

<원 저>

Salmonella enterica serovars Enteritidis, Gallinarum 및 Typhimurium의 마우스 면역반응의 비교평가

김기주^{1,†} · 김두리^{1,†} · 선지선¹ · 박소연¹ · 조영재¹ · 고현정² · 주흥구³ · 한태욱^{1,*}

¹강원대학교 수의과대학 및 동물의학중합연구소, ²강원대학교 약학대학,
³제주대학교 수의과대학

(접수: 2013년 2월 28일, 수정: 2013년 5월 10일, 게재승인: 2013년 5월 15일)

Comparative evaluation of the murine immune responses to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Gallinarum and Typhimurium infection

Kiju Kim^{1,†}, Dooree Kim^{1,†}, Jisun Sun¹, Soyeon Park¹, Youngjae Cho¹, Hyun-Jeong Ko²,
Hong-Gu Joo³, Tae-Wook Hahn^{1,*}

Colleges of ¹Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science and

²Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

(Received: February 28, 2013; Revised: May 10, 2013; Accepted: May 15, 2013)

Abstract : The study was carried out to evaluate and compare the immune responses in mice experimentally infected with either wild-type or isogenic mutants of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis (SE), *Salmonella* Typhimurium (ST) and Gallinarum (SG). The mutant strains were constructed by allelic replacement of some virulence-associated genes in the wild-type strains. Seven-week-old female BALB/c mice were orally or intraperitoneally inoculated by injecting bacterial suspension. To evaluate the immune responses, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay were conducted with serum and fecal samples. As a result, the mice group infected orally with the SE mutant strain showed the highest level of specific IgA-secreting splenocytes, compared to the other groups. The peritoneally injected groups showed the greater levels of IgG1 than the orally injected groups, which was in a good agreement with the previous studies. In addition, the mutant infected groups had the similar secretion levels of antibodies with the wild-type infected groups. These results demonstrated that the SE mutant strain elicited humoral immune response as much as wild-type, implying that it can be useful as a delivery vehicle as well as a candidate of a live attenuated vaccine.

Keywords : humoral immunity, mucosal immunity, *Salmonella*

서 론

Salmonellosis는 많은 나라의 공중위생에 있어 중요한 식품매개질병으로 오염된 음식과 물의 섭취에 의해 빈번히 발생되고 있다. 특히 선진국에서는 이 질병으로 인한 식중독의 발생으로 인해 경제적 손실이 상당하다 [15, 20]. *Salmonella* (*S.*) *enterica*는 약 2,500여 가지 이상의 혈청형으로 분류되며, 각각 다른 종류의 숙주범위를 지니고 있다 [1]. 이들 각 혈청형은 숙주의 감수성 차이에 따라 불현성 증상에서부터 중증의 전신성 패혈증을 유발할 수 있다 [8, 23]. 이처럼 다

양한 살모넬라 혈청형 중 최근 축산식품을 통해 사람의 식중독을 가장 빈번하게 일으키는 살모넬라 혈청형으로는 *S. enterica* serovars Enteritidis(SE)와 *S. Typhimurium*(ST)을 들 수 있다 [16]. 이 중 SE는 사람을 비롯해 마우스, 조류 등 다양한 숙주 영역을 지니고 있으며, 특히 조류의 난소에 존재하며 계란을 통해 사람에게 감염되어 식중독을 유발한다. 이와는 달리 *S. Gallinarum*(SG)은 조류에만 감염되며, 닭에서 심한 전신성 패혈증을 동반한 가금티푸스(fowl typhoid)를 일으켜 높은 폐사율을 초래한다 [1].

이와 같이 살모넬라로 인해 발생하는 질병을 예방하기 위

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-244-2367

E-mail: twhahn@kangwon.ac.kr

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

해 약독화된 살모넬라 변이주의 제작이 진행되어 왔으며, 이렇게 약독화된 살모넬라 변이주는 바이러스 혹은 다른 세균과 같은 병원체의 항원을 전달하는 이중항원의 운반체(vector)로서 이용될 수 있다 [9, 13]. 살모넬라를 벡터로 이용할 경우 살모넬라가 운반하는 이중항원 유전자가 발현되어 이에 대한 면역반응을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 살모넬라 자체의 항원에 대한 면역반응도 유도할 수 있다 [9, 13]. 이러한 약독화된 살모넬라 변이주는 점막면역 및 세포매개성 면역반응을 유발하는 장점이 있는 것으로 알려지고 있다 [10, 17, 19]. 또한 살모넬라 혈청형에 따라 면역을 유도하는 수준이 다른 것으로 나타났다. 예를 들어 ST는 *S. Typhi*보다 강하고 견고한 장관 내 집락 형성으로 인해 점막면역을 훨씬 더 강하게 유도하는 것으로 알려져 있다 [7, 12].

따라서 본 연구에서는 효과적인 점막면역을 유도하는 살모넬라 혈청형을 선발하기 위해 병원성 SE, SG 및 ST와 각각의 약독화 변이주를 대상으로 마우스에서의 면역유도 효과를 비교하였다. 이 실험을 통해 선발된 가장 우수한 면역유도를 일으키는 살모넬라 혈청형은 향후 이중항원 운반체로 최적화시켜 점막, 세포매개성 및 체액성 면역반응 유도를 위한 살모넬라 운반체로 사용하거나 신규 약독화 생균 백신의 후보로 이용할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 실험실에서 보관중인 SE 야생분리주(wild-type) B01M106과 SE 변이주 B01M021(Δ *aroA*)을 사용하였으며, SG 야생분리주 B01M105와 SG 변이주 B01M085(Δ *ssrAB* Δ *hmp* Δ *rpoS* Δ *ppk* Δ *aroA*)를 사용하였다. 그리고 ST 야생분리주 B01M101과 ST 변이주 B01M080(Δ *ssrAB* Δ *hmp* Δ *rpoS* Δ *ppk* Δ *aroA*)를 사용하였다(Table 1). 각각의 변이주는 이전의 연구에서 보고된 phage λ red recombinase system을 이용하여 제작하였으며 [3], 제거된 유전자의 세포 내 역할은 다음과 같다. *ssrAB*(SPI-2의 여러

operon의 발현 조절), *hmp*(NO로부터 organism 보호), *rpoS*(세포 밀도 조절), *ppk*(Poly P의 생합성 조절), *aroA*(미생물 세포의 적응).

실험동물 및 접종방법

실험동물은 7주령의 BALB/c 암컷 마우스(Narabiotech, Korea)를 이용하였다. 모든 마우스는 IVC Rack(MVCS; Threeshine, Korea)에서 사육하였으며, 실험동물의 윤리적 사용을 위해 3R원칙에 따라 동물실험을 수행하였다. 또한, 모든 실험은 국립강원대학교의 동물실험윤리위원회 규정하에서 국내법에 따라 실시하였다(허가번호 KW-121120-1). 한 군당 5마리의 마우스를 사용하였으며 SE, SG 및 ST 각각의 야생분리주와 변이주를 복강 혹은 경구로 접종한 12군의 실험군과, 생리식염수(PBS)를 복강으로 투여한 대조군을 포함하여 총 13군으로 실험을 실시하였다.

각 군의 접종경로와 접종량은 Table 2와 같다. 야생분리주와 변이주의 접종량, 경구 투여량과 복강 접종량은 예비실험을 통해 마우스가 폐사되지 않는 범위로 맞추어 결정하였으며 동일비교대상 조건 하에서는 살모넬라 균주별 접종량은 동일하게 맞추었다. 접종 4시간 전부터는 급수와 급식을 중단하였다. 복강 투여는 마우스 1마리당 PBS에 희석한 접종액 100 μ L를 1 mL 주사기로 접종하였고, 경구투여는 마우스 1마리당 PBS로 희석한 균액 100 μ L를 zonde를 이용하여 투여하였다. 대조군은 PBS 100 μ L만을 투여하였다.

시료의 채취

접종 후 8, 14, 21일에 각각의 마우스 혈청과 분변을 채취하였다. 혈청의 경우 모세관틀 이용하여 마우스 개체마다 약 300~500 μ L의 혈액을 안와 채혈 한 후, microcentrifuge tube에 담았다. 혈액을 응고시킨 후 12,000 \times g로 10분간 원심분리하였고, 상층액인 혈청을 분리하여 -70° C에 보관한 후 향후 실험에 사용하였다.

분변의 경우 마우스 개체당 분변을 2~3개(1개당 약 0.04 g) 정도 tube에 담은 후 분변 시료가 50 mg/PBS 1 mL이 되도록

Table 1. *Salmonella* (*S.*) strains used in this study

Strain	Relevant characteristic(s)	Resistance	Remarks
<i>S. Enteritidis</i>			
B01M106	Wild-type	Nalidixic acid	Isolate from chicken cecal contents
B01M021	Δ <i>aroA</i>	-	Isogenic mutant of B01M106
<i>S. Gallinarum</i>			
B01M105	Wild-type	Nalidixic acid	Isolate from chicken cecal contents
B01M085	Δ <i>ssrAB</i> Δ <i>hmp</i> Δ <i>rpoS</i> Δ <i>ppk</i> Δ <i>aroA</i>	Kanamycin	Isogenic mutant of B01M105
<i>S. Typhimurium</i>			
B01M101	Wild-type	Nalidixic acid	Isolate from chicken cecal contents
B01M080	Δ <i>ssrAB</i> Δ <i>hmp</i> Δ <i>rpoS</i> Δ <i>ppk</i> Δ <i>aroA</i>	Kanamycin	Isogenic mutant of B01M101

ssrAB: Transcription factors of SPI-2, *hmp*: Flavohemoprotein, *rpoS*: RNA polymerase sigma factor, *ppk*: Polyphosphate kinase, *aroA*: Aromatic amino acid.

Table 2. Route and inoculation amount (colony forming unit, CFU) of *Salmonella* serovars

Strain type		Route	Inoculation amount (CFU)	Survivor rate (%)
S. Enteritidis	W	IP	10	0/5 (0)
		PO	10 ²	4/5 (80)
	M	IP	10 ²	5/5 (100)
		PO	10 ⁹	5/5 (100)
S. Gallinarum	W	IP	10	5/5 (100)
		PO	10 ²	4/5 (80)
	M	IP	10 ²	5/5 (100)
		PO	10 ⁹	5/5 (100)
S. Typhimurium	W	IP	10	5/5 (100)
		PO	10 ²	5/5 (100)
	M	IP	10 ²	5/5 (100)
		PO	10 ⁹	5/5 (100)
Control				6/6 (100)

W: wild-type, M: mutant, IP: Intra-peritoneal, PO: Per oral.

록 PBS를 첨가한 후 하루 동안 정치하였다. 분변 시료가 균질화 될 때까지 15분 이상 강하게 vortex하여 12,000 × g로 5분간 원심분리하였고, 상층액을 분리하여 -70°C에 보관한 후 향후 실험에 사용하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

실험에 이용한 살모넬라 균주의 체액성 면역 및 점막면역 유도 효과를 비교하기 위하여 indirect ELISA를 실시하였다. ELISA에 이용된 항원은 접종에 사용했던 각각의 살모넬라 혈청형에 대한 야생분리주의 세포외막 단백질(outer membrane protein: OMP)을 추출하여 이용하였다. MaxiSorp 96well plate(Nunc, Denmark)에 OMP를 0.05 M sodium bicarbonate buffer(pH 9.4)에 희석하여 각 well당 0.3 µg/100 µL씩 분주한 뒤 4°C에서 16~24시간 동안 코팅한 후, TPBS(0.05% Tween 20/PBS)로 3번 세척하였다. PBS에 1% bovine serum albumin(BSA)를 희석(BSA/PBS)하여 각각의 well에 분주한 후 37°C에서 2시간 동안 blocking하고 TPBS로 3번 세척하였다. 마우스 혈청 및 분변 시료를 0.1% BSA/PBS로 계단 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응한 뒤 TPBS로 3번 세척하였다. 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG1 horseradish peroxidase(HRP, Fitzgerald, USA)와 goat anti-mouse IgA HRP(Fitzgerald)를 각각 사용하여 100 µL/well씩 첨가하여, 4°C에서 16~24시간 동안 반응시켰다. 기질로는 tetramethyl-benzidine(TMB, Surmodics, USA)을 100 µL/well씩 첨가하여 실온에서 암반응 후, 2N H₂SO₄로 100 µL/well씩 첨가하여 반응을 중단하였다. 450 nm 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였으며, 양성판정에 대한 기준은 MaxiSorp 96well plate의 blank에 대한 OD₄₅₀ 평균값의 3배보다 큰 값을 역가로 산출하였다 [2, 11, 18].

Enzyme-linked immunospot assay(ELISPOT assay)

살모넬라를 접종한 마우스의 B 림프구에서 분비되는 IgA를 측정하기 위하여 접종 4주 후 마우스를 도태시킨 후 비장세포를 분리하였다. 비장세포로부터 분비되는 살모넬라 specific IgA 측정을 위해 마우스 IgA ELISPOT Plus kit (MABTECH, Sweden)를 사용하였다. ELISPOT plate에 PBS로 희석한 살모넬라를 16시간 동안 4~8°C에서 코팅하고 PBS로 세척한 후, complete medium [10% antibacterial antibiotic과 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 RPMI 1640(Sigma, USA)]을 200 µL/well씩 첨가하여 30분 동안 실온에서 blocking하였다. 100,000~500,000 cells/well이 되도록 비장세포를 각 well에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 16~24시간 동안 배양하였다. PBS로 각 well을 세척하여 세포를 제거하고 detection antibody(anti-IgA-biotin)를 0.5% FBS/PBS에 1 µL/mL로 희석하여 100 µL/well씩 분주한 후, 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.5% FBS/PBS에 1:1000으로 희석한 streptavidin-HRP를 100 µL/well씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Ready-to-use TMB substrate solution을 100 µL/well씩 분주하여 spot이 뚜렷이 나타날 때까지 10~30분 동안 전개시키고 세척한 후, 충분히 건조하여 ELISPOT reader(Aelvis, Germany)로 spot을 측정하였다.

통계분석

통계적 해석은 one way ANOVA를 이용하였으며, ELISA와 ELISPOT 결과는 *p* value < 0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 유의성이 인정되는 경우, Tukey의 다중 비교검정과 Dunnett의 다중비교검정을 추가적으로 실시하여 군간의 차이를 비교하였다 [6].

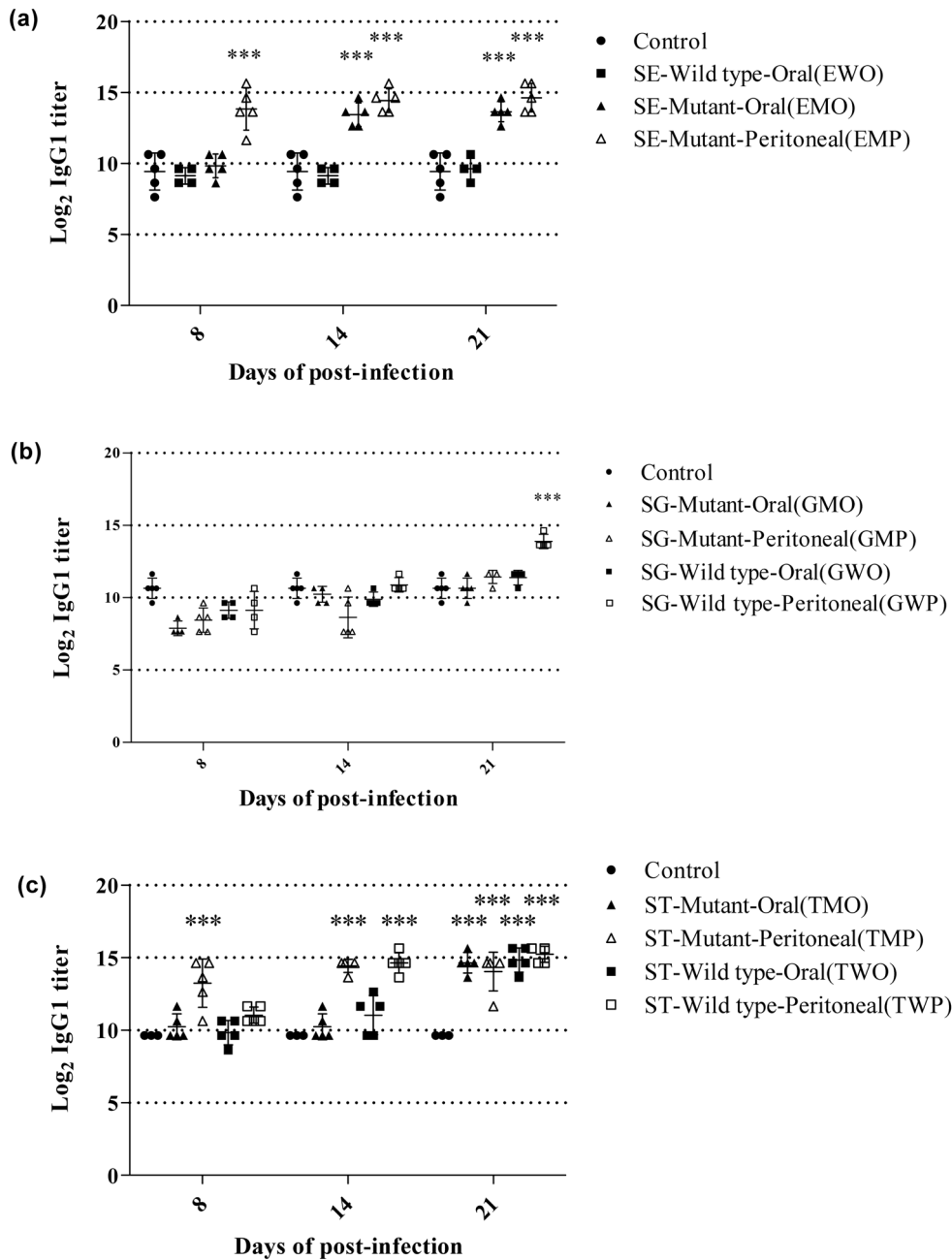


Fig. 1. IgG1 antibody titer of serum. (a) *S. Enteritidis*, (b) *S. Gallinarum*, (C) *S. Typhimurium*. Asterisks (***) indicate a *p* value of < 0.001.

결 과

마우스에서의 IgG1 항체가 조사

SE, SG 및 ST의 OMP를 추출하여 ELISA항원으로 사용하여 각각의 혈청형에 대해 특이적인 IgG1, IgG2 및 IgA의 항체가를 측정하였다.

Fig. 1은 SE, SG 및 ST의 야생분리주와 변이주를 경구와 복강으로 접종한 후 8, 14, 21일에 IgG1을 조사한 결과이다. SE 접종군의 경우, 야생분리주를 복강으로 접종한 군이 8일

이전에 모두 폐사하여 역가를 측정할 수 없었다. 그러나 SE 변이주를 복강으로 접종한 군은 8일째부터, 경구로 접종한 군은 14일째부터 대조군에 비해 약 1.4-1.6배 높은 역가를 나타내며 유의성 있는 차이를 보였다(Fig. 1a). SG 접종군은 대부분 대조군과 비슷한 수준의 역가를 보였지만, 야생분리주를 복강으로 접종한 후 21일째에 관찰한 경우, 대조군에 비해 약 1.3배 높은 유의적인 증가를 보였다(Fig. 1b). ST 접종군은 변이주를 복강으로 접종한 군에서 IgG1의 증가가 가장 먼저 관찰되었고, 접종 14일째에는 야생분리주를 복강

으로 접종한 군에서도 IgG1의 증가를 보였다. 접종 21일째에는 야생분리주와 변이주 모두 접종 경로와 무관하게 비슷한 수준의 IgG1 역가를 나타냈으며, 대조군에 비해 약 1.5~1.6배 높은 유의성 있는 차이를 보였다(Fig. 1c).

상기의 결과를 요약하여, 접종 21일째에 살모넬라 변이주에 대한 접종 경로별 IgG1 역가의 차이를 비교하였다(Fig. 2). SG 변이주는 접종경로와 무관하게 대조군에 비해 별 다른 차이를 보이지 않았으나, SE 및 ST 변이주는 경구 및 복강접종 모두 대조군에 비해 약 1.3~1.4배 높은 역가를 나타냈다.

마우스에서의 IgA 항체가 조사

접종군의 혈청 내 IgA 수준을 비교하기 위해 살모넬라 OMP항원에 특이적인 ELISA를 실시하여 양성반응을 측정하였다(Table 3). SE 접종군은 변이주가 접종경로와 무관하게 접종 후 8, 14, 21일째 모두 양성반응을 나타냈으며 높은

수준의 역가를 보였다. 이는 야생분리주를 경구로 접종한 결과와 비교했을 때 8일째 하나의 치료만이 양성 반응을 나타낸 것과 대조적이다. SG 접종군은 IgG1의 결과와 유사하게, 야생분리주를 복강으로 접종한 군을 제외한 대부분의 군에서 매우 낮은 수준의 역가를 나타내었다. ST 접종군은 야생분리주를 경구로 접종한 군과 변이주를 복강으로 접종한 군에서 양성반응을 나타냈다. 또한 접종 21일째에는 SE, SG 및 ST 변이주 접종군 모두 양성반응을 나타냈으며 비교적 높은 수준의 역가를 보였다. 이에 반해 대조군은 측정 전 기간 동안 매우 낮은 수준의 역가를 보였다. 이들 중에서 가장 높은 역가를 나타낸 군은 SE 변이주를 경구로 접종한 군이었으며, 복강으로 접종한 군도 유사한 수준의 역가를 나타냈다. 다음으로 ST 변이주를 복강으로 접종한 군과 SG 야생분리주를 복강으로 접종한 군이 높은 역가를 나타내었다.

한편 혈청 내 IgG2의 수준과 장내 점막에서 분비하는 IgA 수준을 비교하기 위해 각각의 혈청과 분변 시료를 대상으로 ELISA를 실시하였지만 어떠한 군에서도 양성반응이 나타나지 않았고, 역가 또한 산출할 수 없었다.

살모넬라 특이 IgA 분비 비장 세포 수 측정

접종 4주 후 분리한 비장으로부터 비장세포를 추출하여 이들 중 살모넬라 특이 IgA를 분비하는 세포 수를 ELISPOT assay를 사용하여 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 spot 수의 평균에 있어 SE 변이주를 경구로 접종한 군에서 가장 높은 값을 나타내며 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 이는 대조군에 비해 8배 이상 증가된 수치이며, 아울러 혈청 내에서 SE 변이주를 경구로 접종한 군에서의 IgA 역가 수준을 비교한

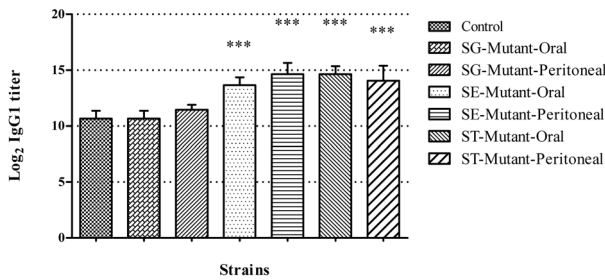


Fig. 2. IgG1 titer of serum after 21 days. Asterisks (***) indicate a *p* value of < 0.001.

Table 3. Serum IgA titer to different *Salmonella* serovars (ELISA)

Strain	Route	Days of post-infection						
		8		14		21		
		Positive / total	Log ₂ titer Mean ± S.D	Positive / total	Log ₂ titer Mean ± S.D	Positive / total	Log ₂ titer Mean ± S.D	
SE	W	IP	ND	ND	ND	ND	ND	
		PO	1/4	4.9 ± 0.0	0/4	< 4.9	0/4	< 4.9
	M	IP	2/5	5.4 ± 0.7	2/5	5.9 ± 0.0	4/5	6.7 ± 1.3
		PO	5/5	5.3 ± 0.6	3/5	6.2 ± 0.6	5/5	6.9 ± 0.0
SG	W	IP	4/5	4.9 ± 0.0	4/5	5.9 ± 0.0	5/5	6.1 ± 1.3
		PO	0/4	< 4.9	0/4	< 4.9	0/4	< 4.9
	M	IP	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	4/5	5.4 ± 0.6
		PO	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	3/5	5.6 ± 0.6
ST	W	IP	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	1/5	4.9 ± 0.0
		PO	3/5	5.2 ± 0.6	4/5	5.4 ± 0.6	3/5	5.6 ± 0.6
	M	IP	5/5	5.3 ± 0.6	4/5	6.2 ± 1.0	5/5	6.3 ± 0.6
		PO	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	3/5	5.6 ± 1.2
Control		0/6	< 4.9	0/6	< 4.9	0/6	< 4.9	

SE: *S. Enteritidis*, ST: *S. Typhimurium*, SG: *S. Gallinarum*, ND: not done, W: wild type, M: mutant, IP: intraperitoneal, PO: per oral.

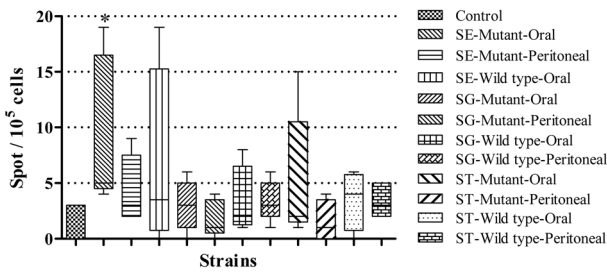


Fig. 3. Measurement of *Salmonella* specific-IgA secreting splenocyte levels against after 4 weeks of infection. The number of splenocyte was measured by ELISPOT. Compared with the other strain, SE mutant strain elicits the highest level of IgA secreting splenocyte. Data are expressed as median, interquartile range and range of values. Asterisks (*) indicate a p value of < 0.05 .

결과와 일치한다(data not shown). 다른 군에서는 spot 수의 평균값이 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으나, SE 야생분리주를 경구로 접종한 군에서 spot의 수가 최대값을 나타내는 시료가 있었다(19 spot/10⁵ cells). 또한 ST 변이주를 경구로 접종한 군에서 역시 비교적 많은 spot이 나타나는 시료(15 spot/10⁵ cells)가 관찰되었으나, 평균값(5.2 spot/10⁵ cells)은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

고 찰

본 연구는 살모넬라 균주를 이용하여 점막면역 유도를 위한 이중항원 전달 운반체로 사용하고자 세가지 혈청형의 살모넬라를 야생분리주 및 각각의 변이주를 마우스의 경구와 복강으로 접종한 후 일정한 간격으로 채혈하여 혈청 또는 분변 내 IgG1 및 IgA의 면역반응을 측정하였다.

일반적으로 점막면역은 숙주에 병원체가 침투되었을 때의 일차 방어 수단이다. 살모넬라 균주의 감염은 점막 표면에서 체액성 면역과 세포매개성 면역 반응을 모두 유도 할 수 있다 [12]. 점막에서의 면역 반응은 주로 IgA의 분비에 의해 이루어지며 이는 살모넬라에 대한 숙주의 방어 기전으로서 점막에서 분비되는 IgA의 역할에 대한 연구를 통해 알 수 있다. 본 연구에서는 SE, SG 그리고 ST의 야생분리주 및 각각의 균주에서 특정 병원성 관련 유전자를 제거한 변이주를 마우스에 경구와 복강으로 접종한 후 각각의 혈청형에 대해 특이적인 IgG1 및 IgA의 항체가를 측정하였다. 물론 이중항원을 운반하는 살모넬라는 약독화 변이주를 사용하지만 각각의 변이주의 원래 야생분리주와 같이 비교하는 것도 의미가 있다고 판단하였다. 항체가 측정 결과 마우스 혈청에서 IgG1의 유도는 SE 변이주($\Delta aroA$)를 복강으로 접종한 군이 가장 높은 수준의 면역반응을 보였다. 이는 대조군에 비해 약 1.6배 높은 역가를 보이는 유의성 있는 증가라고 할 수 있다 ($p < 0.001$). 이와는 대조적으로 SG 변이주($\Delta ssrAB\Delta hmp\Delta rpoS\Delta appk\Delta aroA$)는 접종 경로와 상관없이 대조군에 비해 더 낮거나 비슷한 수준의 면역 반응을 보였으며, 야생분

리주를 복강으로 접종한 군만이 21일째에서 대조군에 비해 약 1.3배 높은 역가를 나타내며 유의성 있는 차이를 보였다 ($p < 0.001$). 그리고 ST 변이주($\Delta ssrAB\Delta hmp\Delta rpoS\Delta appk\Delta aroA$)는 복강으로 접종한 군이 1주 만에 대조군에 비해 약 1.4배의 비교적 높은 수준의 면역 반응을 보였으나, 3주째에는 접종경로와 상관없이 야생분리주와 변이주 모두 대조군에 비해 약 1.6배 높은 역가를 나타내며 비슷한 수준의 면역 반응을 유도하였다($p < 0.001$). Dunstan SJ 등 [4]에서 ST $\Delta aroA$ 변이주는 마우스의 면역반응을 유도하여 효과적인 백신 운반체로 사용할 수 있으며, IgG2a에 비해 IgG1의 역가가 더 높게 측정되었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 변이주 작성에 따른 차이도 있지만, ELISA에 이용된 각각의 살모넬라 혈청형에 대한 변이주의 OMP가 아닌 야생분리주의 OMP를 항원으로 사용하였기 때문에 미묘한 차이가 생길 수 있다고 판단된다. 한편, 접종 경로에 따른 IgG1 면역 반응의 차이를 보면 복강으로 접종한 군은 접종 1주 만에 IgG1의 증가가 관찰되는 반면, 경구로 접종한 군에서는 접종 2주째부터 IgG1의 증가가 관찰되었다. 이는 복강 접종이 경구 접종보다 더 빠르게 면역세포를 자극시켜 빠르고 높은 수준의 면역 반응을 유도하기 때문이라 사료된다.

마우스 혈청에서 IgA 수준은 IgG1과 유사하게, SE 및 ST 변이주 접종군이 야생분리주 접종군보다 비슷하거나 혹은 더 높은 수준의 면역반응을 보였다. IgG1의 경우, 접종 후 1~2주 뒤에 모든 개체에서 항체가의 증가를 보이는 반면, IgA는 접종 후 14일 미만에선 비교적 낮은 양성률을 보였으며, 접종 3주 후에야 양성률이 증가하였는데 이는 IgG1의 반응이 IgA보다 빠르게 나타나기 때문이다 [22].

IgA를 분비하는 B림프구의 수를 측정하기 위한 ELISPOT assay 역시 SE 변이주를 경구로 접종한 군에서 가장 높은 수준의 값인 19 spot/10⁵ cells을 나타내었다($p < 0.05$). Strindelius 등 [21]은 경구 백신을 마우스에게 접종하여 36일 후 분리한 장에서 항원 특이적 IgA를 분비하는 세포를 ELISPOT assay로 측정한 결과 1,630 spot/10⁵ cells의 매우 높은 수준으로 유도되었다고 보고하였다. 따라서 두 결과를 비교할 때, 본 연구결과에서 얻은 수치가 매우 낮은 것으로 나타났지만 동일한 조건에서 비교할 때 SE변이주가 다른 살모넬라 균주보다 다소 높은 수치를 나타냈다.

이밖에 마우스 혈청에서 IgG2의 면역반응은 측정되지 않았는데 이는 약독화된 생균 백신은 주로 IgG1과 IgA를 생성하기 때문으로 판단된다 [5, 14]. 또한 마우스 분변 내 특이적인 IgA의 항체가를 측정해 보았지만, 매우 낮은 수준의 면역반응을 보여 역가는 산출할 수 없었다. IgG2와 분변 내 분비성 IgA의 검출은 항후 보다 민감도가 높은 방법을 사용하여 추가적인 연구를 수행하여 밝힐 필요가 있다고 본다. 아울러 세포매개성 면역의 측정도 추후 검사할 필요가 있으리라 판단된다.

이 실험은 이중항원을 운반하는 운반체로 점막면역을 유도하는 살모넬라 균주를 선별하기 위해 3가지 살모넬라 혈청형 SE, SG 및 ST에 대해 경구 접종과 복강 접종을 실시

하여 IgG1과 IgA를 가장 많이 분비하는 혈청형의 변이주를 ELISA와 ELISPOT을 통해 선별하고자 한 것이다. 그 결과 SE 및 ST 변이주가 효과적인 면역반응을 유도하며, 특히 SE 변이주(Δ aroA)를 경구로 접종한 경우 IgG1과 IgA의 생성반응을 가장 잘 유도하는 것으로 나타났다.

본 연구결과를 종합하건대, 3가지 살모넬라 혈청형 중 이 중항원을 운반하는 운반체로 SE 변이주를 경구로 접종할 때 체액성 면역 및 점막면역을 가장 잘 유도하는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업에 의해 이루어진 것이며, 강원대학교 동물의학종합연구소의 기술지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Blondel CJ, Yang HJ, Castro B, Chiang S, Toro CS, Zaldívar M, Contreras I, Andrews-Polymeris HL, Santiviago CA. Contribution of the Type VI Secretion System Encoded in SPI-19 to Chicken Colonization by *Salmonella enterica* Serotypes Gallinarum and Enteritidis. PLoS One 2010, **5**, e11724.
- Chung Y, Cho J, Chang YS, Cho SH, Kang CY. Preventive and therapeutic effects of oral tolerance in a murine model of asthma. Immunobiology 2002, **206**, 408-423.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, **97**, 6640-6645.
- Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. Infect Immun 1998, **66**, 732-740.
- 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.
- Herberich E, Sikorski J, Hothorn T. A robust procedure for comparing multiple means under heteroscedasticity in unbalanced designs. PLoS One 2010, **5**, e9788.
- Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, Ghaem-Maghani M, Sexton A, Khan M, Brennan FR, Everest P, Wu T, Pickard D, Holden DW, Dougan G, Griffin GE, House D, Santangelo JD, Khan SA, Shea JE, Feldman RG, Lewis DJ. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. Infect Immun 2002, **70**, 3457-3467.
- de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. PLoS Pathog 2012, **8**, e1002933.
- Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R 3rd. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. Infect Immun 2002, **70**, 1739-1749.
- Kantele A, Arvilommi H, Iikkanen K, Savilahti E, Mäkelä HP, Herzog C, Fürer E, Kantele JM. Unique characteristics of the intestinal immune system as an inductive site after antigen reencounter. J Infect Dis 2005, **191**, 312-317.
- Ko SY, Ko HJ, Chang WS, Park SH, Kweon MN, Kang CY. α -Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. J Immunol 2005, **175**, 3309-3317.
- Kotton CN, Lankowski AJ, Scott N, Sisul D, Chen LM, Raschke K, Borders G, Boaz M, Spentzou A, Galán JE, Hohmann EL. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. Vaccine 2006, **24**, 6216-6224.
- Li Y, Wang S, Xin W, Scarpellini G, Shi Z, Gunn B, Roland KL, Curtiss R 3rd. A *sopB* deletion mutation enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines. Infect Immun 2008, **76**, 5238-5246.
- Muotiala A, Hovi M, Mäkelä PH. Protective immunity in mouse salmonellosis: comparison of smooth and rough live and killed vaccines. Microb Pathog 1989, **6**, 51-60.
- Nyeleti C, Cogan TA, Humphrey TJ. Effect of sunlight on the survival of *Salmonella* on surfaces. J Appl Microbiol 2004, **97**, 617-620.
- Piao HH, Tam VTM, Na HS, Kim HJ, Ryu PY, Kim SY, Rhee JH, Choy HE, Kim SW, Hong Y. Immunological responses induced by *asd* and *wzy/asd* mutant strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in BALB/c mice. J Microbiol 2010, **48**, 486-495.
- Salerno-Goncalves R, Pasetti MF, Sztein MB. Characterization of CD8⁺ effector T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. J Immunol 2002, **169**, 2196-2203.
- Seo KY, Han SJ, Cha HR, Seo SU, Song JH, Chung SH, Kweon MN. Eye mucosa: an efficient vaccine delivery route for inducing protective immunity. J Immunol 2010, **185**, 3610-3619.
- Shata MT, Reitz Jr MS, DeVico AL, Lewis GK, Hone DM. Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8⁺ T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* Env DNA vaccine vector. Vaccine 2002, **20**, 623-629.
- Simon R, Tennant SM, Galen JE, Levine MM. Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. Vaccine 2011, **29**, 5094-5106.
- Strindeli L, Wikingsson LD, Sjöholm I. Extracellular antigens from *Salmonella enteritidis* induce effective immune response in mice after oral vaccination. Infect Immun 2002, **70**, 1434-1442.
- Tizard IR. Veterinary immunology: an introduction. 7th ed. pp. 145-153, Saunders, Philadelphia, 2004.
- Tsolis RM, Young GM, Solnick JV, Bäumlner AJ. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. Nat Rev Microbiol 2008, **6**, 883-892.