

## 살모넬라 세포외막단백질 혼합백신을 이용한 돼지 및 닭에서의 살모넬라균감염증 방어효과

이희수\* · 임숙경 · 조운상 · 주이석 · 김재학 · 김종만

국립수의과학검역원  
(게재승인: 2007년 5월 25일)

### Protective effects of mix-crude outer membrane protein *Salmonella* vaccine against salmonellosis in chickens and pigs

Hee-Soo Lee\*, Suk-Kyung Lim, Yun-Sang Cho, Yi-Seok Joo, Jae-Hak Kim, Jong-Man Kim

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea

(Accepted: May 25, 2007)

**Abstract :** We investigated the safety, immunogenicity and protectivity of mix-crude outer membrane protein (cOMP) vaccine against salmonellosis in animals. The mix-cOMP vaccine was extracted from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) and *Salmonella enterica* serovar Braenderup (SB) isolated from pigs. The mix-cOMP vaccine gave significantly higher antibody response than ST-bacterin and ST-cOMP vaccine in guinea pigs. The survival rates of mix-cOMP vaccinated groups showed significantly higher (100%) than those (0-20%) of unvaccinated control group, challenged with 3 species of *Salmonella* (ST, SE and SB) in mice. Vaccinated groups in pigs showed reduction of clinical signs, increase of average weight gains, decrease of bacterial recovery rates, compared with unvaccinated groups. Especially, the survival rates (100%) of vaccinated groups in chickens showed higher than that (0%) of unvaccinated group. Based on these results, we suggest that the mix-cOMP *Salmonella* vaccine developed in this study will be effective for the protection against Salmonellosis caused by the various serotypes *Salmonella* species in animals.

**Key words :** mix-cOMP vaccine, *S. braenderup*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, salmonellosis

## 서 론

가축의 살모넬라감염증은 이유자돈, 송아지 및 닭에서 설사와 폐사를 일으키며, 사람에게서 식중독을 일으키는 인수공통전염병으로서도 중요하다 [13]. 지구상에는 2,400 종 이상의 salmonella serotypes이 다양한 숙주에 널리 분포하는 것으로 알려져 있으나, 특정의 숙주에 강한 병원성을 발휘하거나, 사람이나 동물 등 다양한 숙주에 감염되어 질병을 일으키는 균종은 제한적인 것으로 보고되고 있다 [13, 19, 34].

가축에 분포하는 살모넬라 혈청형은 그룹 B, C 및 D

그룹이 대부분을 차지하며 [1, 4, 5], 이러한 이유로 이 등 [4] 및 Nielsen 등 [29]은 그룹별 특이항원인 lipopolysaccharide(LPS)를 혼합하여 사용함으로써 다양한 종류의 살모넬라 감염항체를 동시에 모니터링 하고자 하였으며, LPS를 이용한 검출방법은 살모넬라 방제프로그램에 효과적으로 사용되고 있다 [27].

살모넬라균은 증식특성이 세포내 기생체로서 숙주동물의 림파구나 대식세포 등에서 생존하며 [16, 24], Buchmerier 등 [11]은 실험적으로 면역되지 않은 이들 세포내의 균 증식능력을 보고한 바 있다. 이러한 특성이 치료약제에 의한 완치의 어려움과 사균백신에 의해 유

\*Corresponding author: Hee-Soo Lee  
National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea  
[Tel: +82-31-467-1768, Fax: +82-31-467-1778, E-mail: leehsoo@nvrqs.go.kr]

발되는 높은 항체역가가 살모넬라균의 방어에 제한적인 효과를 발휘하는 이유로서도 설명되고 있다 [11, 17, 23].

더욱이 질병의 예방이나 치료목적의 항생제 사용량이 증가하면서 약제 내성률 또한 증가하는 추세이며 [2], 덴마크 등 유럽을 중심으로 다약제내성균인 *S. typhimurium* DT104의 출현증가는 사람에서의 치료약제의 부재 등 사회적인 문제로 대두되고 있는 실정이다 [8].

일반적으로 세포내 기생하는 병원체의 경우 사균보다는 생균백신이 질병예방에 효과적이며 [21, 24], 살모넬라균의 경우도 세포성면역을 증강시키고 안전한 생균백신의 개발에 많은 연구들이 있어 왔다 [9, 18, 21, 25]. 이와 같은 생균백신의 작성에는 많은 노력과 시간이 소요되며, 병원성의 회복가능성 등 안전성에 관한 문제가 제기될 수 있다 [9, 18]. 한편으로 그람음성균의 세포외막을 구성하고 있는 조세포외막단백질(crude outer membrane protein: cOMP) 복합물질이 세포성면역을 활성화시키는 immunodominant proteins으로서 보고되고 있다 [7, 22, 30, 37]. Bouzoubaa 등 [9, 10]은 가금티푸스를 예방하는데 OMP 항원이 9R live vaccine보다도 안전성이나 방어효과가 뛰어난 것으로 보고하였으며, Charles [12] 및 Meenakshi [26] 등은 adjuvanted OMP백신을 이용하여 칠면조의 살모넬라 감염을 효과적으로 방제한 바 있다.

본 연구에서는 다양한 균종에 의해 감염되는 가축의 살모넬라감염증을 효과적으로 예방하기 위하여 국내 가축에서 유행하는 균종을 선별하고 이들 균종으로부터 추출한 cOMP를 혼합항원으로 사용한 살모넬라 cOMP 혼합백신의 실험동물과 적용대상동물인 돼지 및 닭에 대한 방어효능을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균배양

가축에서 유행하는 주요 혈청그룹 B, C 및 D의 대표적인 균주로서 국내 돼지에서 분리된 각각의 *S. typhimurium*(NVRQS-ST10-PT104L: ST), *S. braenderup*(NVRQS-SB2: SB) 및 *S. enteritidis*(NVRQS-SE9-PT1: SE)를 사용하여 brain heart infusion broth(BHI; Difco, USA)에 37°C에서 48시간 배양하였다.

### cOMP 추출

Rapp 등 [30]의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 균배양액을 원심(7,000 × g, 30분)하여 균을 침전시키고, 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)를 가하여 균을 현탁시킨 후, McFarland's nephelometer standards No.10( $3 \times 10^9$ /ml)의 100배가 되게 균농도를 조절하고 ice box 안에서 sonicator

(Vibra cell TM VC 375; Conics and Materials, USA)을 이용하여 30분간 초음파처리(10-15 KHZ, 50% duty cycle)하여 균을 파쇄한 후 원심분리(7,000 rpm, 30분), 침전물을 제거하고 상층액을 crude OMP용액으로 하였으며, 여기에 0.5% formalin-saline으로 37°C에서 72시간 불활화하고, Protein Assay Reagent kit(Pierce, USA)를 이용하여 standard albumin의 함량을 기준으로 단백질 농도(mg/ml)를 측정하고 5°C 냉장실에 보관하면서 사용하였다.

### 실험동물

국립수의과학검역원에서 생산된 mouse(ICR, 4주령) 및 guinea pig(8주령)를 이용하여 항원농도별 및 시험백신의 방어효과와 항체형성능을 각각 조사하였으며, 일반농장에서 35일령의 자돈 및 산란계 병아리를 구입하여 살모넬라항체 음성을 확인하고 시험에 공시하였다.

### 시험백신의 제조 및 면역접종

불활화된 3종의 cOMP 항원을 동일한 농도로 조절하여 혼합한 후 단계별(6.25-50 µg/ml)로 희석하여 마우스의 복강에 2주간격으로 2회 접종하고 항원농도에 따른 방어효과를 알아보았다. 또한 cOMP 혼합백신의 제조를 위하여 미리 준비된 각각의 불활화 항원을 혼합한 후 부형제로서 수산화알루미늄겔[Al(OH)<sub>3</sub>: gel] 15% 및 ISA25(Seppic, France) 3%의 비로 혼합하여 시험백신을 제조하였으며, 결과적으로 cOMP 혼합백신 1 ml 내에는 마우스 시험용의 경우 항원함량이 ST185 µg, SE250 µg 및 SB164 µg이었으며, 돼지 및 닭 접종용의 경우 3종의 cOMP 항원이 각각 780 µg/ml 함유하게 하였다. 또한 ST bacterin( $2.3 \times 10^{11}$ cfu/ml) 및 ST OMP(330 µg/ml) 백신을 동일한 방법으로 제조하여 대조군으로서 비교시험하였다. 백신의 접종량은 마우스는 마리당 0.2 ml를 복강내로, 돼지는 2 ml를, 닭의 경우 0.5 ml 또는 1.0 ml를 각각 근육내로, 2주 간격으로 2회 면역 접종하였다.

### 균 공격접종

마지막 백신접종 후 2주에 항원추출에 사용된 3종의 살모넬라균인 ST 단독 또는 ST, SE 및 SB의 균배양 혼합액으로 공격 접종하였다. 마우스의 경우 균 혼합액(ST  $11.5 \times 10^{10}$ cfu + SE  $3.5 \times 10^{10}$ cfu + SB  $6.5 \times 10^{11}$ cfu/ml) 0.2 ml를 복강내로 접종하였으며, 돼지의 경우 ST ( $4.0 \times 10^{11}$ cfu/ml) 단일균을 경구 10 ml 및 근육 1 ml 동시접종하거나 균혼합액(ST  $2.3 \times 10^{10}$ cfu + SE  $7.5 \times 10^9$ cfu + SB  $1.3 \times 10^{11}$ cfu/ml)을 경구 10 ml 및 근육 1 ml를 접종하였다. 한편으로 닭의 경우는 SG( $1.0 \times 10^9$ cfu/ml) 또는 균혼합액(ST  $2.3 \times 10^{10}$ cfu + SE  $7.5 \times 10^9$ cfu + SB

1.3 × 10<sup>11</sup> cfu/ml) 2 ml를 각각 근육내 공격접종하였다.

**효능측정**

시험백신의 실험동물에 대한 방어효과를 균 공격접종 후 7일간의 생존율로서 나타내었으며, 항체형성능은 ELISA법 [4, 29]과 마이크로플레이트를 이용한 응집반응에 의하여 항체역가를 측정하였다. 즉, 이 등 [4]의 방법에 준하여 ST, SB 및 SE로부터 추출한 LPS 항원을 ELISA용 plate에 각각 10 ng/well 씩 코팅하고 냉장실 (4°C)에 24시간 반응시킨 후 일반적인 ELISA법에 따라 시험하였다. 또한 응집역가 측정을 위하여 microplate(U형, 96 well)에 생리식염수로 well당 100 µl씩 분주하고, serum를 10배부터 단계별로 희석한 후, 살모넬라 항원 농도를 McFarland's No.4로 조정하여 동량인 50 µl/well 분주하고 항온실에 24시간 반응시킨 다음 응집여부를 판독하였다. 또한, 돼지 및 닭의 경우 백신접종 후 공격접종에 대한 방어효과를 생존율, 임상증상 억제효과, 체중증체량, 분변 및 실질장기에서의 균회수 검사를 실시하여 측정하였다.

cOMP 6.25~50 µg를 2회 접종한 후 다시 2주후 살모넬라균을 공격접종하여 7일간의 생존여부를 관찰한 결과를 Table 1에 나타내었다. ST 및 SE를 접종한 경우 모든 시험구에서 100%의 방어효과를 나타내었으며, SB의 경우는 50 µg 접종군에서 100%를, 12.5 µg 및 25 µg에서는 90%, 6.25 µg를 접종한 그룹은 60%의 방어효과를 각각 나타내어 농도에 따른 차이를 확인할 수 있었다. 반면 cOMP항원을 접종하지 않은 대조군은 ST 및 SE의 경우 100%의 폐사와 SB는 83.3%의 폐사율을 나타내었다. 이와같은 시험결과는 시험적으로 제조한 cOMP 혼합백신의 마우스에 대한 방어효과시험에서도 유사하게 나타나서 백신접종군은 3종의 살모넬라균에 대해 대조군의 0-20%에 비해 모두 100% 방어효과를 나타내었다(Table 2). 한편으로 시험백신의 기니아피에 대한 항체형성능 조사에서 cOMP혼합백신은 ST 균체 및 ST OMP백신그룹보다 높은 항체가를 나타내었으며, 2차 접종 후 6주까지 계속 상승한 후 점차 내려가는 양상이었으나, 8~10주까지 비교적 높은 항체가를 유지한 이후 12주 및 14주에서는 급격히 하락하는 것으로 나타내었다 (Fig. 1).

**결 과**

**실험동물에서의 방어효과**

cOMP 혼합항원의 마우스에 대한 방어효과시험에서

**자돈에서의 방어효과**

cOMP 혼합백신을 2주 간격으로 2회 근육접종하고, 2주후에 살모넬라균을 공격접종 후 분변을 통한 균배출

**Table 1.** Protective efficacy in mice inoculated with mix-cOMP antigens against challenge of *Salmonella*

| Mix-cOMP <sup>A</sup> antigens | Bacteria <sup>B</sup> challenged | No. of animals | No. of mice died at day after inoculation |   |   |   |   |   |   | Survival rate (%) |
|--------------------------------|----------------------------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|-------------------|
|                                |                                  |                | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |                   |
| 50 µg/수                        | ST10                             | 10             | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SE9                              | 9              | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SB2                              | 8              | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
| 25 µg/수                        | ST10                             | 10             | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SE9                              | 10             | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SB2                              | 8              | 1   | - | - | - | - | - | - | 87.5              |
| 12.5 µg/수                      | ST10                             | 11             | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SE9                              | 11             | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SB2                              | 10             | 1   | - | - | - | - | - | - | 90                |
| 6.25 µg/수                      | ST10                             | 6              | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SE9                              | 5              | -   | - | - | - | - | - | - | 100               |
|                                | SB2                              | 5              | 2   | - | - | - | - | - | - | 60                |
| Control                        | ST10                             | 12             | 5   | 3 | 3 | 1 | - | - | - | 0                 |
|                                | SE9                              | 13             | 4   | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0                 |
|                                | SB2                              | 12             | 8   | 2 | - | - | - | - | - | 16.7              |

<sup>A</sup> Antigens was given by intraperitoneal twice at interval of 2 weeks, with 0.2 ml per animal at 4 weeks of age.

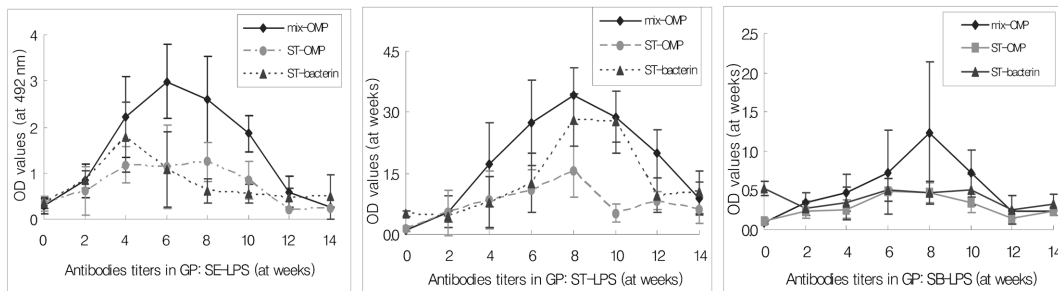
<sup>B</sup> Intraperitoneal challenged with 0.2 ml of ST 2.3 × 10<sup>10</sup>cfu, SE 7.5 × 10<sup>9</sup>cfu, and SB 1.3 × 10<sup>11</sup>cfu per animal on 2 weeks post last inoculation.

**Table 2.** Protective efficacy in mice vaccinated with cOMP vaccine against challenge of *Salmonella*

| Vaccines <sup>A</sup> | Antigens                           | Bacteria <sup>B</sup> challenged | No. of animals | No. of mice died at day after inoculation |   |   |   |   |   |   | Survival rate (%) |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|-------------------|
|                       |                                    |                                  |                | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |                   |
| Mix-cOMP              | ST185 µg + SE250 µg + SB 164 µg/ml | ST                               | 10             | –   | – | – | – | – | – | – | 100               |
|                       |                                    | SE                               | 10             | –   | – | – | – | – | – | – | 100               |
|                       |                                    | SB                               | 10             | –   | – | – | – | – | – | – | 100               |
| ST cOMP               | 330 µg/ml                          | ST                               | 10             | –   | – | – | – | – | – | – | 100               |
| ST Bacterin           | 2.3 × 10 <sup>11</sup> cfu/ml      | ST                               | 10             | –   | – | 1 | – | – | – | – | 90                |
|                       |                                    | SE                               | 10             | 4   | 4 | 1 | – | 1 | – | – | 0                 |
|                       |                                    | SB                               | 10             | –   | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | – | 0                 |
| Control               |                                    | ST                               | 10             | 3   | 3 | 2 | – | – | – | – | 20                |
|                       |                                    | SE                               | 10             | –   | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | – | 0                 |
|                       |                                    | SB                               | 10             | 3   | 3 | 2 | – | – | – | – | 20                |

<sup>A</sup> Vaccine was given twice at interval of 2 weeks, with 0.2 ml per animal by intraperitoneal, and adjuvant was gel (15%) + ISA25 (3%).

<sup>B</sup> Intraperitoneal challenged with 0.2 ml of ST 2.3 × 10<sup>10</sup>cfu, SE 7.5 × 10<sup>9</sup>cfu, and SB 1.3 × 10<sup>11</sup>cfu/ml per animal on 2 weeks post last vaccination.

**Fig. 1.** Antibody titers against *Salmonella* antigens (LPS) in sera of guinea pigs immunized with mix-cOMP vaccine.**Table 3.** Recovery rates of *Salmonella* from feces of pigs challenged with *Salmonella*

| Groups                        | Bacteria <sup>B</sup> challenged | Recovery of <i>Salmonella</i> from feces at days after challenge <sup>C</sup> |             |             |          |             |
|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------|-------------|----------|-------------|
|                               |                                  | 2   | 4           | 6           | 10       | 14          |
| Mix-cOMP <sup>A</sup> vaccine | ST                               | 1/3 (st) <sup>D</sup>   | 0/3         | 1/3 (sb)    | 0/3      | 0/3         |
|                               | Mix                              | 0/3   | 0/3         | 0/3         | 0/3      | 0/3         |
| Unvaccinated                  | ST                               | 2/3 (st)  | 2/3 (st)    | 3/3 (st)    | 1/3 (st) | 2/3 (st,se) |
|                               | Mix                              | 2/3 (sb)  | 2/3 (st,sb) | 1/3 (st,sb) | 1/3 (st) | 1/3 (se,sb) |
| Control                       | Non                              | 0/3   | 0/3         | 0/3         | 0/3      | 0/3         |

<sup>A</sup> Vaccination with 2 ml of mix-cOMP 780 µg/ml of ST, SE, and SB, respectively, twice at interval of 2 weeks per animal at 35 days of age.

<sup>B</sup> ST challenged by oral with 10 ml, and by intramuscular with 1 ml of 4.0 × 10<sup>11</sup>cfu/ml of *S. typhimurium*. Mix challenged by oral with 10 ml, and by intramuscular with 1 ml of ST 2.3 × 10<sup>10</sup>cfu, SE 7.5 × 10<sup>9</sup> cfu, and SB 1.3 × 10<sup>11</sup>cfu/ml, per animal, respectively.

<sup>C</sup> No. of positive/No. of animals.

<sup>D</sup> Letter in ( ) is *Salmonella* spp. isolated, st: *S. typhimurium*, sb: *S. braenderup*, se: *S. enteritidis*.

시험에서 백신접종그룹은 6두 중 1두에서 균이 분리된 반면, 비접종 대조군은 6두 중 5두에서 균점종 2-14일간 계속 균을 배출하는 것으로 나타내었다(Table 3). 또한

시험종료일인 균점종 14일후, 간 등의 실질장기별 균 회수시험결과 백신 접종군은 장간막임파절 1두를 제외하고 살모넬라균이 분리되지 않았으며, 반면 대조군은 모

**Table 4.** Recovery rates *Salmonella* from organs of pigs after challenged with *Salmonella*

| Groups                        | Bacteria <sup>B</sup> challenged | Recovery of <i>Salmonella</i> from organs 14 days after challenge <sup>C</sup> |             |          |          |           |                       |
|-------------------------------|----------------------------------|--|-------------|----------|----------|-----------|-----------------------|
|                               |                                  | Heart  | Liver       | Lug      | Spleen   | Intestine | lymphnode             |
| Mix-cOMP <sup>A</sup> vaccine | ST                               | 0/3  | 0/3         | 0/3      | 0/3      | 0/3       | 0/3                   |
|                               | Mix                              | 0/3  | 0/3         | 0/3      | 0/3      | 0/3       | 1/3 (sb) <sup>D</sup> |
| Unvaccinated                  | ST                               | 0/3  | 0/3         | 1/3 (st) | 1/3 (st) | 1/3 (st)  | 1/3 (st)              |
|                               | Mix                              | 1/3 (st)   | 2/3 (st,se) | 1/3 (se) | 1/3 (st) | 1/3 (sb)  | 1/3 (se,st)           |
| Control                       | Non                              | 0/3  | 0/3         | 0/3      | 0/3      | 0/3       | 0/3                   |

<sup>A</sup> Vaccination with 2 ml of mix-OMP 780 µg/ml of ST, SE, and SB, respectively, twice at interval of 2 weeks per animal at 4 weeks of age.

<sup>B</sup> ST challenged by oral with 10 ml and by intramuscular with 1ml of  $4.0 \times 10^{11}$ cfu/ml of *S. typhimurium*. Mix challenged by oral with 10 ml and by intramuscular with 1 ml of ST  $2.3 \times 10^{10}$ cfu, SE  $7.5 \times 10^9$  cfu, and SB  $1.3 \times 10^{11}$ cfu/ml, per animal, respectively.

<sup>C</sup> No. of positive/No. of animals.

<sup>D</sup> Letter in ( ) is *Salmonella* spp. isolated, st: *S. typhimurium*, sb: *S. braenderup*, se: *S. enteritidis*.

**Table 5.** Increasing effects of weight gains in pigs immunized with mix-cOMP vaccine

| Groups               | Bacteria of <sup>B</sup> challenged | No.of animals | Weight gains (kg) post challenge |                           |
|----------------------|-------------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------------------|
|                      |                                     |               | Once week                        | Twice week                |
| Mix-OMP <sup>A</sup> | ST                                  | 3             | 1.13 ± 0.62 <sup>a</sup>         | 5.07 ± 2.13 <sup>a</sup>  |
|                      | Mix                                 | 3             | 1.16 ± 0.26 <sup>a</sup>         | 4.76 ± 0.78 <sup>a</sup>  |
| Non-vaccine          | ST                                  | 3             | 0.09 ± 0.62 <sup>ab</sup>        | 2.73 ± 1.45 <sup>ab</sup> |
|                      | Mix                                 | 3             | -1.59 ± 1.84 <sup>b</sup>        | -0.45 ± 4.41 <sup>b</sup> |
| Control              | Non                                 | 3             | 1.15 ± 1.15 <sup>a</sup>         | 4.51 ± 0.31 <sup>a</sup>  |

<sup>A</sup> Vaccination with 2 ml of mix-cOMP 780 µg/ml of ST, SE, and SB, respectively, twice at interval of 2 weeks per animal.

<sup>B</sup> ST challenged by oral with 10 ml, and by intramuscular with 1 ml of  $4.0 \times 10^{11}$ cfu/ml of *S. typhimurium*. Mix challenged by oral with 10 ml, and by intramuscular with 1 ml of ST  $2.3 \times 10^{10}$ cfu, SE  $7.5 \times 10^9$  cfu, and SB  $1.3 \times 10^{11}$ cfu/ml per animal, respectively.

든 장기에서 공격접종한 3종의 살모넬라균이 모두 분리되었다(Table 4). 공격접종후 1주 및 2주후의 체중증체량(kg)에서 백신접종군은 각각  $1.16 \pm 0.26$  및  $4.76 \pm 0.78$ 으로서 비접종대조군의  $1.15 \pm 1.15$  및  $4.51 \pm 0.31$ 과 차이를 보이지 않은 반면, 공격접종 대조군의  $-1.59 \pm 1.84$  및  $-0.45 \pm 4.41$ 과는 통계적으로 유의한 차이로서( $p < 0.05$ ) 증체효과를 확인할 수 있었다(Table 4). 시험백신의 항체형성능은 2차 접종 2주후 응집역가시험에서 SB가 613으로 가장 높게 나타났고, SE 및 ST는 87 및 83으로 각각 나타내었다(Table 5). 한편으로 백신접종그룹은 체온 등 접종반응 및 체중증체량에서 비접종 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않아 안전성을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ).

**닭에서의 방어효과**

동일의 cOMP 혼합백신을 4주령의 닭에 0.5 ml 및 1 ml씩 2회 근육접종하고 2주 후 3종의 살모넬라균을 공

격접종한 결과 대조군은 100% 폐사한 반면, 백신접종군은 100% 생존율을 나타내었다. 또한 cOMP 혼합백신은 가금티푸스 원인균인 *S. gallinarum* (SG)의 공격접종한 시험에서도 백신접종군(1 ml 접종)은 20%의 폐사율을 보여 대조군의 90%에 비해 상당한 수준의 교차방어능을 가지는 것으로 나타내었다(Table 6).

**고 찰**

*Salmonella* 균에 대한 숙주동물의 방어효과는 humoral immunity에 의한 항체수준보다는 cell-mediated immunity (CMI)의 활성화가 중요하며 [23, 24], 세포외막을 구성하는 OMP를 면역항원으로서 살모넬라방제에 적용하려는 많은 연구들이 있어왔다 [3, 9, 10, 20, 26, 32, 35].

그람음성균의 방어면역원으로서 중요하게 인식되고 있는 OMP [6, 7, 22, 30, 33]는 다양한 크기의 proteins 과 LPS 및 phospholipid의 복합체를 이루고 있고 이와

**Table 6.** Antibody titers in pigs immunized with mix-cOMP vaccine

| Groups                           | Means antibody titers after vaccination <sup>B</sup> |      |       |         |       |        |         |       |        |
|----------------------------------|--|------|-------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|
|                                  | Before vacc.   |      |       | 2 weeks |       |        | 4 weeks |       |        |
|                                  | ST   | SE   | SB    | ST      | SE    | SB     | ST      | SE    | SB     |
| mix-cOMP <sup>A</sup> vaccinated | < 10   | < 10 | 23.33 | 15.00   | 26.67 | 120.00 | 83.33   | 86.67 | 613.33 |
| Control                          | < 10   | < 10 | 18.89 | < 10    | < 10  | 11.11  | < 10    | < 10  | 13.33  |

<sup>A</sup> Vaccination with 2 ml of mix-cOMP 780 µg/ml of ST, SE, and SB, respectively, twice at interval of 2 weeks per animal.

<sup>B</sup> Geometric means titers (n = 9) by microplate agglutination test.

**Table 7.** Protective efficacy in chickens vaccinated with the mix-cOMP antigens against challenge of *Salmonella*

| Vaccination           | Bacteria <sup>B</sup> challenged | No. of animals | No. of chickens died at day after challenge |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |       | Survival rate (%) |     |
|-----------------------|----------------------------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|-------|-------------------|-----|
|                       |                                  |                | 2   | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | total |                   |     |
| Mix-cOMP <sup>A</sup> | 1 ml                             | ST + SE + SB   | 10  | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -     | 0                 | 100 |
|                       |                                  | SG             | 10  | - | - | - | 1 | - | - | - | -  | 1  | -  | -     | 2                 | 80  |
|                       | 0.5 ml                           | ST + SE + SB   | 10  | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -     | 0                 | 100 |
|                       |                                  | SG             | 10  | - | - | - | - | 2 | 2 | 1 | -  | -  | -  | -     | 5                 | 50  |
| Control               | Non                              | ST + SE + SB   | 10  | - | - | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 | -  | -  | -  | -     | 9                 | 10  |
|                       |                                  | SG             | 10  | 4 | 1 | - | - | - | 1 | 2 | -  | -  | 2  | -     | 10                | 0   |
|                       | Non                              | ST + SE + SB   | 10  | 4 | 1 | - | - | - | 1 | 2 | -  | -  | 2  | -     | 10                | 0   |
|                       |                                  | Non            | 10  | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -     | 0                 | 100 |

<sup>A</sup> Intramuscular vaccination with 1 ml or 0.5 ml of mix-cOMP 780 µg/ml of ST, SE, and SB, respectively, twice at interval of 2 weeks per animal, and adjuvant was gel (15%) + ISA25 (3%).

<sup>B</sup> Challenged with 2 ml of SG  $1.0 \times 10^9$  cfu or 2 ml of mixed bacteria ( $ST 2.3 \times 10^{10}$  cfu,  $SE 7.5 \times 10^9$  cfu, and  $SB 1.3 \times 10^{11}$  cfu/ml) by intramuscular, per animal on 2 weeks post last vaccination.

같은 자연구조상태가 면역반응을 증진시키는 역할을 하며 [3, 9, 10, 20], 균종상호간에도 교차면역반응이 보고되고 있다 [14, 15, 28, 36].

본 연구에서는 다양한 혈청형의 균종에 의해 감염되는 가축의 살모넬라감염증 [1, 4, 5, 19]을 효과적으로 방제하기 위하여 주요 혈청그룹인 B, C 및 D에 속하는 대표적인 국내 분리주로서 ST, SB 및 SE를 각각 선발하여, 이들 3종의 균주로부터 추출한 cOMP 혼합항원을 이용하여 실험동물 및 목적동물에 적용하였다. 다양한 농도의 cOMP 혼합항원에 대한 마우스에서의 방어효과 시험에서 ST 및 SE를 공격접종한 경우 6.25 µg까지 전 시험구에서 100%의 방어효과를 나타내었으나, SB의 경우는 12.5 µg 이상 접종군에서 90% 이상의 방어효과를, 6.25 µg를 접종한 그룹은 60%의 방어효과를 각각 나타내어 균종 또는 농도에 따른 차이를 확인할 수 있었다. 이 시험결과는 마우스의 무게가 25-30 g인 점을 감안하면, 이 등 [3, 9, 10]의 SG OMP 항원의 닭 체중 100 g 당 100 및 50 접종 시 100% 및 75%의 방어효과보다 ST 및 SE의 경우는 우수한 결과로 볼 수 있으며, 반면에 SB의 경우는 유사한 결과로 판단할 수 있다. cOMP 혼합 시험백신의 마우스에 대한 방어효과 시험에서도

유사한 시험결과로서 백신접종군은 3종의 살모넬라균에 대해 모두 100% 방어효과를 나타내어 OMP혼합항원은 다양한 종의 살모넬라균을 동시에 방어하는데 효과적으로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

살모넬라균의 방어능은 항체가보다는 세포성면역이 강조되는 추세이나 [9, 17, 28], 연구자에 따라서는 두 가지 면역 모두가 필요한 것으로 보고하고 있다 [13, 31]. 이 등 [3]은 살모넬라 OMP 백신접종군은 bacterin 접종군에 비해 항체형성이 낮았으며, 균체항원에 OMP 100-200 µg 첨가에 의한 항체상승효과 또한 미약한 것으로 보고한 바 있다. 본 시험의 기니아피에 대한 항체형성능 조사에서 cOMP혼합백신은 ST 균체 및 ST OMP백신그룹보다 높은 항체를 장기간 유지하는 것으로서 상반된 결과를 나타내었다. 이는 검사방법의 차이, 즉 전자의 균체항원에 의한 응집반응 역가에 비해, 본 시험은 각 균종별 LPS를 이용한 ELISA법에 의한 항체가로서 항체검출법의 차이로 볼 수 있으나, 닭에 대한 Meenakshi 등 [26]의 SE OMP백신이 SE균체백신보다 ELISA에 의한 높은 항체가 형성을 보고한 결과와 유사한 결과이며, 한편으로는 cOMP항원은 항체형성에 필요한 충분한 양의 LPS항원을 포함하고 있으며, LPS항원은 면역반응 및

방어효과에도 기여하는 것으로 예측되는 집이다.

적용대상동물인 자돈에 대한 방어효과시험에서 cOMP 혼합백신은 대조군에 비해 뚜렷한 임상증상 개선이나 균 배출 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 즉 백신접종군은 균 공격접종에서 경미한 설사를 보인 반면, 비접종 대조군에서는 6두 중 4두에서 3-10일간 심한 설사와 식욕결핍, 허약 등의 임상적 차이로서 백신의 효과를 확인할 수 있었다. 또한 분변을 통한 균배출 시험에서도 백신접종그룹은 6두 중 1두에서 균이 분리된 반면, 비접종 대조군은 6두 중 5두에서 균접종 2주까지 계속 균을 배출하는 것으로 나타내어 균배출에 의한 질병전파를 예방할 것으로 판단되었다. Meenakshi 등 [26]은 SE OMP의 닭에 대한 효과시험에서 1 mg를 함유한 백신 2회 피하접종 2주 후 공격접종시 분변으로 균이 전혀 배출되지 않았으며, 단지 0.5 mg 접종군의 몇 마리에서 균이 분리된 것으로 보고한 바 있어 축종은 다르지만 유사한 결과로 볼 수 있으며, 게다가 시험종료일인 균접종 14일 후, 간 등의 실질장기별 균 회수시험결과 백신 접종군은 장간막인파절 1두를 제외하고 균이 분리되지 않아, 대조군의 모든 장기에서 접종한 3종 살모넬라균 모두 분리된 데에 비해 큰 차이로서 방어효과를 확인되었다. 이는 향후 이 백신이 살모넬라균에 오염된 농장에 적용되는 경우 질병발생에 의한 농가의 피해 뿐만 아니라 사람의 식육독의 주요 원인균인 살모넬라균의 식육 오염을 줄이고 안전축산물생산에도 기여할 것으로 보인다.

또한 격접종후 1주 및 2주 후의 체중증체량(kg)에서 백신접종군은 각각  $1.16 \pm 0.26$  및  $4.76 \pm 0.78$ 으로서 비접종대조군의  $1.15 \pm 1.15$  및  $4.51 \pm 0.31$ 과 차이를 보이지 않았으며, 체온상승이나 접종부위 부작용이 관찰되지 않은 것으로 보아 안전성에 별문제가 없음을 알 수 있었으며, 반면에 공격접종 대조군은 체중이 크게 감소하여 1주 및 2주의 경우, 각각  $-1.59 \pm 1.84$  및  $-0.45 \pm 4.41$ 으로서 통계적으로 유의한 차이로서( $p < 0.05$ ) 백신접종군의 증체효과를 확인할 수 있었다.

닭이나 칠면조 등 조류를 대상으로한 살모넬라 OMP 백신의 방제효과시험은 많은 연구자들에 의해 수행된 바 있으며, 그 효과 또한 입증되고 있다 [3, 9, 10, 26]. 본시험의 OMP 혼합백신의 살모넬라균혼합감염에 대한 닭에서의 방어능시험에서, 4주령의 닭에 0.5 ml 및 1 ml 씩 2회 근육접종하고 2주후 3종의 살모넬라균을 공격접종한 결과 대조군은 100% 폐사한 반면, 백신접종군은 100% 생존율을 나타내어 뛰어난 방어효과를 확인할 수 있었다. 또한 cOMP 혼합백신은 가급티푸스 원인균인 SG의 공격접종한 시험에서도 백신접종군(1 ml 접종)은 80%의 방어율을 보여 대조군의 10%에 비해 상당한 수준의 교차방어능을 가지고 있었다. 이는 균종이 다른

gram-negative bacteria의 OMP 상호간에도 교차면역반응이 보고되고 있음으로 [3, 15, 36], 공격접종한 SG는 시험백신에 함유된 SE와는 그룹 D로서 균체항원구조가 동일하고, ST와도 일부 공통항원을 가지고 있음으로 [3, 19], 교차방어가 충분히 예견되는 부분으로서, 최근 일령에 관계없이 감염되어 높은 폐사발생으로 국내 양계 산업에 큰 피해를 주고 있는 가급티푸스를 예방하는데도 활용이 가능할 것으로 보인다. 따라서 이러한 시험결과를 근거로 cOMP 혼합백신은 다양한 혈청형에 감염되는 동물의 살모넬라감염증을 효과적으로 방제하고, 식육의 살모넬라균 오염을 감소시킴으로서 사람의 식육독 예방에도 기여할 것으로 사료된다.

## 결 론

다양한 혈청형의 균종에 의해 감염되는 가축의 살모넬라감염증을 효과적으로 예방하기 위하여 주요 그룹 살모넬라균의 세포외막단백질을 항원으로 이용한 mix-cOMP 백신의 동물에 대한 방어효능 시험결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. Mix-cOMP 백신은 실험동물인 마우스 및 기니아피에서 ST균체 및 ST-OMP백신그룹보다 높은 항체가를 나타내었으며, 2차 접종 후 6주까지 계속 상승된 후 8-10주까지 비교적 높은 항체가를 유지하였다.
2. 마우스에서의 균 공격접종에 대한 방어효과시험에서 mix-cOMP백신은 대조군의 0-20%에 비해 3종 살모넬라균에 대해 모두 100%의 방어효과를 나타내었다.
3. 마우스에서의 항원농도별 방어효과시험에서 수당 mix-cOMP 6.25~50 µg 접종시, ST 및 SE의 경우 100%의 방어효과를, SB의 경우는 60-90%의 방어효과를 나타내었다.
4. Mix-cOMP백신의 돼지에서의 방어효과시험에서 백신접종군은 균 공격접종 후 분변배출시험에서 6두 중 1두에서 균이 분리된 반면, 비접종 대조군은 6두 중 5두에서 균 접종 2주까지 분리되어 균 배출 억제효과를 확인할 수 있었다.
5. 돼지에 대한 균 공격접종 1주 및 2주 후의 체중증체량(kg) 측정에서 백신접종군은 각각  $1.16 \pm 0.26$  및  $4.76 \pm 0.78$ 으로서, 비접종대조군의  $1.15 \pm 1.15$  및  $4.51 \pm 0.31$ 과 차이를 보이지 않은 반면, 공격접종 대조군의  $-1.59 \pm 1.84$  및  $-0.45 \pm 4.41$ 과는 통계적으로 유의한 차이로서( $p < 0.05$ ) 증체효과를 확인할 수 있었다.
6. 시험백신의 닭에 대한 방어효과시험에서 mix-cOMP 백신을 0.5 ml 및 1 ml 2주 간격 2회 근육접종하고, 3종의 살모넬라균을 공격접종한 결과 대조군은 100% 폐사한 반면, 백신접종군은 100%의 생존율을 나타내었다.

7. Mix-cOMP백신은 가금티푸스 원인균인 SG의 공격 집중시험에서도 백신집중균(1 ml 집중)은 80%의 방어율을 보여, 대조균의 10%에 비해 상당한 수준의 교차방어능을 확인할 수 있었다.

### 참고문헌

- 강승원, 이영주, 김애란, 장환, 권용국, 김재홍. 국내 양계유래 살모넬라의 발생실태 조사 및 백신개발. 2004년도 연구보고서. pp. 748-761, 국립수의과학검역원, 안양, 2004.
- 식품의약품안전청. 축산용 항생제 관리시스템 구축. 2006년도 연구결과보고서. pp. 19-93, 식품의약품안전청, 서울, 2006.
- 이희수, 김순재, 김기석, 모인필, 우용구, 권용국, 김태중. *Salmonella gallinarum* 분리주로부터 추출한 세포외막단백질의 닭에 대한 면역원성. 대한수의학회지 1997, **37**, 555-568.
- 이희수, 임숙경, 우승룡, 이유영, 김종엽, 주이석, 김종만. Mix LPS-ELISA법을 이용한 살 모넬라균 복합 감염항체 동시 모니터링. 대한수의학회지 1998, **38**, 793-802.
- 이희수, 임숙경, 조윤상, 강현미, 김종완, 임춘태, 김재학, 김종만, 주이석. 가축유래 장출혈성대장균 분포 조사 및 돼지 살모넬라균 방제에 관한 연구. 2004년도 연구보고서. pp. 543-585, 국립수의과학검역원, 안양, 2004.
- Arockiasamy A, Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. Anal Biochem 2000, **283**, 64-70.
- Bagchi AK, Sinha AK. Role of 57 kDa major antigenic component of *Shigella dysenteriae* outer membrane proteins in induction of major histocompatibility complex II-restricted T-cell response. Arch Med Res 2004, **35**, 427-434.
- Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup FM. Characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. J Clin Microbiol 2000, **38**, 1581-1586.
- Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Kabbaj FZ, Newman JA, Pomeroy BS. Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens. Avian Dis 1989, **33**, 385-391.
- Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Newman JA, Pomeroy BS. Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. Avian Dis 1987, **31**, 699-704.
- Buchmeier NA, Heffron F. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. Infect Immun 1989, **57**, 1-7.
- Charles SD, Hussain I, Choi CU, Nagaraja KV, Sivanandan V. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella enteritidis* infection in turkeys. Am J Vet Res 1994, **55**, 636-642.
- Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. In: Gyles CL, Thoen CO (eds.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2nd ed. pp. 199-153, Iowa State University Press, Ames, 1993.
- Clifton-Hadley FA, Breslin M, Venables LM, Spriggs 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.
- Cloekaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin Diagn Lab Immunol 1999, **6**, 627-629.
- Collins FM, Campbell SG. Immunity to intracellular bacteria. Vet Immunol Immunopathol 1982, **3**, 5-66.
- Collins FM, Mackaness GB, Blanden RV. Infection-immunity in experimental salmonellosis. J Exp Med 1966, **124**, 601-619.
- Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE. Further studies of the application of live *Salmonella enteritidis* aroA vaccines in chickens. Vet Rec 1993, **133**, 31-36.
- Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. pp. 247-318, Elsevier Science Publishing, New York, 1986.
- Foulaki K, Gruber W, Schlecht S. Isolation and immunological characterization of a 55-kilodalton surface protein from *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 1989, **57**, 1399-1404.
- Garmory HS, Brown KA, Titball RW. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. FEMS Microbiol Rev 2002, **26**, 339-353.
- Gilleland HE Jr, Parker MG, Matthews JM, Berg RD. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective



- vaccine in mice. Infect Immun 1984, **44**, 49-54.
23. **Hsu HS.** Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. Microbiol Rev 1989, **53**, 390-409.
  24. **Lillehoj HS.** Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. In: Sharma JM (ed.). Avian Cellular Immunology. pp. 155-181, CRC Press, Boca Raton, 1991.
  25. **Lumsden JS, Wilkie BN, Clarke RC.** Resistance to fecal shedding of salmonellae in pigs and chickens vaccinated with an aromatic-dependent mutant of *Salmonella typhimurium*. Am J Vet Res 1991, **52**, 1784-1787.
  26. **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.
  27. **Mousing J, Jensen PT, Halgaard C, Bager F, Feld N, Nielsen B, Nielsen JP, Bech-Nielsen S.** Nationwide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. Prev Vet Med 1997, **29**, 247-261.
  28. **Nassar TJ, al-Nakhli HM, al-Ogaily ZH.** Use of live and inactivated *Salmonella enteritidis* phage type 4 vaccines to immunise laying hens against experimental infection. Rev Sci Tech 1994, **13**, 855-867.
  29. **Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P.** The serological response to *Salmonella serovars typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. Vet Microbiol 1995, **47**, 205-218.
  30. **Rapp VJ, Munson RS Jr, Ross RF.** Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Infect Immun 1986, **52**, 414-420.
  31. **Robertsson JA, Svenson SB, Renstrom LH, Lindberg AA.** Defined *salmonella* antigens for detection of cellular and humoral immune responses in *salmonella* infected calves. Res Vet Sci 1982, **33**, 221-227.
  32. **Saxena S, Aggarwal A, Misra R.** Outer membrane protein of *Salmonella* is the major antigenic target in patients with *Salmonella* induced reactive arthritis. J Rheumatol 2005, **32**, 86-92.
  33. **Sjostedt A, Sandstrom G, Tarnvik A.** Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 1992, **60**, 2855-2862.
  34. **Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ.** Diseases of Swine. 8th ed. pp. 535-551, Iowa State University Press, Ames, 1999.
  35. **Udhayakumar V, Muthukkaruppan VR.** Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect Immun 1987, **55**, 816-821.
  36. **Xu C, Wang S, Zhaoxia Z, Peng X.** Immunogenic cross-reaction among outer membrane proteins of Gram-negative bacteria. Int Immunopharmacol 2005, **5**, 1151-1163.