

< Original Article >

이유자돈에서 *Salmonella* Typhimurium 감염에 대한 박테리오파지의 방어 효능

김성재¹ · 김재훈² · 전수연³ · 백형록³ · 한정희^{1*}

강원대학교 수의과대학 · 동물종합연구소¹, 씨티씨바이오(주)², 인트론바이오테크놀로지(주)³

Protective effect of bacteriophages against *Salmonella* Typhimurium infection in weaned piglets

Sung-Jae Kim¹, Jae-Hoon Kim², Soo-Yeon Jun³, Hyoung Rok Paik³, Jeong-Hee Han^{1*}

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

²CTCBIO Inc, Seoul 138-858, Korea

³Intronbiotechnology Inc. Seongnam 462-713, Korea

(Received 20 May 2013; revised 20 January 2014; accepted 27 January 2014)

Abstract

Salmonellosis has caused heavy losses in swine industry and implications for public health. Recently, the urgent problem of antibiotic resistance due to multidrug-resistant *Salmonella* spp. has been on the rise. The use of host-specific bacteriophages as a biocontrol is one possible alternative. In this study, clinical signs, growth performance, quantification and detection of antigen, histopathological changes of gastrointestinal tracts were analyzed comparatively in weaned piglets according to administration of bacteriophages and challenge with *Salmonella* (*S.*) Typhimurium. Piglets challenged with *S.* Typhimurium after administered with bacteriophages showed reduced clinical signs, higher growth performance, lower bacterial shedding, lower quantificational value of antigens in intestines, higher V/C ratio and higher the number of goblet cells in intestines than piglets administered without bacteriophage and challenged with *S.* Typhimurium. These results indicate that feeding contained with bacteriophages has effect to prevent infection of *S.* Typhimurium in weaned piglets and suggest that a use of bacteriophage can be considered a valid antibiotic alternative.

Key words : Bacteriophages, *S.* Typhimurium, Growth performance, V/C ratio, Goblet cell

서 론

박테리오파지는 1910년도에 D'Herelle와 Twort에 의해서 최초로 발견되었으며(D'Herelle 등, 1922), 세균성 질병의 예방과 치료제로 사용되었다. 초기 연구는 체계적인 실험이 수행되지 않았으며, 항생제를 포함한 화학요법의 빠른 발전으로 박테리오파지에 대한 연구가 지속되지 못했다(Barrow와 Soothill, 1997).

최근 항생제 내성을 가진 병원성 세균의 출현 및 증가가 문제되고 있으며(Aarestrup, 1999; Goode 등, 2003), 막대한 비용을 들여 항생제 내성균에 작용하는 새로운 항생제를 개발한다고 해도 새로운 항생제에 내성을 가진 병원체가 출현할 가능성이 있어 대체할 치료 전략이 필요한 실정이다(Aarestrup, 1999; Biswas 등, 2002; Matsuzaki 등, 2005). 이와 같은 문제를 해결하기 위해 최근 항생제가 개발되기 이전 시대의 치료법에 대한 관심이 높아지고 있으며, 박테리오파지를 이용한 치료법에 대한 관심이 증가하고 있다

*Corresponding author: Jeong-Hee Han, Tel. +82-33-250-8691,
Fax. +82-33-256-3722, E-mail. hanjh@kangwon.ac.kr

(Barrow와 Soothill, 1997; Biswas 등, 2002). 현재 *Salmonella* spp., *Escherichia coli*와 *Campylobacter* spp. 등은 전 세계적으로 축산업에 큰 피해를 주며, 사람에서 감염되어 공중보건학상 문제가 되는 세균에 대해 박테리오파지 치료법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Barrow 등, 1998; Gill 등, 2006; Goode 등, 2003; Higgins 등, 2005; Johnson 등, 2008; Loc Carrillo 등, 2005).

*S. Typhimurium*은 사람에서 식중독을 일으키는 대표적인 병원체일 뿐만 아니라 돼지에서 가장 흔히 분리된다(Fedora-Cray 등, 2000). *S. Typhimurium*은 성돈에서 주로 불현성감염을 일으키지만 6~12주 사이의 어린 돼지에서 쉽게 감염하여 임상증상을 보인다. *S. Typhimurium*의 감염은 설사 이외에도 발열, 황달, 패혈증 등 전신증상을 유발하여 폐사시키며 이환율과 폐사율이 높다고 알려져 있고 다양한 경로로 감염이 이루어질 수 있다(Kapperud 등, 1990; Khakhria 등, 1991; Sarwari 등, 2001).

이 연구는 양돈산업에 피해를 주는 돼지 설사의 원인체 중 하나인 *S. Typhimurium*의 감염에 대한 박테리오파지의 방어효능을 확인하기 위해 진행되었다. *S. Typhimurium*에 특이성을 가진 박테리오파지를 사료에 첨가하여 급여한 돼지에서의 *S. Typhimurium* 감염에 따른 임상증상, 성장률, 항원 검출과 정량분석 및 장조직의 병리조직학적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

S. Typhimurium 특이 박테리오파지 분리 및 정제

S. Typhimurium 감염에 대한 방어 효능 시험을 위하여 인트론사(Korea)에서 제작한 *S. Typhimurium* 특이성 박테리오파지인 STP-1을 제공받았다. 제공받은 박테리오파지는 다음과 같은 방법에 의해 분리 및 정제되었다. 양돈장 분뇨처리장에서 *S. Typhimurium* 특이성 용균성 박테리오파지를 분리하기 위하여 액상 분뇨를 4,000 rpm으로 원심분리한 후, 0.45 µm 필터를 이용하여 여과하였다. *S. Typhimurium*과 여과 시료를 37°C에서 18시간 동안 혼합배양한 뒤, 4,000 rpm으로 원심분리한 후, 상층액을 0.45 µm 필터를 이용하여 분리하였다. 상층액을 *S. Typhimurium*을 도말한 plate에 떨어뜨려 박테리오파지에 의한 plaque 형성 유무를 확인하였다. 확인된 plaque는 분리하여 동

일한 과정을 3회 반복하여 단일 plaque로 정제하였고, 정제된 박테리오파지는 SM buffer (0.1M NaCl, 1mM MgSO₄, 0.2M Tris (pH 7.5), 0.01% gelatin)로 희석하여 4°C에 보관하였다. 분리된 박테리오파지는 *S. Typhimurium*을 이용하여 증폭하였고, *S. Typhimurium*을 OD=0.8까지 배양한 후, 박테리오파지를 접종하여 37°C에서 5시간 동안 추가 배양하였다. 배양액을 4,000 rpm으로 원심분리한 후, 상층액을 0.2 µm 필터를 이용하여 정제하였다. 정제된 박테리오파지 용액은 spray drying 과정을 통해 1.0×10⁹ PFU/g 농도로 분말화하였다.

실험설계

생후 28일령의 이유자돈(Landrace×Yorkshire) 21두를 각각 7두씩 3개 실험군으로 분류하여(Table 1), 14일간 실험을 진행하였다. 실험용 자돈들은 시험 개시 전 3일 동안 아목실펜 200 (녹십자수의약품, Korea)을 음수 투여하였고 음수 투여 3일 후 분변에서 PCR을 통해 *S. Typhimurium*이 검출되지 않는 것을 확인하였다. 실험 개시일 부터 박테리오파지 투여군은 사료 1 kg당 정제된 박테리오파지(1.0×10⁹ PFU/g)를 1 g 혼합하여 급여하였다. 공격접종용 *S. Typhimurium* CTC1110은 2011년 6월에 분리된 균주로 씨티씨바이오(Korea)에서 분양받았다. 농장에서 설사증을 보이는 자돈의 분변을 RV broth (Difco, USA)에서 42°C, 18시간 배양한 후, RV broth 배양액을 XLD agar에 도말한 다음 37°C에서 18시간 배양하여 검은색 colony를 확인하였다. 최종적으로 API20E kit (Biomeriux, France)와 *S. Typhimurium* 특이성 PCR (Akiba 등, 2011)로 확인하였다. 공격접종용 *S. Typhimurium* CTC1110을 LB broth (Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 PBS (phosphate buffered saline)로 희석하여 1.0×10⁸ CFU/mL로 조정하였다. 공격접종은 *S. Typhimurium* 균액을 카테터를 사용하여 두당 5 mL씩 실험 개시일로부터 7일 후에 실험돈에 경구접종 하였다.

Table 1. Experimental design for effect of bacteriophages against *S. Typhimurium* in piglets

Group	No. of head	Administration of bacteriophage (PFU/g)	Inoculation of bacteria (CFU/mL)
A	7	-	-
B	7	-	1.0×10 ⁸
C	7	1.0×10 ⁹	1.0×10 ⁸

임상증상 관찰은 직장을 통해 체온을 측정하고 설사 정도를 기록하였다. 설사정도는 Sherman 등(1983)의 방법에 의하여 fecal consistency (FC) score (정상적인 분, 0; 연변, 1; 묽은 설사, 2; 심한 설사, 3)로 측정하였다. 성장률은 매일 일당사료섭취량(DFI, daily feed intake)을 측정하였고, 실험 시작 시점, 공격접종일과 실험종료 시점에 개체별 체중을 측정하여 평균일당 증체(average daily gain, ADG)와 사료효율(Gain/Feed, G:F)을 계산하였다. 분변에서의 항원 배출량 조사는 공격접종 1일 후, 3일 후와 7일 후에 분변을 채취하여 분석하였다. 장기에서의 항원 정량 및 검출은 실험 종료 후 부검을 하여 십이지장, 공장, 회장, 결장과 장간막 림프절을 채취하여 분석하였으며, 장조직의 병리조직학적 조사는 십이지장, 공장, 회장과 결장을 채취하여 분석하였다.

RT-PCR을 이용한 *S. Typhimurium* 항원 검출

*S. Typhimurium*의 검출과 정량분석을 위해 RT-PCR 방법을 사용하였다(Lee 등, 2009). Oligonucleotide primer 는 forward primer, 5'-tgcagaaaattgatgctgct-3', reverse primer, 5'-ttgccaggttgtaatagc-3'와 dual-labeled probes, FAM-acctgggtgcggtacagaaccgt-BHQ1a이며, 중합효소 연쇄반응은 DNA template 2 µL에 100 pM forward와 reverse primer 그리고 probe 0.5 µL, Premix EX Taq™ (Takara, Japan) 12.5 µL, nuclease free water 9 µL를 첨가한 반응액 25 µL를 95°C에 10분간 초기 denaturation 을 시킨 후 denaturation은 95°C, 10초 annealing과 extension은 각각 64°C, 1분으로 총 40 cycle을 수행하였다.

*S. Typhimurium*의 정량분석은 10⁸ CFU/mL를 10³ CFU/mL까지 단계희석한 후 각 시료의 RT-PCR 시행한 결과로 Smartcycler software (Cepheid, USA)를 이용하여 표준곡선(Fig. 1)을 제작하였다. 분변과 장기 시료에서의 항원량은 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

장조직의 병리조직학적 분석

실험 종료 후, 실험자돈의 유문부로부터 10 cm 부위의 십이지장, 회맹부로부터 150 cm 부위의 공장, 회맹부로부터 10 cm 부위의 회장 조직을 각각 3 cm 씩 채취한 후 10% 중성포르말린에 넣어 48시간 고정하였다. 일반적인 조직 처리 과정을 거친 후 파라핀에 포맷하고, 4 µm 두께로 박절한 후 조직절편을 탈파라핀화하여 재합수 과정을 거친 다음 장의 형태학

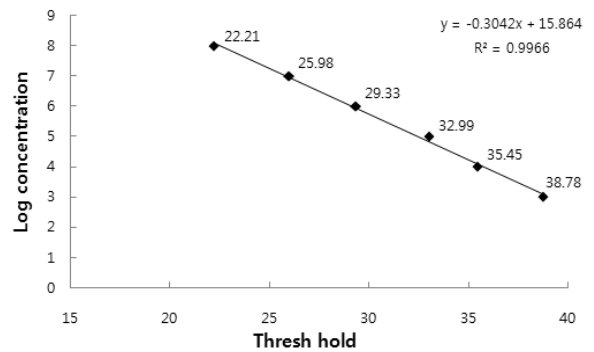


Fig. 1. Standard curve of the real-time PCR for *S. Typhimurium*. The results of the real-time PCR were determined using decimal dilution of *S. Typhimurium* DNA. The threshold values (C_T) were plotted against the corresponding bacterial cell number (log₁₀ CFU/mL).

적 분석을 위해 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색을, 점액세포 수 측정을 위해 alcian blue-PAS (periodic acid-Schiff) 염색을 하였다. 장의 형태학적 분석은 십이지장, 중간-공장, 회장 상, 하, 좌, 우 네 부위의 용모 길이와 음와 깊이를 spot diagnostic insight (Olympus, USA)를 이용하여 촬영한 후 용모(villus, V)의 높이와 음와(crypt, C)의 깊이를 측정하여 평균값을 구하였다. 각각의 평균값을 이용하여 용모의 높이 : 음와의 깊이의 비(V/C ratio)를 계산하였다. 점액세포의 수는 소장과 대장의 상, 하, 좌, 우 네 부위를 광학현미경 400배에서 측정하여 평균값을 구하였다.

통계 처리

실험 결과는 SPSS statistics 20 (IBM Corp., USA)을 이용하여 통계처리를 하였다. 정규성 검정을 거쳐 비모수 실험 결과는 2개 실험군 비교에서 mann-whitney 검정, 3개 실험군 비교에서 kruskal-wallis 검정을 하였다. 모수 실험결과는 2개 실험군 비교에서 독립표본 T 검정, 3개 실험군 비교에서 분산의 동질성 검정을 거쳐 분산이 동질한 실험결과는 Duncan 검정, 분산이 동질하지 않은 실험결과는 Dunnett T3 검정을 하였다. 항원 검출률 결과는 chi-square 검정을 하였다.

결 과

임상증상

*S. Typhimurium*을 공격접종한 후, 공격접종군인 실

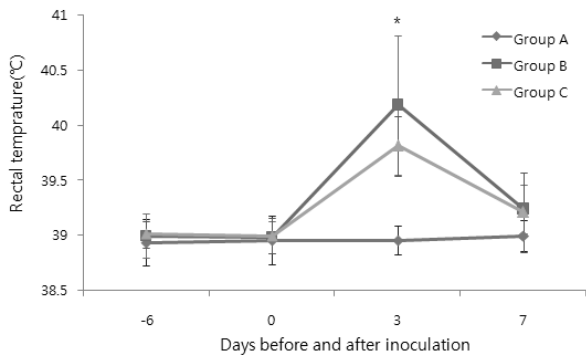


Fig. 2. Rectal temperature change following administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium*. *Indicates significant difference between the control group and inoculation groups ($P < 0.05$).

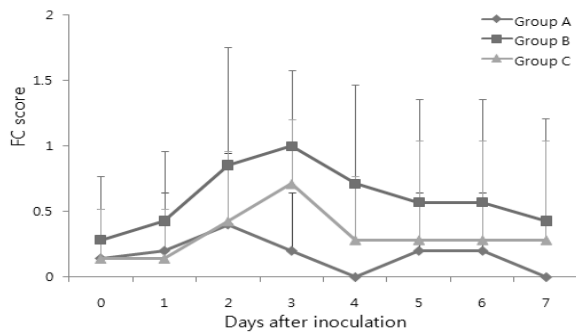


Fig. 3. Fecal consistency score following administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium*.

험군 B와 C는 공격접종 후 3일에 직장온도가 증가하였으며, 3일 이후 정상체온으로 회복하였다. 공격접종 후 3일에 박테리오파지 투여군인 실험군 C는 *S. Typhimurium* 단독 공격접종군인 실험군 B보다 유의적으로 낮은 직장온도를 보였다($P < 0.05$, Fig. 2). *S. Typhimurium* 공격접종군인 실험군 B와 C는 공격접종 후 3일까지 설사지수가 증가하다가 이후 감소하는 경향을 보였다. 공격접종 후 동안 박테리오파지 투여군인 실험군 C는 *S. Typhimurium* 단독 공격접종군인 실험군 B보다 낮은 설사지수를 보였다(Fig. 3).

성장률

성장률은 공격접종 전 기간(phase I), 공격접종 후 기간(phase II) 및 실험전체기간(overall)으로 관찰하였다. 공격접종 후 기간에서 평균일당증체량과 사료효율은 실험군 C가 159±18 g과 0.452±0.053 g, 실험군 B가 101±16 g과 0.291±0.048 g이었다. 실험전체기간

Table 2. Growth performance according to administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium*

	A	B	C
Phase I (d [*] -6~0)			
DFI [†] (g)	217	211	225
ADG [‡] (g)	146±51	134±26	170±13
G : F [§]	0.675±0.240	0.637±0.121	0.759±0.057
Phase II (d 1~7)			
DFI (g)	391	349	352
ADG (g)	245±30	101±51	159±55
G : F	0.627±0.079	0.291±0.146	0.452±0.155
Overall (d -6~7)			
DFI (g)	297	275	284
ADG (g)	192±17	119±26	165±20
G : F	0.646±0.026	0.434±0.030	0.583±0.029

^{*}Days before and after challenge with *S. Typhimurium*. [†]Daily feed intake. [‡]Average daily gain. [§]Gain/Feed. ^{||}Means within a row without a common superscript are significant differently ($P < 0.05$).

에서 평균일당증체량과 사료효율은 실험군 C가 165±8 g과 0.583±0.029 g, 실험군 B가 119±8 g과 0.434±0.030 g이었다. 박테리오파지 투여군인 실험군 C는 *S. Typhimurium* 단독공격접종군인 실험군 B보다 공격접종한 후 기간과 실험 전체기간에서 유의적으로 높은 평균일당증체량과 사료효율을 보였다($P < 0.05$, Table 2).

분변에서의 *S. Typhimurium* 검출 및 정량

S. Typhimurium 공격접종군들은 공격접종한 후 1일 부터 분변에서 *S. Typhimurium* 항원이 검출되었다. *S. Typhimurium* 항원 정량 측정결과, 공격접종 후 1일, 3일, 7일에 실험군 C는 각각 2.18±2.73 log CFU/mL, 1.61±2.75 log CFU/mL, 1.58±2.69 log CFU/mL, 실험군 B는 각각 5.9±0.64 log CFU/mL, 6.57±0.61 log CFU/mL, 5.19±2.29 CFU/mL이었다. 박테리오파지 투여군인 실험군 C가 *S. Typhimurium* 단독접종군인 실험군 B보다 유의적으로 낮은 정량 결과를 보였다($P < 0.05$, Table 3).

소화기에서의 *S. Typhimurium* 검출 및 정량

소화기에서 *S. Typhimurium*을 정량한 결과, 십이지장, 회장, 결장, 장간막 림프절에서 실험군 C는 실험군 B보다 낮은 정량 결과를 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 공장에서는 실험군 C가 5.13±2.30 log

Table 3. Quantification and detection rate of antigen in feces samples according to administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium*

DPC*	Group		
	A	B	C
1	0 [†] 0% (0/7) [‡]	5.90±0.64 100% (7/7)	2.18±2.73 [§] 42.9% (3/7)
3	0 0% (0/7)	6.57±0.61 100% (7/7)	1.61±2.75 [§] 28.6% (2/7)
7	0 0% (0/7)	5.19±2.29 100% (7/7)	1.58±2.69 [§] 28.6% (2/7)

*Days post challenge with *S. Typhimurium*. [†]Quantificational value (log₁₀ CFU/mL) in feces samples by real-time PCR. [‡]No. of positive/No. of inspected. [§]*P* value < 0.05 in comparison to Group B.

Table 4. Quantification and detection rate of *S. Typhimurium* according to administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium* in piglet's intestines

Intestine	Group		
	A	B	C
Duodenum	0* 0% (0/7) [†]	4.27±3.04 71.4% (5/7)	3.27±3.07 57.1% (4/7)
Jejunum	0 0% (0/7)	6.75±0.61 100% (7/7)	5.13±2.30 [§] 85.7% (6/7)
Ileum	0 0% (0/7)	1.88±2.44 42.9% (3/7)	1.21±2.09 28.6% (2/7)
Colon	0 0% (0/7)	1.65±2.82 28.6% (2/7)	0.59±1.57 14.3% (1/7)
MLN [‡]	0 0% (0/7)	5.19±0.12 85.7% (6/7)	3.46±2.39 57.1% (4/7)

*Quantificational value (log₁₀ CFU/mL) of *S. Typhimurium* from a tissue. [†]No. of positive/No. of inspected. [‡]Mesenteric lymph node. [§]*P* value < 0.05 in comparison to Group B.

CFU/mL, 실험군 B가 6.75±0.30 log CFU/mL이었다. 박테리오파지 투여군인 실험군 C가 *S. Typhimurium* 단독접종군인 실험군 B보다 유의적으로 낮은 정량 결과를 보였다(*P*<0.05, Table 4).

장조직의 병리조직학적 분석

소장 점막의 형태학적 분석에서 *S. Typhimurium*을 공격접종하지 않은 군은 *S. Typhimurium* 공격접종군들에 비해 용모와 음와가 정상적인 상태를 유지하고 있었다. 십이지장과 공장에서 용모의 길이는 실험군 C가 408.5±29.3 μm와 321.6±4.1 μm로 실험군 B의 330.1±39.0 μm와 264.8±23.6 μm보다 유의적으로 길었

Table 5. Intestinal morphology in small intestine according to administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium*

Intestine	Group		
	A	B	C
Duodenum			
Villus length (μm)	465.4±20.0 [†]	330.1±39.0 [†]	408.5±29.3 [†]
Crypt depth (μm)	251.2±14.4 [†]	338.8±29.2 [†]	317.9±25.1 [†]
V/C ratio*	1.858±0.146 [†]	0.974±0.079 [†]	1.294±0.161 [†]
Jejunum			
Villus length (μm)	372.8±20.0 [†]	264.8±23.6 [†]	321.6±4.1 [†]
Crypt depth (μm)	249.6±19.3 [†]	329.2±45.5 [†]	312.6±30.6 [†]
V/C ratio	1.501±0.141 [†]	0.811±0.074 [†]	1.037±0.112 [†]
Ileum			
Villus length (μm)	339.8±19.0 [†]	288.5±19.5 [†]	300.5±9.2 [†]
Crypt depth (μm)	260.2±11.1 [†]	323.4±20.5 [†]	298±19.0 [†]
V/C ratio	1.305±0.040 [†]	0.895±0.085 [†]	1.01±0.043 [†]

*Villus height/Crypt depth ratio. [†]Means within a row without a common superscript are significant differently (*P*<0.05).

다(*P*<0.05). 회장에서 음와의 두께는 실험군 B가 323.4±20.5 μm, 실험군 C가 298±19.0 μm로 실험군 C가 실험군 B보다 유의적으로 낮았다(*P*<0.05). 십이지장, 공장과 회장의 V/C ratio는 실험군 C가 1.294±0.161 μm, 1.037±0.112 μm와 1.01±0.043 μm, 실험군 B가 0.974±0.079 μm, 0.811±0.074 μm와 0.895±0.085 μm로 박테리오파지 투여군인 실험군 C가 *S. Typhimurium* 단독공격접종군인 실험군 B보다 유의적으로 높았다(*P*<0.05, Table 5).

장점막의 점액세포는 *S. Typhimurium* 공격접종군들은 *S. Typhimurium*을 공격접종하지 않은 군에 비해 수가 감소하였다. 십이지장의 용모, 음와, 공장의 용모와 결장 점막에서 점액세포 수는 실험군 B가 17.5±3.0 μm, 25.2±4.2 μm, 9.71±1.9 μm와 39.0±2.8 μm, 실험군 C가 23.3±3.5 μm, 33.5±6.1 μm, 15.0±5.1 μm와 49.0±10.4 μm로 *S. Typhimurium* 단독공격접종군인 실험군 B가 박테리오파지 투여군인 실험군 C보다 유의적으로 감소하였다(*P*<0.05, Table 6).

고 찰

최근 들어 돼지에 있어서 항생제에 내성을 가진 병원성 세균이 지속적으로 출현하고 증가되어 문제되고 있으며, 이런 문제를 해결하기 위해 항생제를 대체할 제제가 필요하다(Aarestrup, 1999; Biswas 등,

Table 6. Goblet cells count in a small and large intestine according to administration of bacteriophages and challenge with *S. Typhimurium*

Intestine	Group		
	A	B	C
Duodenum			
Villi	29.0±2.0*	17.5±3.0*	23.3±3.5*
Crypt	41.0±2.0*	25.2±4.2*	33.5±6.1*
Jejunum			
Villi	18.8±0.7*	9.71±1.9*	15.0±5.1*
Crypt	38.0±1.4*	16.1±3.6*	21.1±5.8*
Ileum			
Villi	29.6±1.0*	16.0±2.9*	19.8±5.2*
Crypt	48.0±1.4*	34.4±4.6*	41.3±7.6*
Colon			
Mucosa	66.8±4.7*	39.0±2.8*	49.0±10.4*

*Means within a row without a common superscript are significantly are significant differently ($P < 0.05$).

2002; Matsuzaki 등, 2005). 이 연구는 이유자돈에서 *S. Typhimurium* 감염에 대한 항생제를 대체 가능한 박테리오파지의 방어 효능에 대한 시험을 하였다.

이유자돈에서의 *S. Typhimurium* 감염 시 주요 임상 증상은 발열과 황색의 수양성 설사이다(Fedora-Cray 등, 2000; Kapperud 등, 1990; Khakhria 등, 1991; Sarwari 등, 2001). *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈들은 체온이 공격접종 후 3일까지 직장온도가 증가한 후, 정상 수준으로 회복되었다. 이전의 연구들에서 *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈의 직장온도는 공격접종 후 1~2일 사이에 최고조에 이른 후 감소하는 경향을 보여(Balaji 등, 2000; Tanaka 등, 2010; Turner 등, 2002), 이 연구와 유사한 결과를 보였다. *S. Typhimurium* 공격접종 후 3일에 박테리오파지를 투여한 이유자돈은 *S. Typhimurium* 단독 공격접종한 이유자돈보다 유의적으로 낮은 직장온도를 보여, 박테리오파지가 *S. Typhimurium* 감염 시 발열증상을 감소시키는 경향을 보였다.

*Salmonella*균에 의한 설사는 소화기의 흡수부전과 소화기 조직의 괴사와 염증으로 인한 간질액의 누출이 원인이다(Schwartz, 1999). *Salmonella*균의 장독소는 나트륨의 재흡수 감소와 염화물의 분비 증가를 발생시키고 호중구가 유도한 프로스타글란딘에 의해 장점막의 분비를 자극한다(Stephen 등 1985). 이번 연구에서 *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈에서의 설사는 공격접종 후 3일까지 심한 소견을 보이다가 감소하였다. 박테리오파지를 투여한 이유자돈은

*S. Typhimurium*을 단독 공격접종한 이유자돈보다 낮은 설사지수를 보였는데, 소장의 흡수면적의 회복과 염증조건 완화와 관련 있을 것으로 생각된다.

이전의 여러 연구는 *S. Typhimurium*을 공격접종한 돼지와 쥐에서 용모의 위축과 음와의 증생이 일어났다고 하였다(Barthel 등, 2003; Letellier 등, 2001; Savidge 등, 1991). *S. Typhimurium*같은 장병원성 세균이 장 조직에 감염되면 방어기전으로 병원균의 장 상피 부착에 의한 염증반응을 최소화하기 위해 음와로부터 이동한 미성숙 장세포들이 감염된 점막세포들을 밀어내는 과정에서 음와의 심한 증생이 발생한다(Johnson과 Barthold, 1979). 이 연구에서 *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈들에서 박테리오파지를 투여한 이유자돈은 *S. Typhimurium*을 단독 공격접종한 이유자돈보다 높은 V/C ratio를 보여, 양호한 장점막 상태를 보였다. 소장 용모의 위축과 음와의 증생은 성장에 필요한 영양분의 흡수와 성장을 도와주는 비필수 아미노산 합성 및 솔가장자리-효소들의 양과 활성도를 감소시켜 성장률을 떨어뜨린다(Li 등, 2001; Pluske 등, 1997; Wu 등, 2004). 이 연구에서도 *S. typhimurium*을 공격접종한 이유자돈들에서 용모 위축과 음와 증생에 따른 V/C ratio의 감소가 관찰되었으며, 이에 따라 성장률이 감소하는 경향을 보였다. Gebru 등(2010)은 *S. Typhimurium*을 공격접종한 육성돈에서 박테리오파지 3.0×10^9 PFU/g을 사료첨가제로 급이하여 2주 동안 관찰한 결과 성장률이 유의적으로 개선되었다고 보고하였다. 이 실험에서도 *S. Typhimurium*의 감염에 대해 박테리오파지를 투여한 이유자돈이 *S. Typhimurium*을 단독 공격접종한 이유자돈보다 성장률이 개선되는 효과를 보였다.

*Salmonella*균을 공격접종한 후 감염된 돼지는 12~24시간 내에 분변으로 *Salmonella*균을 배출한다(Delsol 등, 2004; Jacks 등, 1988; Tanaka 등, 2010). 이 연구에서 *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈들은 공격접종 후 1일부터 *S. Typhimurium*이 분변에서 검출되었으며, 직장온도와 설사지수의 경우처럼 공격접종 후 3일에 배출량이 최고치를 보였다. Tanaka 등(2010)은 *S. Typhimurium* 공격접종 후 분변으로의 *Salmonella*균 배출량은 공격접종 후 3일에서 최고치를 보였고, 직장온도는 공격접종 후 2일에 최고치를 보였으며, 공격접종 후 2~3일에 소화기뿐만 아니라 전신에서도 증가하였다고 하였다. 이번 연구에서 *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈은 공격접종 후 1일부터 *S. Typhimurium*이 분변으로 배출되기 시작하여 공

격접종 후 3일에 최고치를 보였으며, 직장온도도 공격접종 후 3일에 최고치를 보여 공격접종 후 2-3일에 *S. Typhimurium*이 소화기 이외 전신에서도 증가하였음을 알 수 있다.

박테리오파지는 *in vitro*와 *in vivo*에서 병원성 세균을 감소시키는 효과가 있다(Barrow와 Soothill, 1997; Biswas 등, 2002). Gebru 등(2010)과 Wall 등(2010)은 *S. Typhimurium*을 감염시킨 돼지에서 박테리오파지를 투여한 결과 항원의 분변 배출과 소화기에서의 항원 검출량이 감소하였다고 하였다. 이 실험에서도 *S. Typhimurium*을 공격접종한 이유자돈에서 박테리오파지의 투여는 분변과 소화기 장기에서 *S. Typhimurium*의 검출량과 검출률을 낮추는 효과를 보였다.

점액세포는 장표면의 점액층을 형성하는 점액을 분비하는 세포이다(Howard 등, 2007). 점액은 mucopolysaccharide 가수분해 활성을 갖고 있어 세균이 장내로 침투되거나 전이되는 것을 막는다(Deplancke와 Gaskins, 2001). Letellier 등(2001)과 Barthel 등(2003)은 각각 *S. typhimurium*을 공격접종한 돼지와 쥐에서 점막의 부종과 염증반응을 동반하여 점액세포 수 감소가 발생하였다고 하였다. *Salmonella*균의 감염은 염증 유발 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 분비를 촉진시키며(Arai 등, 1995; Galdiero 등 1993), 촉진된 TNF- α 는 장세포의 유사분열을 증가와 함께 점액세포의 형성을 감소시킨다(Arnold 등, 1993). 이 연구에서 박테리오파지를 투여한 이유자돈은 *S. Typhimurium*을 단독공격접종한 이유자돈에 비해 장점막에서 많은 점액세포 수를 보였다. 이것은 박테리오파지가 공격접종한 이유자돈의 장조직에서 *S. Typhimurium*의 감염을 감소시켰음을 알 수 있다.

이 실험의 결과를 바탕으로 이유자돈에서의 *S. Typhimurium* 감염에 대한 박테리오파지의 방어 효능을 확인할 수 있었으며, 기존의 항생제를 대체할 대체제로서 적용 가능할 것으로 생각한다.

결 론

이 연구는 이유자돈에서의 *S. Typhimurium* 감염에 대한 박테리오파지의 방어 효능을 평가하기 위해 실시하였다. 박테리오파지를 투여한 이유자돈은 *S. Typhimurium*을 단독공격접종한 이유자돈과 비교할 때 발열과 설사증상이 완화되고, 성장률이 개선되는 효과를 보였다. 또한, 분변과 장기에서 *S. Typhimu-*

*rium*의 낮은 검출량과 검출률을 보였으며, 장조직의 병리조직학적 분석에서 높은 V/C ratio와 점액세포의 높은 밀도를 보였다. 따라서 박테리오파지는 자돈의 *S. Typhimurium* 감염에 방어 효능이 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 2013년도 강원대학교 학술연구조성비(과제번호 120131231)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Aarestrup FM. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents* 12: 279-285.
- Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. 2011. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *J Microbiol meth* 85: 9-15.
- Arnold JW, Klimpel GR, Nielsen DW. 1993. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) regulates intestinal mucus production during salmonellosis. *Cell Immunol* 15: 336-344.
- Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Y Kimura, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. 1995. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 600-607.
- Balaji R, Wright KJ, Hill CM, Dritz SS, Knoppel EL, Minton JE. 2000. Acute phase responses of pigs challenged orally with *Salmonella typhimurium*. *J Anim Sci* 78: 1885-1891.
- Barrow P, Lovell M, Berchieri A Jr. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 294-298.
- Barrow PA, Soothill JS. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol* 5: 268-271.
- Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt WD. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 71: 2839-2858.
- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomy-

- cin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Immun 70: 204-210.
- Delsol AA, Woodward MJ, Roe JM. 2004. Effect of a 5 day enrofloxacin treatment on *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 in the pig. J Antimicrob Chemother 53: 396-408.
- Deplancke B, Gaskins HR. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr 73: 1131S-1141S.
- D'Herelle F, Twort FW, Bordet J, Gratia A, Ledingham JCG, McLeod JW. 1922. Discussion on the bacteriophage (Bacteriolysin). Br Med J 2: 289-299.
- Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wary C. 2000. *Salmonella* infections in pigs. pp. 191-207. In: Wary C and Wary A(ed.). *Salmonella* in domestic animals. 1th ed. CABI publishing, UK.
- Galdiero F, de L'ero GC, Benedetto N, Galdiero M, Tufano MA. 1993. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. Infect Immun 81: 155-161.
- Gebbru E, Lee JS, Son JC, Yang SY, Shin SA, Kim B, Kim MK, Park SC. 2010. Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. J Anim Sci 88: 3880-3886.
- Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. Antimicrob Agents Chemother 50: 2912-2918.
- Goode D, Allen VM, Barrow PA. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. Appl Environ Microbiol 69: 5032-5036.
- Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. Poult Sci 84: 1141-1145.
- Howard BG. 2007. Alimentary system. pp. 301-392. In: McGavin MD, Zachary JF(ed.). Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed., Elsevier Mosby. St. Louis.
- Jacks TM, Frazier E, Judith FR, Olson G. 1988. Effect of efrotomycin in feed on the quantity, duration, and prevalence of shedding and antibacterial susceptibility of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected swine. Am J Vet Res 49: 1832-1835.
- Johnson E, Barthold SW. 1979. The ultrastructure of transmissible murine colonic hyperplasia. Am J Pathol 97: 291-313.
- Johnson RP, Gyles CL, Huff WE, Ojha S, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. 2008. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. Anim Health Res Rev 9: 201-215.
- Kapperud G, Gustavsen S, Hellesnes I, Hansen A, Lassen J, Hirn J, Jahkola M, Montenegro MA, Helmuth R. 1990. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. J Clin Microbiol 28: 2597-2601.
- Khakhria R, Duck D, Lior H. 1991. Distribution of *Salmonella enteritidis* phage types in Canada. Epidemiol Infect 106: 25-32.
- Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, Lee HS, Jeon WJ, Choi KS, Kweon CH, Yoo HS. 2009. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enteritidis in meats. J Vet Sci 10: 43-51.
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Chénier S, Quessy S. 2001. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. Can J Vet Res 65: 168-172.
- Li BT, Van Kessel AG, Caine WR, Huang SX, Kirkwood RN. 2001. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. Can J Anim Sci 81: 511-516.
- Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol 71: 6554-6563.
- Matsuzaki S, Rashed M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. J Infect Chemother 11: 211-219.
- Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. Livest Prod Sci 51: 215-236.
- Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD. 2010. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. Appl Environ Microbiol 76: 48-53.
- Sarwari AR, Magder LS, Levine P, McNamara AM, Knower S, Armstrong GL, Etzel R, Hollingsworth J, Morris JG Jr. 2001. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. J Infect Dis 183: 1295-1299.
- Savidge TC, Smith MW, James PS, Aldred P. 1991. *Salmonella*-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. Am J Pathol 139: 177-184.
- Sherman DM, Acres SD, Sadowski PL, Springer JA, Bray B, Raybould TJ, Muscoplat CC. 1983. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. Infect Immun 42: 653-658.
- Schwartz KJ. 1999. Salmonellosis. pp. 535-551. In: Straw BE(ed). Disease of swine. 8th ed. Ames, Iowa.
- Stephen J, Wallis TS, Starkey WG, Candy DC, Osborne MP and Haddon S. 1985. Salmonellosis: In retrospect and prospect. pp. 177-192. In: Evered D(ed). Microbial toxins

- and diarrhoeal disease. Pitman, London.
- Tanaka T, Imai Y, Kumagae N, Sato S. 2010. The effect of feeding lactic acid to *Salmonella* Typhimurium experimentally infected swine. *J Vet Med sci* 72: 827-831.
- Turner JL, Dritz SS, Higgins JJ, Minton JE. 2002. Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. *J Anim Sci* 80: 1947-1953.
- Wu G, Knabe DA, Kim SW. 2004. Arginine nutrition in neonatal pigs. *J Nutr* 134: 2783S-2790S.