

< Original Article >

가금티푸스 예방을 위한 adjuvant로서 mastoparan V1을 사용한 포르말린-불활화 *Salmonella Gallinarum* 사균체 백신의 효능 평가

문자영¹ · 곽길환² · Enkhsaikhan Ochirkhuyag¹ · 김선민¹ · 이준우¹ · 조영규¹ · 김원경¹ · 방우영³ · 배창환³ · 허진^{1*}
전북대학교 수의과대학 수의공중보건학실¹, 전라북도가축위생시험소², 환경부 국립생물자원관³

Protective efficacy of formalin-inactivated *Salmonella Gallinarum* whole cells vaccine using mastoparan V1 as adjuvant against fowl typhoid

Ja-Young Moon¹, Kil Han Kwak², Enkhsaikhan Ochirkhuyag¹, Seon-Min Kim¹, Jun-Woo Lee¹,
Young-Gyu Jo¹, Won-Kyong Kim¹, Woo Young Bang³, Chang Hwan Bae³, Jin Hur^{1*}

¹Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

²Animal Health Institute of Jeollabukdo, Jeongeup 56134, Korea

³National Institute of Biological Resources, Ministry of Environment, Incheon 22689, Korea

(Received 4 December 2019; accepted 24 December 2019)

Abstract

Mastoparan V1 was used as adjuvant of formalin-inactivated *Salmonella Gallinarum* whole cells vaccine against fowl typhoid in a chicken model. The 75 brown nick chickens were equally divided into 5 groups, and all chickens of each group were immunized at 6 weeks of age (0 WPPI; weeks prime post immunization), and at 9 weeks of age (3 WPPI) (except group B). Group A chickens were intramuscularly (IM) inoculated with 500 μ L of sterile phosphate-buffered saline (PBS), and group B chickens were subcutaneously immunized with 0.2 ml containing 5×10^7 viable vaccine strain/bird. The chickens in groups C~E were IM inoculated with approximately 3×10^9 cells/0.5 mL of formalin-inactivated the *S. Gallinarum* whole cells, approximately 3×10^9 cells/0.5 mL of formalin-inactivated the *S. Gallinarum* whole cells with mastoparan V1 as adjuvant, and 0.5 mL of PBS, respectively. *S. Gallinarum* outer membrane proteins-specific serum IgG titers were considerably higher in groups B~D than in groups A and E. However, the levels of IFN- γ in groups B and D only than in groups A and E were significantly higher. Following oral challenge with virulent wild-type *S. Gallinarum*, no chicken in groups A (no challenge group) and B was dead, and only 30% of chickens in group D was dead. However, 70% of chickens in group C and all chickens in group E were dead after oral challenge. The results of this study demonstrated that IM immunization with approximately 3×10^9 of the formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells containing mastoparan V1 induced robust antibody and cell-mediated immune responses in chickens. The whole cells also conferred protection against infection with wild-type *S. Gallinarum*.

Key words : Fowl typhoid, Chicken, *Salmonella Gallinarum*, Mastoparan V1, Vaccine

서 론

가금티푸스는 그람 음성 세균으로 세포 내에 기생

하는 *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* (*S. Gallinarum*)에 의해 발생하며, 높은 폐사율로 인해 국내 및 전 세계적으로 양계 농가에 경제적으로 큰 손실을 초래하는 질병이다(Shivaprasad, 2000; Lee 등, 2013; Arora 등, 2015), 전신성 패혈 증상을 보이는 가금티푸스는

*Corresponding author: Jin Hur, Tel. +82-63-850-0959,
Fax. +82-63-850-0910, E-mail. hurjin@jbnu.ac.kr

약독화 생균 백신이나 불활화 사균백신을 접종함으로써 효과적으로 예방할 수 있다(Silva 등, 1981; Jawale and Lee, 2014; Cheng 등, 2016; Wigley 2017; Hajam 등, 2018). 사균백신은 열을 가하거나, 포르말린, 아세트론 등을 처리하여 불활화가 유도된 사균체로 구성되어 있으며, 불활화 백신은 인체에 감염될 잠재적인 위험요소인 생균이 존재하지 않는다는 장점이 있다. 하지만 불활화 사균백신은 백신된 동물에 의해 쉽게 제거될 수 있고 또한 종종 항원 발현이 제한적이어서 강력한 면역보강제(adjuvant)를 필요로 한다(Desin 등, 2013). 생균백신은 가금에 경구접종이 가능하다는 장점과 항체와 세포성매개 면역반응 모두의 활성화를 통해 가금 티푸스를 방어할 수 있다는 장점이 있다. 현재 live *S. Gallinaru* vaccine strain 9R이 약 60년간 가금티푸스를 예방하기 위해 사용되고 있다(Cheng 등, 2016; Wigley 2017). 하지만 이 생균 백신 균주는 여전히 독성이 남아 있고, 늦은 성장속도, 불충분한 방어 효율 등과 같은 단점이 여전히 존재한다고 보고되고 있다(Bouzoubaa 등, 1989; Kwon and Cho, 2011).

항균펩타이드(Antimicrobial peptides; AMP)는 식물, 곤충, 양서류, 포유동물 등에서 선천성 면역과 숙주 방어 체계에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 2016; Koehbach and Craik, 2019). 이 항균성 펩타이드는 잠재적 감염을 방어하는데 있어 중요한 역할을 수행하는 데 있어 매우 중요한 역할을 수행한다(Kuhn-Nentwig, 2003; Bulet 등, 2004; Fratini 등, 2017). 포유동물에서의 항균펩타이드는 선천 및 획득 면역 시스템의 주요한 구성요소일 뿐만 아니라 세균을 직접 용균시키는 것으로 보고되고 있다(Yeung 등, 2011).

많은 항균 펩타이드 또한 전갈, 뱀, 거미, 개미, 벌, 지네 등과 같은 동물의 독성분 중에서 광범위하게 발견되었다(Wang 등, 2016). 예를 들어, 전갈 독에서 나온 androtonin, parbutoporin, opistoporins, TstH, vpAmp 1.0과 같은 펩타이드 독소는 그램 양성 및 그램 음성 박테리아 또는 진균에 대한 강력한 항균 활동을 보여 주었고(Hetru 등, 2000; Powers and Hancock, 2003; Ramiez-Carreto 등, 2015; Machado 등, 2016), 뱀독에서 나온 cardiotoxin과 crotamine도 강력한 항균 또는 항진균 활성을 보여 주었다(Chen 등, 2011; Oguiura 등, 2011). 특히, 말벌과 거미 독성분은 광범위한 항균펩타이드를 보유하고 있는 것으로 알려져 있으며 이중 하나인 mastoparan은 말벌 독에 포함된 대표적인 항균 펩타이드이며(Wang 등, 2016), 약하지만 adjuvantdml

기능이 있다는 연구가 보고되었다(King 등, 2003). 최근 Kim 등은 mastoparan V1이 anti-*Salmonella* 활성이 다른 전형적인 mastoparan과 비교해 보았을 때 우수함을 보고하였다(Kim 등, 2016). 따라서 이번 연구에서 mastoparan V1이 면역보강제로서의 효능을 알아보기 위해 *S. Gallinaru*를 포르말린으로 불활화 한 후 ISA70과 함께 mastoparan V1을 혼합 제조하여, 약독화 생균 백신(SG9R), 제조된 포르말린 불활화 사균 백신을 제조하여 국내에서 사육되고 있는 갈색 레그혼종에 예방접종한 후 병원성 *S. Gallinarum*으로 도전감염하여 방어여부로 그 효능을 비교분석하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주와 펩타이드 및 프라이머 그리고 배양조건

국내 갈색레그혼종에서 전형적인 가금 티푸스로 폐사한 닭에서 분리한 *S. Gallinarum* 균주인 HJL465를 포르말린-불활화 사균체 백신 균주 및 도전감염 균주로 사용하였으며, 또한 백신 접종 후 ELISA 용 coating 항원을 위해 outer membrane proteins (OMPs)추출을 위한 균주로 사용하였다. 또한 HJL465는 백신 접종 후 유도되는 Cytokine 측정을 위해 splenocytes를 재 자극하기 위한 OMPs 추출용 균주로도 사용되었다. Adjuvant 효과 검증을 위해 사용될 mastoparan V1 (INWKIKSIIKAAMN)은 Peptron (대전, 한국)에서 합성되었다. 백신 균주 및 도전감염 후 각 장기로부터 분리된 균주의 확인을 위해 사용된 살모넬라-특이 프라이머 및 *S. Gallinarum*-특이 프라이머 염기 서열은 Table 1에 자세하게 서술하였다(Fashae 등, 2010; Kang 등, 2011). 포르말린-불활화 백신 제조를 위해서는 HJL465 균주는 BGA agar 및 LB broth에 접종되어

Table 1. Nucleotide sequence of oligonucleotide primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'-3')	size (bp)	Reference
OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204	Fashae 등, 2010
OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG		
SGL	GAT CTG CTG CCA GCT CAA	252	Kang 등, 2011
SGR	GCG CCC TTT TCA AAA CAT A		
SGPL	CGG TGT ACT GCC CGC TAT	174	Kang 등, 2011
SGPR	CTG GGC ATT GAC GCA AA		

37°C에서 배양되었다. 하지만 도전감염 후 각종 장기로부터의 균 분리를 위해서는 Fetal bovine serum이 5% 첨가된 BGA agar를 사용하였다.

포르말린-불활화 *S. Gallinarum* 사균체 제조

SG 균주의 한 콜로니를 선택하여 200 mL의 LB 액체 배지에 접종한 후 37°C에서 흡광도가 0.3에 도달할 때까지 배양하였다. 배양된 배지에 포르말린을 0.3%가 되도록 첨가하여 37°C에서 48시간 반응 시켰다. 반응 후 사균 여부를 확인하기 위해 각 반응액 중 100 µL씩 5% fetal bovine serum이 첨가된 BGA Agar 배지 및 Broth에 각각 접종하여 37°C에서 5일간 배양하여 colony 형성 유무로 반응액의 사균 여부를 확인하였다. 포르말린-불활화 *S. Gallinarum* 사균체는 4,000 rpm에서 30분간 원심하여 농축하였고, 멸균 PBS로 세번 세척한 후 최종적으로 ISA70을 사용하여 6×10^9 cells/mL이 되도록 희석하여 포르말린-불활화 사균체 백신으로 사용하였다.

더불어 mastoparan V1의 adjuvant로서의 효과를 확인하기 위해 위에서 제조된 포르말린-불활화 사균체와 ISA70을 혼합할 때 mastoparan V1을 30 µg/mL이 되도록 첨가하여 백신으로 사용하였다(포르말린-불활화 사균체-mastoparan V1 함유 백신).

실험 동물

1일령의 갈색레그혼종 병아리 75수를 구입하여 실험에 사용하였다. 구입된 모든 병아리는 어떤 백신도 접종되지 않았으며, 상업용 사료로 사육되었고 음료는 자유롭게 섭취할 수 있는 환경에서 사육되었다.

예방 접종 및 가검물 채취

5주령 75수의 갈색레그혼종을 5그룹(각 그룹 당 15수)으로 나누어 새로운 사육환경에 적응하도록 하였으며, 6주령이 되었을 때 그룹 B (약독화 생균 백신인 SG9R 접종군)를 제외한 모든 그룹의 갈색레그혼종은 6주령에 1차, 9주령에 2차로 근육 접종되었다. Group A의 갈색 레그혼종은 음성 대조군으로 멸균 phosphate-buffered saline (PBS)로 접종되었으며, 그룹 B는 약독화 생균 백신인 SG9R을 6주령에 1회 피하접종되었다. 그룹 C의 갈색레그혼종은 포르말린-불활화 사균체 백신을 3×10^9 cells/0.5 mL로, 그룹 D는 포르말

린-불활화 사균체-mastoparan V1 함유 백신을 3×10^9 cells/0.5 mL로 각각 2회 근육접종 되었다. 그리고 마지막으로 그룹 E의 갈색레그혼종은 멸균 PBS로 각각 2회 근육접종 되었다. 혈액은 0 WPPI (weeks post prime immunization) (1차 접종 전), 3 WPPI (2차 접종 전), 6 WPPI (도전감염 전)에 각각 채취되었다. 모든 가검물은 사용하기까지 영하 70도에 보관하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에서 보고된 동물실험은 Korean Council on Animal Care의 인가를 받은 전북대학교 동물윤리 위원회의 승인(CBNU2016-35)을 받아 진행하였다.

면역반응 평가를 위한 ELISA

혈청에서 *S. Gallinarum* (SG) 외부 멤브레인 단백질 (OMPs, outer membrane proteins)에 특이적인 항체 역가를 조사하기 위해 가금 IgG ELISA quantitative kit (Bethyl Lab Inc. Montgomery, TX, USA)를 제조사의 설명에 따라 사용하였다. 혈청 역가를 측정하기 위해 혈청은 1:100으로 희석하여 사용하였다.

비장세포의 사이토카인 측정

6 WPPI에 각 그룹에서 5마리의 닭이 비장을 채취하기 위해 희생되었고, 비장은 아래 방법에 따라 무균적으로 채취되었다. 먼저, 각 그룹별로 5마리의 닭을 마지막 예방 접종 후, 2주째에 각각 무균적으로 비장을 채취하여 RPMI 1640에 모았다. 그 다음 0.8% ammonium chloride (w/v) 용액을 이용하여 적혈구를 용해하였고, 1,800 rpm, 4°C 조건에서 10분간 원심 한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 마지막 원심분리 후, 완전배지(complete medium) (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% FCS)로 재부유 하였다. 배양되는 세포 수를 계산하여, 각 항원으로 72시간 반응 시킨 후, 1,800 rpm, 4°C 조건에서 10분간 원심분리 하고, 상층액을 -80°C에 보관하며 ELISA를 이용하여 사이토카인(MyBioSource, San Diego, CA, USA) 농도를 측정하였다.

도전감염 후 생존율 측정

도전 실험을 위해 야의 독성 균주인 HJL456을 Hur 등(Hur 등, 2011)이 기술한 방법에 따라 준비하였다.

모든 닭은 경구로 6 WPPI 짜에 2×10^9 CFU로 경구 접종으로 도전 감염하였다. 그 후에 모든 닭은 도전 감염 후 14일 동안 매일 하루에 두 번 폐사 여부가 관찰되었다. 폐사 직후 무균적으로 부검하여 비장 및 간 등으로부터 Hur 등(Hur 등, 2011)이 기술한 방법에 따라 살모넬라 균주를 분리하였으며 분리된 균주는 Table 1에서 기술한 프라이머를 이용하여 도전감염균주가 맞는지 확인하였다. 이렇게 균이 분리된 경우에만 도전감염에 의한 폐사로 인정하였다.

통계분석

항체역가와 사이토카인 농도는 SPSS version 16.0 software (SPSS, Chicago, IL)를 이용하여 Kruskal-Wallis test와 one-way analysis of variance로 각각 분석되었다. P 의 값이 0.05이하일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 평가하였다.

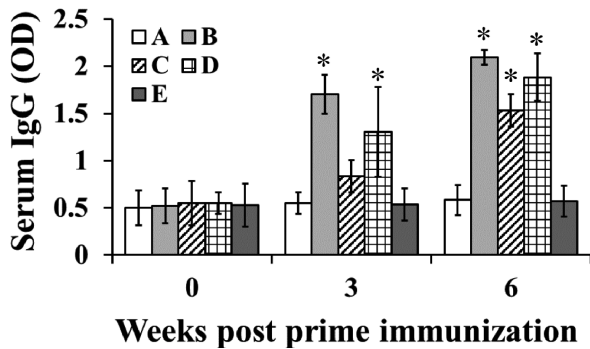


Fig. 1. Serum IgG titers against OMPs of *Salmonella Gallinarum* in chickens with attenuated live or inactivated *S. Gallinarum* vaccine candidate. Group A chickens (□) were intramuscularly (IM) immunized with sterile PBS; group B chickens (■) were subcutaneously immunized with 5.0×10^7 colony forming units of *S. Gallinarum* 9R vaccine strain; group C chickens (▨) were IM immunized with 3.0×10^9 cells of formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells; group D chickens (▩) were IM immunized with 3.0×10^9 cells of formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells adding 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of mastoparan V1; and group E chickens (■) were IM immunized with sterile PBS. Data shown are the means for all chickens in each group, and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P < 0.05$) and those of the control group E.

결 과

면역반응 결과

*Salmonella Gallinarum*의 OMPs에 대한 항체 역가는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 접종 전 그룹 A~E의 항체 역가는 각각 0.5 ± 0.18 , 0.52 ± 0.19 , 0.55 ± 0.24 , 0.55 ± 0.11 , 그리고 0.53 ± 0.23 이었다. 하지만 1차 접종 후 3주째에는 그룹 A와 E의 항체 역가는 접종 전과 비슷한 수준인 반면 B~D의 항체 역가는 각각 1.7 ± 0.21 , 0.84 ± 0.17 , 그리고 1.3 ± 0.48 로 증가하였으며, 2차 접종 후 3주 후에는 B~D의 항체 역가는 각각 2.1 ± 0.08 , 1.53 ± 0.17 , 그리고 1.89 ± 0.25 로 증가하였다. 하지만 2차 접종 후 3주 후에도 그룹 A와 E의 항체 역가는 접종 전과 비슷한 수준을 유지하였다.

싸이토 카인 분석

2차 접종 후 10일 째에 각 그룹별 갈색레그혼종 비장세포를 SG OMPs로 재 자극 후 생성된 그룹 A~E의 IFN- γ 에 대한 싸이토 카인 농도는 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 각각 52.61 ± 22.61 , 354.78 ± 95.79 , 125.74 ± 32.54 , 300.02 ± 65.43 , 그리고 56.43 ± 24.16 이었다.

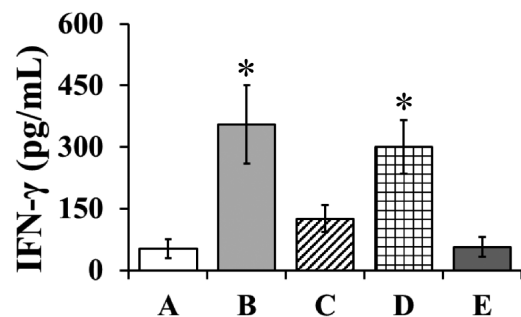


Fig. 2. IFN- γ (pg/mL) concentrations in the supernatants of splenocytes stimulated with OMPs of *Salmonella Gallinarum* at 10 days post booster immunization. Group A chickens (□) were intramuscularly (IM) immunized with sterile PBS; group B chickens (■) were subcutaneously immunized with 5.0×10^7 colony forming units of *S. Gallinarum* 9R vaccine strain; group C chickens (▨) were IM immunized with 3.0×10^9 cells of formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells; group D chickens (▩) were IM immunized with 3.0×10^9 cells of formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells adding 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of mastoparan V1; and group E chickens (■) were IM immunized with sterile PBS. Data are the means for all mice in each group; error bars show SDs. Asterisks indicate a significant difference between the values of groups B, C, and D chickens ($*P < 0.05$) and those of the control group E chickens.

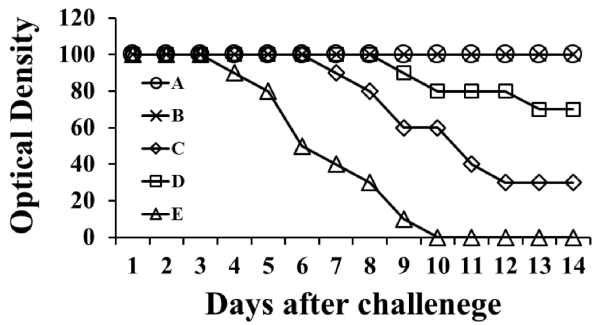


Fig. 3. Survival rates of chickens challenged with virulent *S. Gallinarum* in chickens (except chickens in group A only) immunized with the vaccine candidate. Group A chickens (○) were intramuscularly (IM) immunized with sterile PBS; group B chickens (×) were subcutaneously immunized with 5.0×10^7 colony forming units of *S. Gallinarum* 9R vaccine strain; group C chickens (◇) were IM immunized with 3.0×10^9 cells of formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells; group D chickens (□) were IM immunized with 3.0×10^9 cells of formalin-inactivated *S. Gallinarum* whole cells adding 30 $\mu\text{g/mL}$ of mastoparan V1; and group E chickens (△) were IM immunized with sterile PBS.

병원성 *Salmonella Gallinarum* 도전감염에 대한 방어 효과

백신 2차 접종 후 3주째에 그룹 A의 닭을 제외한 모든 그룹의 갈색레그혼종은 병원성 *Salmonella Gallinarum* 으로 경구로 도전감염 되었고 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉, 도전감염 후 그룹 A(도전감염하지 않은 그룹)와 B의 모든 갈색레그혼종은 실험이 끝날 때까지 생존하였으나, 그룹 C의 갈색레그혼종 10마리 중 3마리만 생존하였으며, 그룹 D의 갈색레그혼종은 10마리 중에서 7마리가 생존한 반면, 대조군인 그룹 E의 모든 갈색레그혼종은 폐사하였다.

고 찰

가금티푸스는 *S. Gallinarum*에 의해 발병되는 질병으로 국내에서는 1992년 이후 발병이 보고되어 현재까지 국내 양계산업에 경제적으로 큰 손실을 초래하는 가금 질병 중 하나이다(김 등, 1995; 이 등, 2000; 김 등, 2006; 배 등, 2009; Kim 등, 2019; Seo 등, 2019). 국내 뿐 아니라 전 세계적으로 약독화 생균 백신 균주인 *S. Gallinarum* 9R vaccine strain이 가금티푸스 예방 백신으로 사용되어 오고 있다. 하지만 여전히 이 백신 균주는 독성이 남아있을 뿐만 아니라 양계 농가에서 원하는 방어 효과가 충분하지 않아(Bouzoubaa

등, 1989; Kwon and Cho, 2011; Van Immerseel 등, 2013; Koerich 등, 2018; Ibe 등, 2019) 보다 안전하고 효과적인 백신 개발에 대한 연구가 시도되고 있는 실정이다(Jawale 등, 2014; Cheng 등, 2016; Won 등, 2016; Hajam 등, 2018). 따라서 본 연구에서는 우선 국내에서 사용되고 있는 약독화 생균 백신과 전통적으로 사용되고 있는 사균화 방법인 포르말린을 이용한 사균체 그리고 포르말린-사균체에 최근 살모넬라균주에 특이적인 항균펩타이드로 알려진 mastoparan V1을 adjuvant로 첨가한 혼합사균체를 백신으로 제조하여 갈색레그혼종에 접종한 후 항체 역가, 세포성 면역 반응 그리고 도전감염 후 방어여부로 그 효능을 평가하였다.

약독화 살모넬라 생균 백신은 자연적인 숙주에서 체액성 및 세포성 면역반응 모두를 증가시켜 병원성 살모넬라에 대한 방어효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Mastroenti 등, 2001). 본 연구에서 약독화 생균 백신을 포함하여 포르말린-불활화 사균체 및 포르말린-불활화 사균체 마스토파란 함유 백신을 갈색레그혼종에 접종한 후 얻은 혈청으로부터 ELISA를 이용하여 *S. Gallinarum* OMPs에 대한 항체역가를 측정하여 본 결과, 모든 백신 그룹에서 대조군인 PBS를 접종한 그룹에 비해 월등한 항체 역가를 관찰하였다. 특히 포르말린-불활화 사균체만을 접종한 그룹보다 포르말린-사균체 마스토파란 함유 사균체 백신 및 약독화 생균백신을 접종한 그룹에서 보다 높은 항체 역가가 관찰되었다. 이는 약독화 생균 백신의 경우에는 이 약독화 생균이 간과 비장에서 일정 기간 생존함으로써 면역반응을 자극하기 때문이며(Matsuda 등, 2010), 마스토파란 함유의 백신의 경우에는 마스토 파란이 adjuvant로서의 역할을 수행한다는 보고(King 등, 2003)에서처럼 면역반응 유도에 도움을 준 결과라고 생각되었다. 가금에서 살모넬라 감염을 근절하기 위해서는 세포성 면역반응이 반드시 필요하다(Setta 등, 2012; Desin 등, 2013). 따라서 가금 티푸스 백신 후보 주들은 가금에 백신 접종 후 세포성 면역 반응 유도 여부를 반드시 확인하여야 한다. 본 실험에서도 모든 백신 접종군은 2차 접종 후(약독화 생균 백신의 경우에는 1차 접종 후) 10일 째에 비장세포로부터 *S. Gallinarum* ONMPs로 재 자극 후 유도된 IFN- γ 를 측정하여 본 결과, 약독화 생균백신뿐만 아니라 포르말린-불활화 마스토파란 함유 사균체에서도 대조군에 비해 유의있는 증가가 관찰되었다. 이상의 결과를 살펴보면 약독화 생균 백신인 *S. Gallinarum* 9R를 접종한 그

뿐만 아니라 포르말린-불활화 마스토파란 함유 사균체를 접종한 그룹에서도 체액성 면역뿐만 아니라 세포성 면역을 유도할 수 있음이 확인되었다.

더불어 갈색레그혼종은 백신후보물질로 2차 근육 접종 후 3주 째(약독화 생균 백신의 경우에는 1차 피하 접종 후 6주 째)에 병독성 *S. Gallinarum*을 경구로 도전감염 한 후 폐사 및 가금티푸스 임상증상을 2주간 매일 하루에 두 번씩 관찰하였다. 그 결과 그림 3에서 보는 바와 같이, PBS를 접종하고 도전감염을 수행한 그룹(그룹 E)에서는 도전감염 후 3일째부터 식욕부진, 설사, 침울 등과 같은 임상 증상이 관찰되기 시작하여 4일 째부터 폐사가 관찰되어 도전감염 10일째에는 모든 대조군 갈색레그혼종이 모두 폐사하였다. 또한 포르말린-불활화 사균체를 접종한 그룹에서도 도전감염 5일 후부터 식욕부진, 설사 침울 등이 관찰되었으며 7일 후부터 폐사하기 시작하여 11일까지 70%의 갈색레그혼종이 폐사하여 30%만이 생존하였다. 하지만 포르말린-불활화 마스토파란 함유 사균체를 접종한 그룹에서는 7일 째부터 임상 증상이 관찰되기 시작하여 도전감염 후 9일 째부터 폐사가 시작되었지만 실험이 종료되는 시점까지 30%만이 폐사하여 70%의 방어율이 관찰되었다. 더불어 약독화 생균 백신을 1회 피하접종한 경우에는 도전감염 후 실험이 끝나는 14일까지 식욕부진, 설사가 관찰되기는 하였지만 폐사는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 포르말린-불활화 마스토파란 V1 함유 사균체 백신 후보는 대조군 및 포르말린-불활화 사균체에 비해 월등한 방어효과가 관찰되었다. 하지만 약독화 생균 백신에 비해서는 다소 낮은 방어효과가 관찰되었다. 따라서 포르말린-불활화 마스토파란 V1 함유 사균체 백신의 가금티푸스 방어 효율을 약독화 생균백신처럼 유사한 비율로 증가시키기 위해서는 다른 adjuvant와의 혼합 내지는 마스토파란 V1의 첨가량 증가, 접종경로의 변경 내지는 보다 많은 량의 사균체 백신의 접종량 등과 같은 연구가 필요하다.

결 론

결론적으로 포르말린-불활화 사균체 mastiparan V1을 근육접종한 갈색레그혼종은 체액성 및 세포성 면역반응을 효과적으로 유도하였으며 병원성 *S. Gallinarum* 도전감염에 대해 효과적으로 방어할 수 있음이 확인되어 마스토파란 V1의 adjuvant로서의 역할이 있음이

확인되었을 뿐만 아니라, 포르말린-불활화 사균체 mastoparan V1 함유 백신은 가금 티푸스 백신으로서 효과가 있음이 입증되었다. 하지만 보다 효과적인 방어효과를 증대시키기 위한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 정부(MISP)의 재원으로 한국연구재단(NRF)의 지원을 받아 연구되었습니다(No. 2017M2A2A6A02020927). 더불어 본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR201711201).

REFERENCES

- 김기석, 이희수, 모인필. 1995. 국내 닭에서의 가금티푸스 발생. 농촌진흥청 농업과학논문집 37(1): 544-549.
- 김성국, 김영환, 엄현정, 장성준, 조광현, 이양수. 2006. 육계에서 분리한 *Salmonella gallinarum*의 약제내성 및 PFGE 양상. 한국가축위생학회지 29: 297-308.
- 배종철, 김성국, 김영환, 조민희, 이영주*, 박청규. 2009. 닭에서 분리한 *Salmonella Gallinarum*의 약제내성 및 PFGE, 한국가축위생학회지 32:155-163.
- 이동석, 한태욱. 2000. 국내에서 분리한 *Salmonella gallinarum*의 병원성, 항생제 감수성 및 plasmid profile. 한국수의공중보건학회지 24(1): 49-57.
- Arora D, Kumar S, Jindal N, Narang G, Kapoor PK, Mahajan NK, 2015. Prevalence and epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum from poultry in some parts of Haryana, India. Vet World 8: 1300-1304.
- Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Kabbaj FZ, Newman JA, Pomeroy BS. 1989. Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens. Avian Dis 33: 385-391.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. Immunol Rev 198: 169-184.
- Chen LW, Kao PH, Fu YS, Lin SR, Chang LS. 2011. Membrane-damaging activity of Taiwan cobra cardiotoxin 3 is responsible for its bactericidal activity. Toxicon 58: 46-53.
- Cheng Z, Yin J, Kang X, Geng S, Hu M, Pan Z, Jiao X. 2016. Safety and protective efficacy of a *spiC* and *crp* deletion mutant of *Salmonella gallinarum* as a live attenuated vaccine for fowl typhoid. Res Vet Sci 107: 50-54.
- Desin TS, Köster W, Potter AA, 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present, and future. Expert Rev Vaccines. 12: 87-96.

- Fashae K, Ogunsola F, Aarestrup FM, Hendriksen RS. 2010. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* from chickens and humans in Ibadan, Nigeria. *J Infect Dev Ctries* 4: 484-494
- Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. 2017. Insects, arachnids and centipedes venom: A powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicon* 130: 91-103.
- Ha YJ, Kim SW, Lee CW, Bae CH, Yeo JH, Kim IS, Gal SW, Hur J, Jung HK, Kim MJ, Bang WY. 2017. Anti-*Salmonella* activity modulation of mastoparan V1-a aasp venom toxin-using protease inhibitors, and its efficient production via an *Escherichia coli* secretion system. *Toxins* (Basel). 9: 321.
- Hajam IA, Kim J, Lee JH. 2018. Oral immunization with a novel attenuated *Salmonella* Gallinarum encoding infectious bronchitis virus spike protein induces protective immune responses against fowl typhoid and infectious bronchitis in chickens. *Vet Res* 12;49(1): 91.
- Hajam IA, Kim JH, Lee JH. 2018. Incorporation of membrane-anchored flagellin into *Salmonella* Gallinarum bacterial ghosts induces early immune responses and protection against fowl typhoid in young layer chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 199: 61-69.
- Hetru C, Letellier L, Ziv O, Hoffmann JA, Yechiel S. 2000. Androctonin, a hydrophilic disulphide-bridged non-haemolytic anti-microbial peptide: A plausible mode of action. *Biochem J* 345: 653-664.
- Hur JI, Song SO, Lim JS, Chung IK, Lee JH. 2011. Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella* Typhimurium vaccine for protection against *Salmonella* infections in growing piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 139(2-4): 250-256.
- Ibe MI, Odimegwu DC, Onuigbo EB. 2019. Alginate-coated chitosan microparticles encapsulating an oral plasmid-cured live *Salmonella enterica* serovar Gallinarum vaccine cause a higher expression of interferon-gamma in chickens compared to the parenteral live vaccine. *Avian Pathology* 48(5): 423-428.
- Jawale CV, Chaudhari AA, Lee JH. 2014. Generation of a safety enhanced *Salmonella* Gallinarum ghost using antibiotic resistance free plasmid and its potential as an effective inactivated vaccine candidate against fowl typhoid. *Vaccine* 32(9): 1093-9.
- Jawale CV, Lee JH. 2014. A novel approach for the generation of *Salmonella* Gallinarum ghosts and evaluation of their vaccine potential using a prime-booster immunization strategy. *Vaccine* 32: 6776-6782.
- Kang MS, Kwon YK, Jung BY, Kim A, Lee KM, An BK, Song EA, Kwon JH, Chung GS. 2011. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. *Vet Microbiol* 147(1-2): 181-5
- Kim NH, Ha EJ, Ko DS, Lee CY, Kim JH, Kwon HJ. 2019. Molecular evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum in the field. *Vet Microbiol* 235: 63-70.
- Kim Y, Son M, Noh E-Y, Kim S, Kim C, Yeo J-H, Park C, Lee KW, Bang WY. 2016. MP-V1 from the venom of social wasp *Vespula vulgaris* is a de novo type of mastoparan that displays superior antimicrobial activities. *Molecules* 21: 512.
- King TP, Jim SY, Wittkowski KM. 2003. Inflammation role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. *Int Arch Allergy Immunol* 131(1): 25-32.
- Koehbach J, Craik DJ. 2019. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends Pharmacol Sci* 40: 517-528.
- Koerich PKV, Fonseca BB, Balestrin E, Tagliari V, Hoepers PG, Ueira-Vieira C, Oldoni I, Rauber RH, Ruschel L, Nascimento VP. 2018. *Salmonella* Gallinarum field isolates and its relationship to vaccine strain SG9R. *Br Poult Sci* 59(2): 154-159.
- Kuhn-Nentwig, L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci* 60: 2651-2668.
- Kwon HJ, Cho SH. 2011. Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. *Vaccine* 29: 1311-1318.
- Lee SK, Chon JW, Song KY, Hyeon JY, Moon JS, Seo KH. 2013. Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poult Sci* 92: 2789-2797.
- Machado RJA, Estrela AB, Nascimento AKL, Melo MMA, Torres-Rego M, Lima EO, Rocha HAO, Carvalho E, Silva-Junior AA, Fernandes-Pedrosa MF. 2016. Characterization of TistH, a multifunctional peptide from the scorpion *Tityus stigmurus*: Structure, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Toxicon* 119: 362-370.
- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. 2001. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 161: 132-164.
- Matsuda K, Chaudhari AA, Kim SW, Lee KM, Lee JH. 2010. Physiology, pathogenicity and immunogenicity of lon and/or *cpxR* deleted mutants of *Salmonella gallinarum* as vaccine candidates for fowl typhoid. *Vet Res* 41: 59.
- Moon JY, Kim SY, Kim WK, Rao Z, Park JH, Mun JY, Kim B, Choi HS, Hur J. 2017. Protective efficacy of a *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine candidate constructed with a recombinant lysozyme-PMAP36 fusion protein in a murine model. *Can J Vet Res* 81(4): 297-303.
- Oguiura N, Boni-Mitake M, Affonso R, Zhang G. 2011. In Vitro antibacterial and hemolytic activities of crotoamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *J Antibiot* 64: 327-331.
- Powers J-PS, Hancock REW. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691.
- Ramirez-Carretero S, Jimenez-Vargas JM, Rivas-Santiago B, Corzo

- G, Possani LD, Becerril B, Ortiz E. 2015. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. *Peptides* 73: 51-59.
- Seo KW, Kim JJ, Mo IP, Lee YJ. 2019. Molecular characteristic of antimicrobial resistance of *Salmonella* Gallinarum isolates from chickens in Korea, 2014 to 2018. *Poult Sci* 98(11): 5416-5423.
- Setta AM, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA. 2012. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis* 35: 397-410.
- Shivaprasad HL. 2000. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev Sci Tech* 19: 405-424.
- Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF. 1981. Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis* 25: 38-52.
- Van Immerseel F, Studholme DJ, Eeckhaut V, Heyndrickx M, Dewulf J, Dewaele I, Van Hoorebeke S, Haesebrouck F, Van Meirhaeghe H, Ducatelle R, Paszkiewicz K, Titball RW. 2013. *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. *Vaccine* 31(43): 4940-5.
- Wang K, Li Y, Xia Y, Liu C. 2016. Research on Peptide Toxins with Antimicrobial Activities. *Ann Pharmacol Pharm* 1: 1006.
- Wigley P. 2017. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: addressing fundamental questions in bacteriology sixty years on from the 9R vaccine. *Avian Pathol* 46: 119-124
- Won G, Chaudhari AA, Lee JH. 2016. Protective efficacy and immune responses by homologous prime-booster immunizations of a novel inactivated *Salmonella* Gallinarum vaccine candidate. *Clin Exp Vaccine Res* 5(2): 148-58.
- Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE. 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci* 68: 2161-2176.