大韓獸醫學會誌(2011) 第51卷 第1號
Korean J Vet Res(2011) 51(1) : 21~28

<원 저>

Salmonella Enteritidis 분리주에서의 선발된 불활화 백신균주의 방어효과 및 면역원성

강정무[1] · 원호근[2] · 김은희[2] · 노윤희[2] · 최환원[2] · 한태욱[1,*]

[1]강원대학교 수의과대학, 동물의학종합연구소, [2]중앙백신연구소

(게재승인: 2010년 12월 27일)

Protective effects and immunogenicity of *Salmonella* Enteritidis killed vaccine strains selected from virulent *Salmonella* Enteritidis isolates

Zheng-Wu Kang[1], Ho-Keun Won[2], Eun-Hee Kim[2], Yun-Hee Noh[2], Hwan-Won Choi[2], Tae-Wook Hahn[1,*]

[1]*College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

[2]*ChoongAng Vaccine Laboratories, Daejeon 305-348, Korea*

(Accepted: December 27, 2010)

Abstract : *Salmonella* Enteritidis (SE) has been a major causative agent of food-borne human disease due to consumption of contaminated eggs and poultry meat. To prevent SE infection in poultry, and therefore minimize human infections, vaccination with either killed or live SE vaccine is suggested. We evaluated a newly developed killed bacterin using a representative SE isolate in Korea. Among pool of SE isolates, two highly virulent isolates (the one isolate from chicken, the other from human) were selected by measuring mortality in mouse and chickens administered. The chickens were injected intramuscularly with killed vaccine and were challenged with highly virulent SE strain 3 week after vaccination. The recovered colony count (cfu/g) of spleen and cecal content in the vaccinated groups was reduced compared with those of the unvaccinated control group. The antibody level in the vaccinated groups was higher at 3 week post vaccination. These results indicate that vaccination with killed vaccine was effective in preventing the infection of virulent SE. Further study for a large number of layers should be needed for the effect of egg production, SE shedding in feces, persistence of antibody level.

Keywords : antibody response, immunogenicity, killed vaccine, protective effect, *Salmonella* Enteritidis

서 론

Salmonella Enteritidis(SE)는 동물에서는 설사를 비롯한 장염을 일으키고, 사람에서는 식중독을 일으키는 주요 원인체이다. 국내의 경우, 최근 10년 동안 사람에서의 살모넬라성 식중독의 원인체를 분석할 때, SE에 의한 식중독 발생이 가장 높은 비중을 차지하고 있다 [3, 7]. 사람에서 SE에 의한 식중독의 발생은 주로 오염된 계란 및 계육 등을 통해 이루어지는 것으로 보고되고 있다 [7, 21]. 따라서 세계보건기구에서는 닭에서의 SE 감염을 예방함으로써 사람에서의 식중독 발생을 줄일 수 있다고 보고 하였으며, 주된 예방대책의 하나로 닭에 SE 백신을 접종하는 것을 권장하고 있다 [15, 21].

최근까지 연구되고 있거나 일부 사용되고 있는 SE 백신은 크게 불활화백신, 약독화 생균 백신과 서브유니트(subunit) 백신으로 분류되고 있다 [6, 9, 23, 28]. 불활화 백신은 주로 체액성 면역을 유도하고 세포매개성 면역의 유도 능력은 약독화 생균백신에 비해 많이 떨어지는 단점을 지니고 있으나 백신주의 병원성이 전혀 복귀되지 않는다는 측면에서 안전성이 매우 높은 장점을 지니

*Corresponding author
Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-244-2367
E-mail: twhahn@kangwon.ac.kr

Table 1. *Salmonella* Enteritidis strains used in this study

Origin of isolation	Strain No.	PFGE* type	Phage type	Antimicrobial resistant pattern†
Chickens	B270	A6	PT35	AM-TIC
	B277	A6	PT35	AM-TE-S-TIC
	B295	A1	PT7	AM-TE-S-TIC
	B296	A6	PT35	–
	B298	A1	PT17	TE-S
	B322	A1	PT1	–
Humans	B350	A1	PT21	AM-TIC
	B352	A6	RDNC‡	–
	B365	A1	PT3	–
	B369	A1	PT21	AM-TE-S-TIC
	B390	A6	RDNC	–

*PFGE: pulsed-field gel electrophoresis, †AM: ampicillin, TIC: ticarcillin, TE: tetracycline, S: streptomycin, ‡RDNC: reacted but did not conform.

고 있다. 약독화 생균백신은 불활화백신에 비해 접종 방법의 다양성, 체액성 면역은 물론 점막면역, 세포매개성 면역까지도 유도할 수 있고 이종항원도 운반할 수 있는 등 여러 가지 장점을 지니고 있다 [20]. 약독화 생균 백신에는 영양요구성 변이주 및 rough 변이주 등을 비롯한 다양한 유전자 결손변이주가 개발되었고, 일부의 경우 실용화되고 있으며, 다양한 방어효과를 보이는 것으로 알려지고 있다 [12].

일반적으로 세포 내 기생하는 병원체의 경우, 불활화백신보다는 생균백신이 감염예방에 효과적인 것으로 알려져 왔으며 [18, 20], 세포 내 기생세균인 *Salmonella* 경우도 세포성 면역을 증가시키고 비병원성의 안전한 생균백신의 개발에 많은 연구들이 보고되었다 [8, 12, 15, 24]. 그러나 생균백신의 제조에는 많은 노력과 시간이 소요되며, 병원성의 회복가능성 등 안전성에 관한 문제가 제기될 수 있다 [8].

서브유니트 백신은 SE의 주요방어면역(immunodominant)을 일으키는 항원 성분을 포함하고 있다. SE가 지니고 있는 성분 중 지당체, 세포외막, 편모, 섬모 등이 여기에 해당된다 [2, 5, 23]. 특히 그람음성균의 세포외막을 구성하고 있는 조세포외막단백질(crude outer membrane protein: cOMP) 복합물질이 세포성 면역을 활성화시키는 주요방어면역 단백질(immunodominant protein)로서 보고되고 있다 [11].

SE 불활화백신은 약독화 생균백신과 비교할 때, SE 야외 감염 대한 방어효과면에서 다소 떨어지지만 높은 안전성을 지녔기 때문에 일부 나라에서는 이미 상용화되고 있고, 산란계 및 종계에서 사용되기도 한다 [9, 11, 14]. 불활화백신은 높은 안전성 이외에, 특히 다른 살모넬라 혈청형과의 혼합하여 다가백신으로 사용할 수 있는 높은 응용성과 모계접종을 통해 병아리에 강력한 모체이행항체를 전달할 수 있다는 점, 불활화백신을 접종한 닭에서 분변내의 SE의 배출이 감소하고 장기내 집락화가 감소되며 계란내의 오염도가 감소된다는 점을 들어 개발되고 있다 [11, 18].

따라서 본 연구에서는 사람 및 닭에서 분리한 국내 분리주중에서 불활화백신 후보균주를 선발한 후 불활화백신을 제조하여 이에 대한 방어효과 및 면역원성을 조사하였다.

재료 및 방법

SE 균주

본 연구팀은 이전에 사람과 닭에서 분리한 SE 총 173주를 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis, 항생제 감수성시험, phage type 등을 분석하였다 [19]. 그 중 대표적인 phenotype을 가진 사람에서의 분리주 5주(B350, B352, B365, B369, B390)와 닭에서의 분리주 6주(B270, B277, B295, B296, B298, B322)를 포함한 총 11주의 SE를 선택하여 본 실험에 사용하였다(Table 1).

병아리에서의 SE의 병원성 평가

총 11주의 SE 분리주를 nutrient broth에 접종한 후 37°C에서 진탕배양한 후 배양액내의 균수를 6×10^7 cfu/0.2 mL로 조정하였다. 2일령된 병아리를 각 균주당 40마리씩 경구로 0.2 mL씩 접종한 후 10일간 폐사를 관찰하여 기록하고, 10일째 되는 날에 각 그룹에서 생존한 병아리를 부검하여, 맹장을 채취하여 균을 검출하였다. 장 내용물이 포함된 맹장을 유제로 갈아 유제액을 만든 후 10 mL selenite cystine broth(SC; BD, France)에 넣고

41°C에 24시간 진탕 배양한 후 MacConkey agar(BD, France)와 XLT4 agar(BD, France)에 접종하였다. 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 후 살모넬라의 증식 유무를 판정하였다. 가장 높은 폐사율을 보인 균주를 선택한 후 2차로 병원성 실험을 실시하였다. 2차 실험의 경우 선발된 균주를 상기에 언급한 방법대로 배양한 후 3×10^7 cfu/0.2 mL로 조정하였다. 4일령의 병아리에 균주당 30마리씩 0.2 mL씩 경구로 접종한 후 2주간 폐사를 관찰하였다. 폐사되지 않은 병아리의 경우 도태시킨 후 간, 비장 및 맹장을 오염되지 않게 채취하였다. 각 장기의 무게를 측정한 후, 멸균된 buffered peptone water(BPW; BD, France)를 장기당 1 mL씩 첨가한 후 유제하였다. 유제액을 10배로 희석한 후, 희석된 유제액 0.1 mL를 살모넬라 분리 배지인 XLT4 배지(BD, France)에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 XLT4 배지에 자란 *Salmonella*균 특이적인 집락수를 측정하여 장기별 g당 집락수를 산출하였다. 1차 및 2차 병원성 실험결과로 통하여 높은 병원성을 보인 SE 분리주를 불활화백신 후보균주로 선발하였다.

불활화백신의 제조

선발한 불활화백신균주 B277주와 B369주를 LB broth에 접종한 후 37°C에서 진탕배양한 후 균 농도를 측정하기 위해 OD_{660}에서 흡광도를 측정하였고 각 흡광도에 해당하는 집락수(colony forming unit; cfu/mL)를 측정하였다. 균 배양액을 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 멸균된 인산완충용액(PBS)으로 재부유한 후 부유액에 formalin을 최종농도 0.3%(v/v)되게 첨가한 후 37°C에서 3일간 불활화시켰다. 불활화처리 후 혼합액을 nutrient agar, nutrient broth 및 thioglycolate agar에 각각 접종하여 22°C 및 37°C에서 7일간 배양하여 불활화 유무를 확인하였다. 불활화 확인이 끝난 균액을 Montanide ISA70 (SEPPIC, France) adjuvant와 혼합하였다. ISA70을 70% (w/w), 미리 조정한 불활화 균액을 20%씩 첨가한 후 나머지 분량은 PBS으로 채워 혼합한 뒤 백신을 제조하였다.

마우스에서의 SE 불활화 백신의 효능 시험

제조한 SE 불활화 백신의 방어효능을 마우스를 사용하여 평가하였다. 마우스 100수를 10마리씩 10개 군으로 나누고 Table 4에서 기술한대로 백신 1, 2, 3 및 4를 군별로 10수씩, 마리당 0.2 mL씩 복강내로 접종하였다. 대조군은 백신대신 PBS 0.2 mL를 접종하였다. 백신접종 2주 후 고병원성 SE B369 및 B277주를 마리당 0.2 mL씩($10LD_{50}$) 복강내로 공격접종한 후 10일간 폐사율을 조사하였다.

닭에서의 SE 불활화 백신의 방어효과 시험

제조한 SE 불활화백신의 방어효능을 최종 목적동물인 닭에서 평가하였다. 7주령된 닭 30수를 10마리씩 3개 군으로 나누고 무균사육시설(biosafety isolator)에서 사육하였다. 1군과 2군에는 불활화백신1과 2를 각각 0.5 mL씩 흉부근육에 접종하였고, 대조군(3군)에는 동량의 PBS를 접종하였다. 백신 접종 3주 후 모든 군에 고병원성 SE B277주를 1.5×10^8 cfu/mL량으로 경구로 공격 접종하여 20일 동안 폐사수수를 조사하였다. 공격접종 후 6일, 13일 및 20일에 각 군별로 3수, 3수 및 4수의 닭을 도태시켜 채혈을 한 후 비장과 맹장에서 균분리를 실시하였다. 균분리는 전술한 방법대로 실시하였다.

Microplate agglutination test(MAT) 및 ELISA

도태시 채혈하여 혈청을 분리한 후 SE에 대한 항체가를 MAT 및 시판중인 *Salmonella* D group ELISA kit (BioChek, Holland)를 사용하여 측정하였다. MAT를 실시하기 위해 항원을 아래와 같이 제조하였다. SE B277주를 tryptose phosphate broth(TPB; Difco, USA)에 접종한 후 37°C에서 6~8시간 진탕 배양하였다. 균 배양액을 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 침전물을 PBS로 부유하였다. Formalin을 최종 농도 0.3% 되도록 첨가한 후 37°C에서 3일간 불활화한 후 7,000 rpm, 10분간 원심분리한 뒤 PBS로 적정농도로 희석한 후 MAT용 항원으로 사용하였다. 96 well microplate well에 50 µL PBS를 분주한 뒤 첫번째 열에 피검혈청을 50 µL씩 첨가한 후 2진 희석한다. 불활화된 SE 항원을 well당 50 µL씩 넣고 4°C에서 24시간 반응시킨 후 응집반응이 일어나는 최대 희석배수를 혈청응집가로 간주하였다.

ELISA 방법은 SE항체 측정용 ELISA kit(BioChek, Holland)을 사용하였으며 제조회사의 방법대로 실시하였다. 최종 ELISA reader(405 nm)를 이용하여 흡광도를 측정한 후 방법에 기준하여 S/P수치를 산출하여 SE항체가를 측정하였다.

통계처리

백신접종군과 백신비접종 대조군 사이의 항체가(MAT 응집가, S/P value) 및 장기에서 분리한 cfu의 차이는 Unpaired Student's *t*-test를 실시하였으며, *p*-value가 0.05보다 작을 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

병아리에서 병원성 시험

유전형, phage형(phage type, PT), 항생제 내성패턴 등의 결과를 토대로 선정한 사람과 닭에서 분리한 대표적

SE 분리주를 3일령의 병아리에 각각 6×10^7 cfu/0.2 mL씩 경구로 접종한 후 폐사율을 살펴보았다(Table 2). 총 11개 SE 분리주 중 사람에서 분리된 B365주는 폐사율이 100%이고 그 다음으로 B369주는 90%의 폐사율을 나타냈다. 닭에서 분리된 B277, B295 및 B270 분리주는 공격접종한 40수중 각각 31수(77.5%), 23수(57.5%) 및 22수(55.0%)가 폐사되어 사람분리주보다 다소 낮은 폐사율을 보였다. 맹장에서의 균분리율은 B390주는 60%였고, B277, B369 및 B322주는 각각 20%, 40%, 40%의 균분리율을 나타냈다(Table 2).

1차 시험 결과에서 사람과 닭에서 분리된 대표 균주 11개 중에서 닭분리주인 B277, B295주 및 사람분리주인 B365주와 B369주가 병원성이 높은 것으로 나타나 4개의 분리주들에 대해 병아리에 접종하여 폐사율 및 장기내 분리율을 측정하였다. 5일령 병아리에 4종의 SE 분리주를 수당 3×10^7cfu(1차 시험의 1/2 dose)로 접종한 후 2주동안 폐사를 관찰하였다. 닭분리주인 B277과 B295주는 동일하게 8수가 폐사되어 폐사율이 26.7%로 나타났고 사람분리주인 B365와 B369주는 각각 7수, 17수가 폐사되어 폐사율은 각각 23.3%와 56.7%로 나타났다(Table 3). 장기내 분리율을 살펴본 결과, 사람분리주인 B369주는 비장에서 4.4×10^4 cfu/g로 가장 높게 분리되었으며, B365주는 3.4×10^4 cfu/g가 분리되었다. 닭분리주인 B277주와 B295주는 비장에서 각각 6.1×10^3 cfu/g, 1.6×10^3 cfu/g이 분리되었다(Table 3). 간에서의 분리정도는 비장에서 분리되는 cfu보다는 10~100배 정도 낮은 것으로 관찰되었고 B369, B277, B365, B295주 순으로 높았다. 맹장내 균분리율은 B277주와 B369주가 각각 60%로 가장 높게 분리되었고 B365주는 20%가 분리되었으며 B295주는 맹장에서 검출되지 않았다(Table 3). 폐사율과 장기내 분리율이 가장 높은 균주를 병원성이 가장 높은 균주로 간주하여 사람분리주 B369주와 닭분리주 B277주를 선택하여 불활화백신 후보균주로 사용하였다.

Table 2. Virulence of *Salmonella* Enteritidis in chickens (1st)

Origin of isolation	Strain No.	Mortality (%)	Recovery in cecum (%)
Chickens	B270	22/40 (55.0)	0.0
	B277*	31/40 (77.5)	20.0
	B295*	23/40 (57.5)	0.0
	B296	13/40 (32.5)	0.0
	B298	10/40 (25.0)	0.0
	B322	16/40 (40.0)	40.0
Humans	B350	30/43 (69.8)	0.0
	B352	22/40 (55.0)	0.0
	B365*	40/40 (100.0)	0.0
	B369*	36/40 (90.0)	40.0
	B390	30/40 (75.5)	60.0

*Strains were selected for further experiment.

마우스에서의 SE 불활화 백신의 방어효과 조사

사람에서 분리한 B369주와 닭에서 분리한 B277주로 제조한 불활화백신의 방어효과를 관찰하기 위해 서로 다른 dose의 불활화백신을 마우스의 복강에 0.2 mL씩 접종하였다. 백신접종 2주후에 wild type SE B369주와 B277주를 해당군의 마우스 복강내로 $10LD_{50}$로 공격접종한 후 10일간 관찰하며 생존율을 측정하였다. 불활화백신을 접종하지 않은 대조군의 경우 B369 또는 B277주로 공격접종한 경우 모두 폐사되어 100%의 폐사율을 나타냈다(Table 4). 이에 반해 불활화백신을 접종한 후 공격접종한 군의 경우 모두 70~100%의 높은 생존율을 보였다. 동종균주(B369백신접종-B369공격접종, B277백신접종-B277공격접종)간, 또는 이종균주(B369백신접종-B277공격접종, B277백신접종-B369공격접종)간의 생존율의 차이와 수당 백신접종량과 생존율의 차이는 관찰되지 않았다(Table 4). 마우스에 있어서는 SE 불활화백신이 고병원성의 SE균주에 대해 매우 높은 방어효과를 나타냈다.

SE 불활화백신을 접종한 닭에서의 방어효과

마우스 시험에서 생존율이 높았던 B369주로 제조한

Table 3. Virulence of *Salmonella* Enteritidis in chickens (2nd)

Origin of isolation	Strain No.	Mortality (%)	Recovery of *Salmonella* Enteritidis in organs		
			Liver (cfu/g)	Spleen (cfu/g)	Cecum (%)
Chickens	B277*	8/30 (26.7)	5.3×10^2	6.1×10^3	18/30 (60)
	B295	8/30 (26.7)	2.0×10^2	1.6×10^3	0/30 (0)
Humans	B365	7/30 (23.3)	2.9×10^2	3.4×10^4	6/30 (20)
	B369*	17/30 (56.7)	9.8×10^2	4.4×10^4	18/30 (60)

*Strains were selected for inactivated vaccine.

Table 4. Protection of *Salmonella* Enteritidis inactivated vaccines against homologous and heterologous challenges in mice

Vaccine	Strain	Content (cfu/mL/dose)	Survivor rate (%) against	
			B369 (%)	B277 (%)
Vaccine 1	B369	18.0×10^8	8/9 (88)	9/10 (90)
Vaccine 2	B369	9.0×10^8	9/10 (90)	10/10 (100)
Vaccine 3	B277	28.0×10^8	10/10 (100)	9/10 (90)
Vaccine 4	B277	14.0×10^8	9/10 (90)	7/10 (70)
Non-vaccine			0/10(0)	0/10 (0)

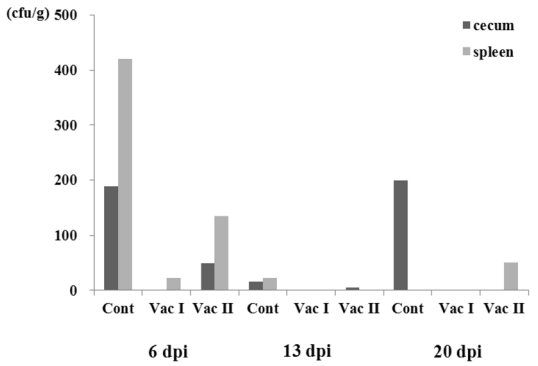

Fig. 1. Mean colony forming unit of *Salmonella* Enteritidis bacteria recovered from spleen and cecum in chickens.

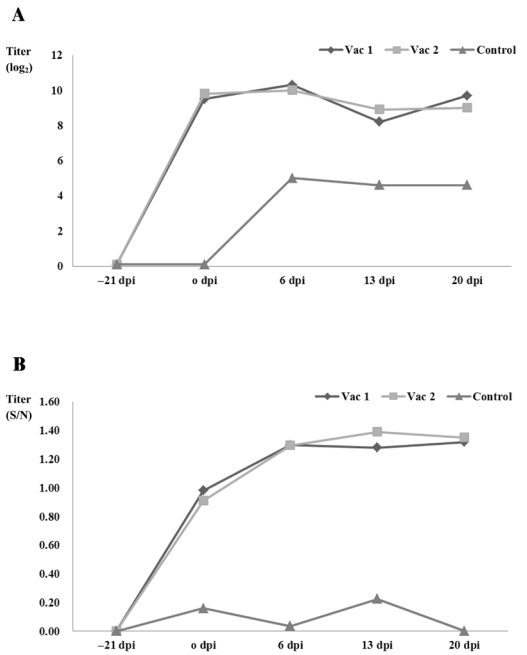

Fig. 2. Titer of *Salmonella* Enteritidis were detected by microplate agglutination test (A) and ELISA (B).

불활화백신의 방어효과를 닭에서 관찰하였다. 백신내 포함된 B369주의 함량을 달리하여 만든 백신1(백신내 균량 1.8×10^9 cfu/mL)과 백신2(백신내 균함량 9×10^8 cfu/mL)를 시험에 사용하였다. 7주령된 닭 30수를 10마리씩 3개 군으로 나누고 백신1군과 백신2군에 해당 백신을 수당 0.5 mL씩 흉부근육내 접종하였다. 대조군의 경우 백신 대신 PBS를 0.5 mL씩 흉부근육내 접종하였다. 접종 3주 후 고병원성 닭분리주 B277주를 경구로 1.5×10^8 cfu/mL되게 공격접종한 후 6일, 13일 및 20일째에 각 군별로 3수, 3수 및 4수 도태시킨 후 채혈을 한 후 비장과 맹장에서 균분리를 실시하였다. 시험기간 중 공격접종에 의한 폐사는 관찰되지 않았다. 공격접종후 6일째에 균 분리수치를 살펴보면 백신을 접종하지 않은 대조군의 경우 맹장에서 189.1 cfu/g이, 비장에서는 420.0 cfu/g의 SE가 분리되었다(Fig. 1). 백신1군의 경우 맹장에서는 검출되지 않았고 비장에서는 22.7 cfu/g의 SE가 분리되었다. 백신2군의 경우 맹장내에서는 49.0 cfu/g이 분리되었고 비장에서는 134.4 cfu/g이 분리되어 백신1군과 2군의 경우 맹장 및 비장에서 균분리가 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다. 공격접종후 13일째에 균분리를 실시한 결과, 대조군의 경우, 비장 및 맹장에서 각각 15.7 cfu/g 및 22.2 cfu/g이 분리되었으나 백신1군의 경우는 맹장 및 비장에서 SE가 검출되지 않았고 백신2군의 경우, 맹장에서만 5.4 cfu/g이 분리되었을 뿐 비장에서는 분리되지 않았다. 그러나 3개군 사이의 균분리수치는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 공격접종 20일째에 균분리는 대조군의 경우 맹장에서 199.7 cfu/g이 분리되고 비장에서 분리되지 않았다. 백신1군의 경우 맹장 및 비장에서 전혀 검출되지 않았고 백신2군의 경우 맹장에서는 검출되지 않았으나 비장에서 50.4 cfu/g의 SE가 분리되었다.

SE 불활화 백신접종후 항체가 조사

백신접종직전(–21 dpi), 공격접종직전(0 dpi), 공격접종

후 6, 13, 20일(6, 13, 20 dpi) 째에 도태한 닭의 혈청에 대해 SE 특이 항체가를 MAT와 ELISA를 사용하여 측정하였다(Fig. 2). MAT의 경우 백신접종군에서는 백신접종후 3주(0 dpi)까지 급속히 증가하다가 그 이후로는 비슷한 항체가를 20 dpi까지 지속하였다. 반면 대조군의 경우 0 dpi까지는 항체가 검출되지 않다가 공격접종후부터 항체가가 상승되나 역가수준은 백신접종군보다는 상당히 낮았다. ELISA로 측정한 경우 항체가는 백신접종 후 3주까지는 급격히 상승 후 완만하게 상승되거나 비슷한 수준으로 유지되는 것으로 나타났다. 백신1군과 백신2군사이의 역가의 유의성 있는 차이는 두 종류의 시험결과에서 관찰되지 않았다. 대조군의 항체가는 거의 음성에 가깝거나 낮은 역가를 나타냈다. -21 dpi를 제외하고는 백신접종군과 대조군은 유의성 있는 차이가 관찰되었으나, 백신1군과 백신2군 사이에는 유의성이 있는 차이가 나타나질 않았다.

고 찰

닭에서의 SE배출의 감소는 계란과 계육의 SE에 의한 오염 감소로 이어지며 이는 바로 오염된 계란 및 계육을 섭취한 사람에서의 식중독 발생의 감소로 연관된다 [7, 15, 21]. 따라서 닭에서 SE 예방을 하기 위해서는 불활화백신과 생균백신이 일부 상용화되고 있다. 일반적으로 SE를 비롯한 *Salmonella*균은 세포 내 기생세균이기 때문에 생균백신이 불활화백신보다 방어효과가 우수하다고 알려져 있다 [20, 21]. 그러나 살모넬라 생균백신에 대한 안전성 문제가 최근 제기 되고 있으며 이러한 이유는 변이주가 불완전한 유전자 변이로 인해 병원성이 복원될 수 있는 점에 기인한다 [19]. 불활화백신에 의해 생성되는 항체는 주로 IgG이며, 약독화 생균백신의 항체는 IgG과 IgA를 주로 생성한다 [18, 24].

SE 불활화백신은 주로 체액성 면역을 유도하고 세포성 매개 면역은 충분히 유도하지 못하는 것으로 알려져 있다 [24]. 그러나 닭에서 SE 예방을 위한 불활화 백신의 사용에 대한 관심이 최근 다시 대두되고 있다. 오일보조제(oil-adjuvant)를 사용한 불활화 백신을 접종한 산란계는 분변 내 SE배출빈도의 감소, 배출되는 SE균량의 감소, 내부장기내 SE분리율의 감소, 공격접종 후 계란 내 SE오염도의 감소가 인정되고 있다 [18]. 또한 생성된 면역항체는 계란을 통해 병아리로 이행되어 부화 후 일정기간 어린 일령에서의 SE 야외감염에 대해 방어력을 제공한다 [4, 25].

불활화 백신균주의 선발에 대한 일반적인 기준이 좋은 면역원성을 지니고, 일정 지역에서 유행하는 분리주가 적합할 것이라는 판단 하에 본 연구팀에서 이전에 보고한 결과를 근거로 유전형, 파아지형, 항생제 내성 패턴을 토대로 백신후보균주를 선발하였다 [19]. 이들 균주에서 가장 병원성이 높은 균주를 선발하고자 마우스와 닭에 접종한 후 폐사율을 측정하였다. *Salmonella* 혈청형에 따른 병원성은 매우 다르다 [7, 10, 13, 22]. Virulence factor를 보면 지당체를 포함한 내독소(endotoxin)의 기능이 잘 알려져 있고, enterotoxin과 cytotoxin 등이 알려져 있다 [7, 22, 27]. 또한 상피세포내의 부착인자, 침투성, 세포내 생존성등이 병원성에 관련이 된다.

마우스와 병아리에서의 SE의 병원성 및 치사율은 연구보고에 따라 다르다. Lu 등 [22]은 SE를 마우스에 경구로 접종 했을 때 대부분의 폐사가 48시간 이내에 일어난다고 보고하였으며, 김 등 [1]은 마우스와 병아리에 경구로 공격접종을 실시했을 때 64.2%의 폐사가 나타났다고 보고하였다.

SE분리주에서도 PT에 따라 병아리에서의 치사율과 장기 내 분리율이 다르게 나타나고 있다. 이전의 보고에 의하면 SE PT4가 초생추에서 가장 높은 장기 내 침투성과 치사율을 보인다고 했다 [10, 13]. 그러나 실험적 감염에 있어서는 SE PT4가 다른 PT와 비교할 때, 장내 집락형성, 비장내 침투성, 수평전파 및 계란 내 오염정도에 있어 유사하다는 보고도 있다 [16, 17]. 반대로 유사한 유전형계통에 속하는 SE 분리주라 하더라도 마우스에서의 병원성이 다를 수 있다는 보고가 있다 [26].

Lu 등 [22]은 SE PT4와 PT8의 분리주들 사이의 마우스에 대한 LD_{50}은 10^2~10^8 cfu/mL로 다양하게 나타난다고 보고하였다. Poppe 등 [27]은 SE PT4를 1일령의 병아리에 경구 접종했을 때 캐나다에서 분리한 SE 분리주보다 영국에서의 SE 분리주가 병원성이 더 강했다고 보고하였다, 김 등 [1]은 SE 분리주의 LD_{50}은 0.25-5.0 × 10^7 cfu/mL로 보고하였는데, 본 연구에서는 SE 균주 B277(PT35)의 LD_{50}은 1.5 × 10^6 cfu/mL로 나타났다. Cooper 등 [12]은 병원성 있는 SE를 12일령의 병아리에 10^6 cfu/mL을 접종했을 때 임상증상이 나타나지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서는 1~3일령 병아리에 경구로 공격접종 후 사람 분리주 B369주를 접종하였을 때 100% 폐사율을 보였다.

닭과 사람에서의 SE분리주는 항원성과 방어능에 있어 동일한 것으로 사료되나 이를 재확인하기 위하여 각각의 분리주로 제조한 백신을 접종한 닭에 서로 다른 분리주를 공격접종하여 측정한 교차방어능이 백신주와 동일한 분리주를 공격접종한 방어능과 유사한지를 살펴보았으나 백신주와 동종 또는 이종의 균주를 공격접종한 결과 방어능에 있어서는 특별한 차이를 보이지 않았으며, 백신접종량의 차이도 뚜렷하게 관찰되지 않았다.

SE백신의 방어능을 평가시 장기내 공격접종균주의 분

리율 및 균수(cfu/g)는 백신의 방어능을 평가하는데 중요한 기준이다 [12, 15]. 공격접종 후 6일째, 대조군에 비해 백신1과 백신2를 접종한 군에서 맹장과 비장내의 균분리수는 낮았다. 공격접종 후 13일째에는 대조군의 균분리수가 워낙 낮았기 때문에 백신접종군의 평가가 제대로 이루어지지 못했다. 공격접종 후 20일째에 대조군의 경우 맹장내에서만 균분리가 되었을 뿐 비장에서는 균이 분리되지 않았다. 백신1 접종군에서는 맹장과 비장에서 균이 검출되지 않았으나, 백신2 접종군에서는 비장에서만 균이 분리되었다. 이러한 차이는 백신을 접종한 개체의 차이, 분변에 간헐적 배출을 하는 균의 특성, 공격접종 후 균을 분리하는 시점 등, 여러 요인에 의해 균 분리수와 분리율이 영향을 받은 것으로 사료된다. Young 등 [28]은 불활화 백신 접종 후 맹장에서 g당 log2.5 cfu의 SE가 분리되었으며, 백신 미접종군에서 SE가 log 3.0이 검출되었다고 보고하였다. Freitas Neto 등 [14]은 SE PT4로 제작된 불활화 오일 백신을 20주령, 25주령, 31주령 닭에서 근육에 접종한 후 1일 및 7일째에 간, 비장 및 맹장에서 균분리 결과 각 장기에서의 균분리율은 차이가 없다고 보고하였다.

백신접종 후 항체가는 비록 1회 접종을 하였으나 접종 후 3주째에 높은 항체를 형성하는 것으로 나타났다. 이에 비해 백신을 접종하지 않은 대조군의 경우, 공격접종전에는 항체음성으로 나타나다가 공격접종 후 접종균에 의해 항체가 형성되는 것이 관찰되었다.

본 연구에서는 사람의 식중독을 발생하는 SE 분리주를 대상으로 마우스 및 닭에서의 병원성을 측정한 후 선발한 백신균주를 사용하여 제조한 불활화 백신에 대한 방어능과 항체 형성능을 살펴보았다. 제조한 SE불활화 백신은 야외 병원성 SE분리주에 대해 우수한 방어효과를 보였고 우수한 항체 형성능을 나타냈다. 추후 본 백신의 상용화를 위해 야외 농장을 대상으로 한 백신접종 후 산란율의 변화 등을 측정하는 안전성 시험과 항체 지속능 및, 분변 내 균 배출율에 대한 시험이 실시될 필요가 있다고 사료된다.

결 론

본 연구는 계란이나 계육을 통해 사람에서 식중독을 일으키는 주요 원인균인 SE의 국내분리주를 사용하여 닭에서 SE감염을 예방하는 불활화 백신을 제조하여 방어효과를 평가하였다. 닭 및 사람에서의 분리주중 대표적인 유전형 및 PT를 지닌 11주를 선발하여 병아리에서 병원성이 가장 높은 SE B369주와 B277주를 선발하였다. 이들 균주를 사용하여 불활화 백신을 제조한 후 1회 복강내로 백신접종을 실시하였다. 병원성 SE주를 공격접종한 후 방어효과를 관찰한 결과 대조군은 100% 폐사한 반면 백신접종주는 70~100% 생존율을 나타내 우수한 방어효과를 보였다. SE B369주로 제조한 불활화 백신을 7주령의 닭에 2회 접종한 후 병원성 SE로 공격접종하였다. 공격접종 후 6, 13, 20일째에 장기 내 분리율과 항체생성율을 측정하였다. 백신접종군은 대조군에 비해 맹장과 비장에서의 장기 내 SE분리율이 유의성있게 낮았다. 또한 백신접종후 SE 항체가를 응집반응과 ELISA로 측정한 결과 대조군에 비해 백신접종군이 유의성 있게 높은 항체가가 관찰되었다. 그러나 불활화백신 내 함유하는 균수에 따른 방어효과 및 항체가의 차이는 관찰되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부(농림, 식품, 수산) 기술개발사업의 지원과 강원대학교 동물의학종합연구소 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. **김상윤, 이희무, 김신, 홍현표, 권헌일.** 경북지역 가축에서 분리된 *Salmonella typhimurium*과 *S enteritidis*의 phage typing 및 pulsed-field gel electrophoresis. 한국가축위생학회지 2001, **24**, 243-253.
2. **김정우.** *Salmonella enteritidis*의 편모항원에 대한 난황항체의 생산. 한국가금학회지 1998, **25**, 161-167.
3. **박석기, 김무상, 이영기.** 최근 5년간 서울시내 식중독 환자에서 분리한 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis의 항생제 감수성 및 다제 내성 특성. 한국식품위생안전성학회지 2006, **21**, 23-30.
4. **이승배.** ELISA 방법으로 계란의 난황에 존재하는 *Salmonella enteritidis*와 *S. typhimurium*에 대한 IgY 측정. 한국축산식품학회지 2003, **23**, 161-167.
5. **이희수, 임숙경, 조윤상, 주이석, 김재학, 김종만.** 살모넬라 세포외막단백질 혼합백신을 이용한 돼지 및 닭에서의 살모넬라균감염증 방어효과. 대한수의학회지 2007, **47**, 147-155.
6. **최철순.** 백신의 개량과 생명공학. 유전공학연구논집 1994, **7**, 55-82.
7. **Angulo FJ, Swerdlow DL.** *Salmonella enteritidis* infections in the United States. J AM Vet Med Assoc 1998, **213**, 1729-1731.
8. **Barbezange C, Ermel G, Ragimbeau C, Humbert F, Salvat G.** Some safety aspects of *Salmonella* vaccines for poultry: in vivo study of the genetic stability of three *Salmonella typhimurium* live vaccines. FEMS Microbiol Lett 2000, **192**, 101-106.
9. **Barbour EK, Frerichs WM, Nabbut NH, Poss PE, Brinton MK.** Evaluation of bacterins containing three

predominant phage types of *Salmonella enteritidis* for prevention of infection in egg-laying chickens. Am J Vet Res 1993, **54**, 1306-1309.

10. **Barrow PA.** Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. Avian Pathol 1991, **20**, 145-153.
11. **Clifton-Hadley FA, Breslin M, Venables LM, Sprigings KA, Cooles SW, Houghton S, Woodward MJ.** A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. Vet Microbiol 2002, **89**, 167-179.
12. **Cooper GL**, **Nicholas RAJ, Cullen GA, Hormaeche CE.** Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis aro*A live oral Salmonella vaccine. Microb Pathog 1990, **9**, 255-265.
13. **Dhillon AS, Alisantosa B, Shivaprasad HL, Jack O, Schaberg D, Bandli D.** Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* phage types 4, 8, and 23 in broiler chicks. Avian Dis 1999, **43**, 506-515.
14. **Freitas Neto OC**, **Mesquita AL, Paiva JB, Zotesso F, Júnior AB.** Control of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in laying hens by inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccines. Braz J Microbiol 2008, **39**, 390-396.
15. **Garmory HS**, **Brown KA, Titball RW.** *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. FEMS Microbiol Rev 2002, **26**, 339-353.
16. **Gast RK, Holt PS.** Experimental horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* strains (phage types 4, 8, and 13a) in chicks. Avian Dis 1999, **43**, 774-778.
17. **Gast RK, Holt PS.** Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. Avian Dis 2000, **44**, 706-710.
18. **Gast RK**, **Stone HD, Holt PS.** Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. Avian Dis 1993, **37**, 1085-1091.
19. **Kang ZW, Jung JH, Kim SH, Lee BK, Lee DY, Kim YJ, Lee JY, Won HK, Kim EH, Hahn TW.** Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. J Vet Med Sci 2009, **71**, 1433-1438.
20. **Lillehoj HS.** Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. In: Sharma JM (ed.). Avian Cellular Immunology. pp. 155-181, CRC, Boca Raton, 1990.
21. **Linton AH.** Guidelines on Prevention and Control of Salmonellosis. World Health Organization, Geneva, 1983.
22. **Lu S**, **Manges AR, Xu Y, Fang FC, Riley LW.** Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. Infect Immun 1999, **67**, 5651-5657.
23. **Meenakshi M**, **Bakshi CS, Butchaiah G, Bansal MP, Siddiqui MZ, Singh VP.** Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella enteritidis*. Vet Res Commun 1999, **23**, 81-90.
24. **Muotiala A, Hovi M, Mäkelä PH.** Protective immunity in mouse salmonellosis: Comparison of smooth and rough live and killed vaccine. Microb Pathog 1989, **6**, 51-60.
25. **Nicholas RAJ, Andrews SJ.** Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* and *S typhimurium* in the yolk of hen's eggs. Vet Rec 1991, **128**, 98-100.
26. **Olsen JE, Tiainen T, Brown DJ.** Levels of virulence are not determined by genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains. Epidemiol Infect 1999, **123**, 423-430.
27. **Poppe C**, **Demczuk W, McFadden K, Johnson RP.** Virulence of *Salmonella enteritidis* phagetypes 4, 8 and 13 and other *Salmonella spp*. for day-old chicks, hens and mice. Can J Vet Res 1993, **57**, 281-287.
28. **Young SD**, **Olusanya O, Jones KH, Liu T, Liljebjelke KA, Hofacre CL.** *Salmonella* incidence in broilers from breeders vaccinated with live and killed *Salmonella*. J Appl Poult Res 2007, **16**, 521-528.