역력이 저하된 사람의 폐장에 국소 감염된 후 뇌, 피부, 척추주위 조직, 뼈 등으로 파종성 감염을 일으킨다 [19]. 국내에서는 심장이식 환자 [30]와 HIV 비감염이지만 71세의 고령 환자 [4]에서 *R. equi*에 의한 폐렴 또는 농흉 및 전이성 농양 발생사례가 2건 보고되었다. 최근 브라질에서는 *R. equi* 감염 환자 20명 중 11명이 말과 소 등의 사육환경에 접촉하여 VapA, VapB 또는 무병독성 균주에 감염된 것으로 조사되었다 [20]. 이와 같이 사람에서는 *R. equi* 균주에 감염된 가축 또는 오염된 사육 환경과의 접촉을 통하여 본 병원체가 감염되는 것으로 알려지면서 점차 인수공통전염병으로서의 중요성이 부각되고 있다. 최근 정부에서는 축산업의 신성장 산업으로 말(馬)산업을 선정하여 육성하고자 경마 위주의 말 산업정책에서 벗어나 말산업 지원을 위한 인프라를 구축하고 말산업과 승마 등의 레저문화의 조화를 통한 농촌과 지역경제 활성화 및 국민의 여가 문화 수준과 삶의 질 향상에 노력하고 있다 [1, 5]. 아직까지 국내에서 말 또는 목장 등과의 접촉을 통한 사람 *R. equi* 감염 사례는 보고된 바 없다. 제주도는 국내 말 사육두수의 70% 이상을 차지하고 있을 뿐만 아니라, '14년 1월 말산업 특구로 지정되어 승마 등의 레저문화 활성화로 말산업 관련 종사자가 증가하고 일반 사람들 또한 말과의 접촉기회가 많아질 것으로 예상되고 있다. 따라서 본 병원체로 인한 목장의 생산성 저하를 방지하고, 인체 감염을 예방하기 위해서는 말 목장의 철저한 위생관리와 방역대책 마련이 시급한 것으로 사료된다.

## V. 결 론

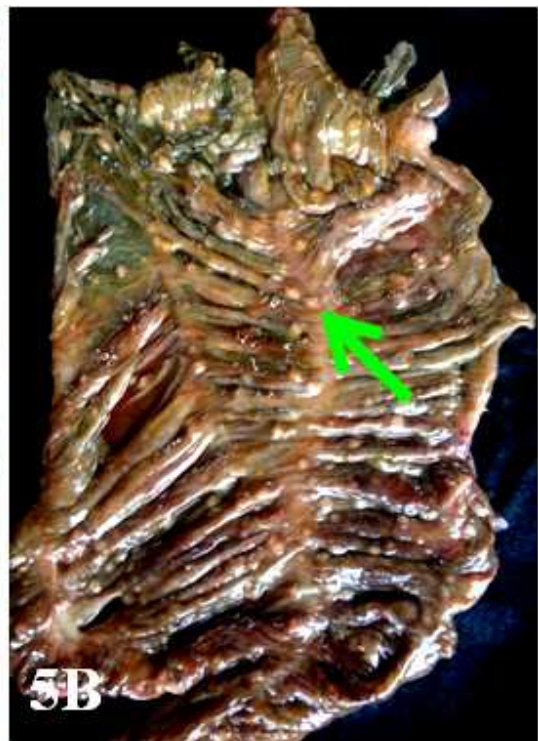
제주도내 말 사육목장에서 의뢰된 망아지 중 *R. equi* 감염증으로 진단된 15마리에 대한 발생 현황 조사, 병리조직학적 검사, 유전자검사, 면역조직화학적 검사 및 항생제 감수성 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제주도 망아지에서 *R. equi* 감염증은 계절적으로는 초여름인 6~7월, 개체의 연령별로는 생후 2~3개월령에 가장 많이 발생하였고, 목장 단위로는 산발적 또는 지방병성 발생이 확인되었다.
2. 병리조직학적으로 주된 병변은 폐장의 기관지폐렴, 폐농양, 육아종성 폐렴이 혼재되어 나타났으며, 일부 개체에서는 결장, 장간막림프절 및 피하직에 농양 형성이 관찰되기도 하였다.
3. *R. equi* 병독성 인자인 VapA 항원에 대한 면역조직화학염색 결과 장기별로는 폐장, 결장, 장간막림프절 및 하악부 피하 조직에서, 세포 수준에서는 각 농양 병소와 인근에 침윤된 큰포식세포와 다핵거대세포의 세포질 내에서 강한 양성 반응이 나타났다.
4. 유전자검사, 병리조직학적 및 면역조직화학검사 결과를 토대로 공시축 15마리 중 14마리는 병독성인 *R. equi* VapA 균주에 감염되었고, 1마리는 중간 병독성인 *R. equi* VapB 균주에 감염된 것으로 확인되었다.
5. 폐장에서 분리한 *R. equi* VapA 균주에 대한 항생제 감수성 검사결과 gentamicin, quinolones 계열, rifampin, vancomycin에 높은 감수성을 보였으나, sulfamethoxazol/trimethoprim, tetracycline 계열에는 내성을 나타내었다.

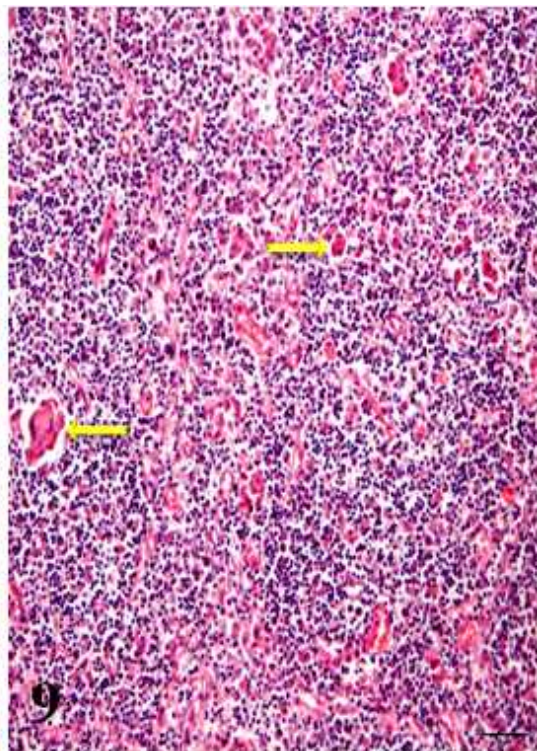
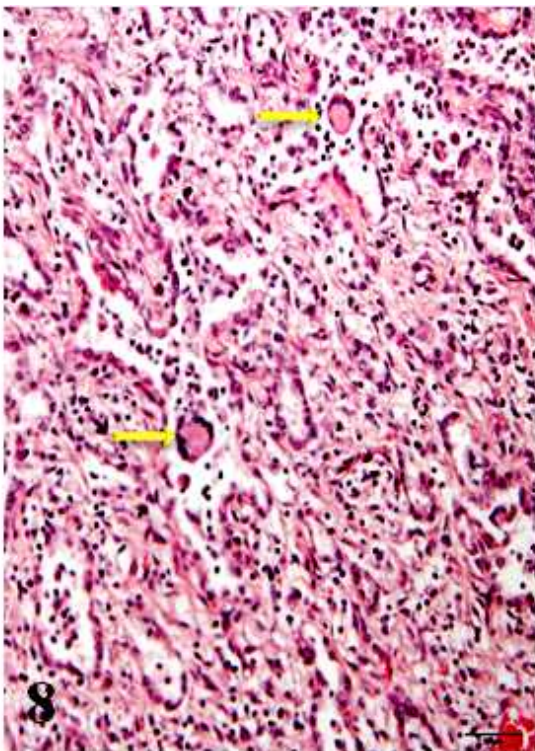
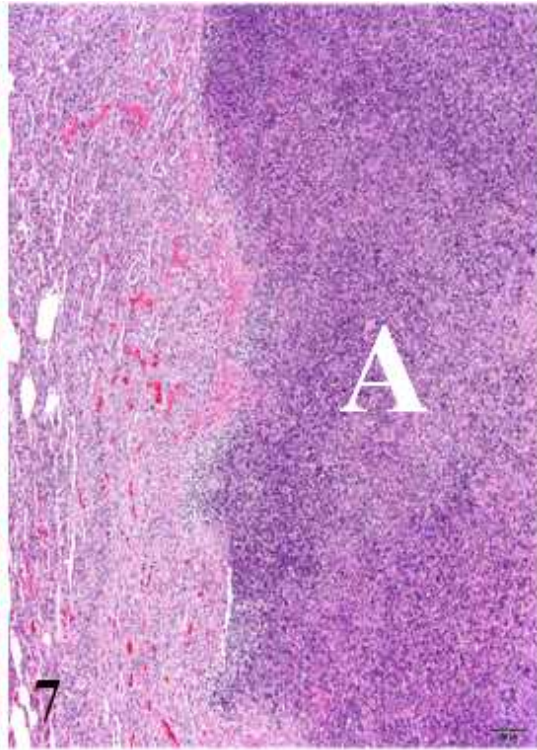
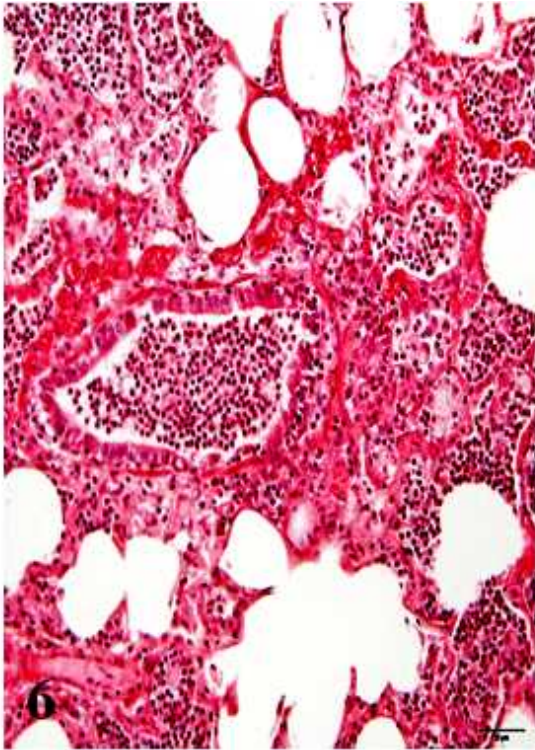
이상의 결과를 종합하여 볼 때, 제주지역 망아지에 대한 병리조직학적 검사 결과 특징적인 폐렴형 및 장염형의 *R. equi* 감염증이 모두 확인되었고, 균체 분리가 용이하지 않은 한정된 포르말린 조직에서 면역조직화학염색 기법은 병독성 *R. equi* 감염증 진단에 유용하였다. 또한 주로 사람과 돼지에서 분리되었던 중간 병독성 균주로 알려진 VapB 항원이 망아지 시료에서 검출되어 망아지에서 이 균주의 자연 감염을 최초로 입증하였다. 인수공통 전염병인 본 질병으로 인한 말과 사람의 피해를 최소화하기 위하여 보다 심도 있고 지속적인 연구가 필요하며, 이를 통해 경쟁력 있는 말 산업 육성에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

## Legends for Figures

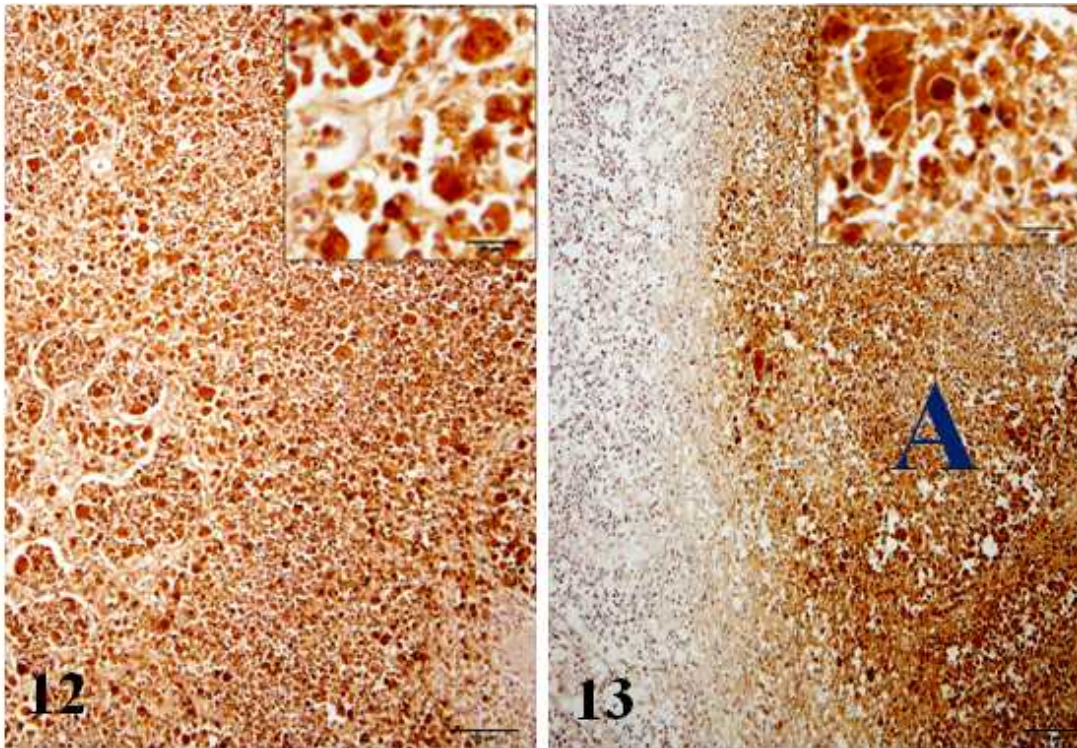
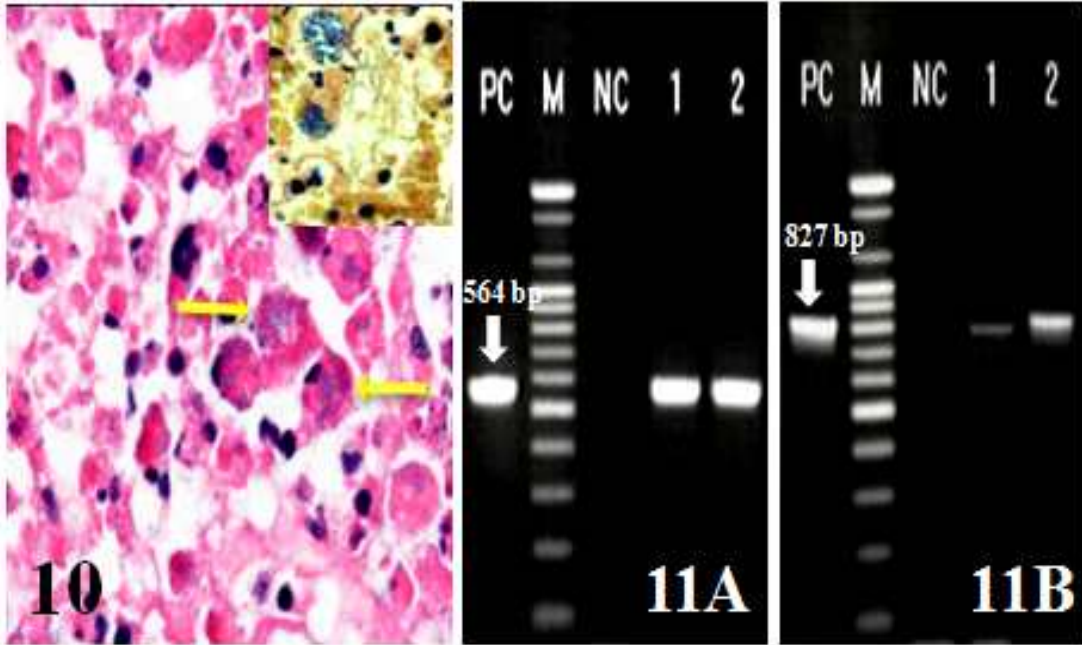
- Fig. 3. The lungs. Multifocal abscesses of 1 to 10 cm in diameter characterized by white to tan, firm, coalescing nodules of lung.
- Fig. 4. The lungs. Lung showed fail to collapse with rubbery consistency.
- Fig. 5. Note abscess in enlarged mesenteric lymph node (A). Multifocal ulcerative lesions (arrow) on colonic mucosa (B).
- Fig. 6. The lung. Bronchioles and alveolar lumens were filled with neutrophils and mononuclear cells. (H&E; ×200).
- Fig. 7. The lung. Note large pulmonary abscesses (A). (H&E; ×40).
- Fig. 8. The lung. Alveolar lumens contained neutrophils, mononuclear cells and multinucleated giant cells (arrows). (H&E; ×200).
- Fig. 9. The mesenteric lymph node. Infiltration of mononuclear cells and multinucleated giant cells (arrows) in lymph node. (H&E; ×200).
- Fig. 10. Numerous coccobacilli (arrows) were occupied in the cytoplasm of multinucleated giant cells. (H&E; ×1,000). Note numerous cytoplasmic Gram-positive coccobacilli in macrophages and giant cells (insert). (Gram stain; ×1,000).
- Fig. 11. PCR products of VapA (A) and VapB (B). PC: VapA positive control; Lane M: 100 bp DNA ladder; NC: negative control; lane 1: bacterial colonies; lane 2: pulmonary exudate (A). PC: VapB positive control; Lane M: 100 bp DNA ladder; NC: negative control; lane 1: lung tissue; lane 2: bacterial colonies (B).
- Fig. 12. The lung. Numerous positive reactions for VapA antigen in alveoli and abscess foci (IHC; ×100). Note positive reactions (insert). (IHC; ×400).
- Fig. 13. The lymph node. Strong positive reactions for VapA antigen in abscess foci (A). (IHC; 100). Note positive reaction in macrophage and giant cells (insert). (IHC; ×400).











## VI. 참고문헌

1. **김문영**. 기존 축산업의 대체 산업으로써의 말산업 육성의 타당성 여부 고찰. 동서언론 동서언론학회 2011, **14**, 39-72.
2. **송현호, 문자호, 강태영, 손원근**. *Rhodococcus equi*에 의한 망아지 감염증. 한국임상수의학회지 2006, **23**, 169-174.
3. **양영수, 조길재, 남치주**. 제주지역 더러브렛 말의 번식특성 조사. 대한수의학회지 2004, **44**, 105-111.
4. **이영민**. *Rhodococcus*에 의한 농흉 및 전이성 농양 1례, Inje Medical 2002. **23**, 665-670.
5. **이영수, 권순국**. FTA와 말 산업 육성과제. 한국무역상무학회지 2013, **57**, 173-198.
6. **Caswell JL, Williams KJ**. Respiratory system. In: Maxie MG (eds.). Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals Volume 2. 5th ed. pp. 630-632. Saunders Elsevier, New York, 2007.
7. **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.
8. **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.

9. **Ginther OJ.** Reproductive biology of the mare: basis and applied aspects. 2nd ed. pp. 499–642. Equiservices, Wisconsin, 1992.
10. **Hines MT.** *Rhodococcus equi*. In: Sellon DC, Long M (eds.). Equine Infectious Disease. pp. 281–316, Saunders Elsevier, St, Louis, 2007.
11. **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.
12. **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.
13. **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 Path 1996, **33**, 341–343.
14. **Makrai L, Takai S, Tamura M, Tsukamoto A, Sekimoto R, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Varga J, Fodor L, Solymosi N, Major A.** Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. Vet Microbiol 2002, **88**, 377–384.
15. **Makrai L, Kobayashi A, Matsuoka M, Sasaki Y, Kakuda T, Dénes B, Hajtós I, Révész I, Jánosi K, Fodor L, Varga J, Takai S.** Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). Vet Microbiol 2008. **131**, 318–323.

16. **Mariotti F, Cuteri V, Takai S, Renzoni G, Pascucci L, Vitellozzi G.** Immunohistochemical detection of virulence associated *Rhodococcus equi* antigens in pulmonary and intestinal lesions in horses. *J Comp Path* 2000, **123**, 186-189.
17. **McNeil MM, Brown JM.** The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994, **7**, 357-417.
18. **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.
19. **Prescott JF.** *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1991, **4**, 20-34.
20. **Ribeiro MG, Takai S, de Vargas AC, Mattos-Guaraldi AL, Ferreira Camello TC, Ohno R, Okano H, Silva AV.** Identification of virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi* in humans with and without acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**, 510-513.
21. **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.
22. **Takai S.** Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Vet Microbiol* 1997, **56**, 167-176.

23. **Takai S, Anzai T, Fujita Y, Akita O, Shoda M, Tsubaki S, Wada R.** Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals. *Vet Microbiol* 2000, **76**, 71-80.
24. **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.
25. **Takai S, Ile 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.
26. **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* 1991a, **29**, 439-443.
27. **Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S.** Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 1991b, **59**, 4056-4060.
28. **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* 2003a, **65**, 1313-1317.

29. 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 2003b, **188**, 1717–1723.
  
30. Yoo SJ, Sung H, Chae JD, Kim MN, Pai CH, Park J, Kim JJ. *Rhodococcus equi* pneumonia in heart transplant recipient in Korea, with emphasis on microbial diagnosis. Clin Microbiol Infect 2003. **9**, 230–233.

## 초 록

# 제주지역 망아지에서 *Rhodococcus equi* 감염증에 관한 병리학적 특징

지도교수 : 김 재 훈

## 송 경 옥

제주대학교 대학원 수의학과

*Rhodococcus (R.) equi*는 편성 세포내 기생성 그람양성 구균으로 전 세계적으로 토양과 초식동물의 분변 등에 널리 분포되어있다. 특히 6개월령 이하의 망아지에서 만성 기관지폐렴과 농양, 궤양성 장염을 유발하는 중요한 병원체이다. 지방병성으로 발생하는 농양에서는 경제적으로 큰 손실을 유발하고 장기적으로는 말 산업에 악영향을 초래할 수 있으므로 본 질병에 대한 체계적인 관리가 필요하다. 본 연구는 제주지역 망아지에서 발생한 *R. equi* 감염증에 대한 병리학적 특징 및 병변형성에 관여하는 균체의 유전자형을 규명하기 위하여 수행하였다. 공시동물은 1996년부터 2014년까지 제주도내 말 사육목장으로부터 제주특별자치도 동물위생시험소와 제주대학교 수의병리학교실에 의뢰된 망아지를 대상으로 하였다. 그 중 조직검사, 세균배양 및 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction; PCR)에 의해 *R. equi* 감염으로 진단된 총 15마리의 망아지를 실험에 공여하였다. 이 망아지들은 제주도 소재 9개 목장으로부터 의뢰되었으며, 대부분 고열과 호흡 곤란 등의 심한 호흡기증상을 나타내었다.



*R. equi* 감염의 계절적 발생 시기는 6월이 가장 많은 8마리(53.3%), 7월이 4마리(26.7%) 순이었고, 발생 연령은 생후 2개월령이 가장 많은 8마리(53.3%), 3개월령이 3마리(20.0%) 순으로 나타났다. 병리조직학적으로 폐장에서는 기관지폐렴, 폐농양 및 육아종성 폐렴 소견이 혼재되어 관찰되었고, 1마리의 결장에서는 점막의 궤양과 점막하 조직에 농양병변이 관찰되었다. 또한 일부 개체의 장간막림프절 및 림프절에서는 육아종성 림프절염과 농양소견이 관찰되었다. 부검축 11마리의 조직 시료와 병소에서 분리된 9개의 *R. equi* 균주에 대하여 PCR 기법으로 유전자형을 동정 결과 11마리는 *vapA* 유전자, 1마리는 *vapB* 유전자로 나타났다. 따라서 *R. equi* VapB 균주도 망아지에 자연 감염되어 폐렴 병변과 폐사를 유발할 수 있음이 최초로 확인되었다. 망아지에서 병원성을 유발하는 병독성 균주인 *R. equi* VapA 항원의 유무를 확인하기 위해 단클론항체를 사용하여 망아지 내부장기에 대하여 면역조직화학염색(immunohistochemistry; IHC)을 실시하였다. 그 결과 14마리 중 2마리를 제외한 모든 개체의 폐장 및 장간막 림프절에서 양성반응을 보였으며 주로 농양 병소와 그 인근에 침윤되어 있는 큰포식세포 및 다핵거대세포의 세포질에서 항원을 발현하고 있었다. 본 연구결과 따라서 IHC 검사 기법은 세균배양이 용이하지 않은 포르말린 고정 시료에서 병독성 *R. equi* 감염을 진단하기에 매우 유용한 진단법으로 판단된다. 그리고 폐장에서 분리된 *R. equi* VapA 균주에 대한 항생제 감수성 검사결과 gentamicin, quinolones 계열, rifampin, vancomycin에 높은 감수성을 보였으나, sulfamethoxazol/trime thoprim과 tetracycline 계열에는 내성을 나타내었다.

---

중심어 : 망아지, *Rhodococcus equi*, VapA, VapB, 면역조직화학염색, 중합효소  
연쇄반응법