

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호

별 간 등 록 번 호

11-15410000-001026-01

계란 및 계육에서 유래하는 식중독균의 제어기술

개발에 관한 연구

(Control of food-borne bacteria from eggs and poultry meat)

식중독균 제거기술의 임상 및 생산공정 연구 (세부과제)

대사변이주 및 온도감수성 변이주를 이용한 식중독균 제거기술 개발
(제1협동과제)

영양 요구성 변이주를 이용한 식중독균 제거기술 개발 (제2협동과제)

(주)중앙백신연구소

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “계란 및 계육에서 유래하는 식중독균의 제어기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011년 12월 05일

주관연구기관명 : (주)중앙백신연구소

주관연구책임자 : 김 은 희

세부연구책임자 : 김 은 희

연 구 원 : 최 환 원

연 구 원 : 강 성 호

연 구 원 : 강 석 휘

연 구 원 : 김 동 원

연 구 원 : 원 호 근

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 한 태 육

연 구 원 : 최 원 종

연 구 원 : 신 은 경

연 구 원 : 선 지 선

연 구 원 : 홍 은 진

협동연구기관명 : 건양대학교

협동연구책임자 : 이 준 행

연 구 원 : 정 선 아

연 구 원 : 이 정 진

요약문

I. 제목

계란 및 계육에서 유래하는 식중독균의 제어기술 개발

(Control of food-borne bacteria from eggs and poultry meat)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 및 전 세계적으로 문제되는 계란 및 계육의 섭취로 인해 발생하는 식중독을 막기 위하여 국내에서 생산되는 계란 및 계육에서 위해 미생물의 분리 및 동정, 특성 파악을 한 후, 이를 축산식품을 통해 이행하는 대표 위해 미생물의 예방기술을 개발하여 사람에게 발생하는 식중독에 대한 대비체제를 구축하고, 아울러 소비자에게는 축산식품에 대한 신뢰도를 높이고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내에서 유통하는 계란 및 계육내에 존재하는 위해 미생물인 *Salmonella Enteritidis*의 분리 동정과 더불어 식중독 환자에서 분리된 *Salmonella Enteritidis*의 파아지 타입, 유전형 분석 및 항생제 내성 분석을 통해 계육(계란)과 사람에게서 분리한 병원체의 연관성 규명
2. 식중독을 일으키는 대표 *Salmonella Enteritidis* 균주를 이용한 불활화 백신, 온도감수성 변이주, 대사 변이주, 영양요구성 변이주의 개발
3. 개발된 변이주에 대한 방어효과와 안전성 검증을 위한 임상연구
4. 가금티푸스도 예방하는 *Salmonella Enteritidis*백신 후보주의 선발
5. 탁월한 효능을 지닌 후보백신주의 선발 및 대량생산 공정개발

IV. 연구개발결과에 대한 요약

1. *S. Enteritidis* 균주의 특성조사

*Salmonella Enteritidis*를 계란 및 계육, 닭에서 분리한 분리주 108주와 식중독을 일으킨 환자의 설사에서 분리한 분리주 65주로 포함해서 총 173주를 대상으로 항생제 내성, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 통한 유전형의 분석, phage형의 분석 등을 실시하였다. 항생제 내성분석결과, streptomycin (32.3%), ampicillin (30.6%), nalidixic acid (30.1%), ticarcillin (30.1%), 및 tetracycline (28.3%)에 대해 내성을 나타냈고 70% 이상의 분리주가 1가지 종류 이상의 항생제에 내성을 보였다. 분리주가 나타내는 항생제 패턴중 가장 높은 항생제 패턴을 보이는 것이 nalidixic acid (28.3%) 단일 내성패턴이었고 2제이상의 내성을 보이는 것이 20.2%를 나타냈다. Phage형 분석결과 가장 높은 phage형 (PT)은 PT1 (27.2%), PT21 (20.8%)과 PT4 (8.7%)순으로 나타났다. 국내분리주 173주를 PFGE 분석결과 총 19가지의 PFGE 패턴으로 분류되었고 그중 A1 이 가장 많았고 그 다음으로 A6 (17.3%)가 차지하였다. 일부 B와 C PFGE패턴을 제외한 대부분의 *S. Enteritidis* 분리주는 1 개의 밴드차이를 나타났다. 이러한 결과를 종합해 보면 국내의 *S. Enteritidis* 분리주는 크게 2 ~ 3 가지 subtype으로 분류되는 것 같고 닭이나 닭생산품을 통해 사람에게 전파되는 것을 암시하고 있다.

2. *S. Enteritidis* 불활화백신주 개발결과

S. Enteritidis 예방을 위한 불활화 백신을 제조하기위해 173주의 *S. Enteritidis*를 대상으로 PFGE type, 항생제 내성패턴, phage type 등을 기초로 하여 가장 대표적인 *S. Enteritidis* 총 11균주를 선발한 후 병아리에서 병원성을 평가한 후 선발된 백신균주로 불활화 백신을 제조한 후 마우스 및 닭에서의 방어효과를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 첫째, 선택한 총 11주 *S. Enteritidis*를 병아리에 6×10^7 cfu/0.2ml으로 1차 접종한 후 가장 높은 병원성을 보인 4주의 분리주를 선발하였으며, 이를 균주, 즉 B365, B369, B277과 B295 폐사율은 각각 100%, 90%, 77.5%, 57.5%였다. 이 네 균주를 3×10^7 cfu/0.2ml으로 접종한 후 가장 높은 병원성을 보인 닭 분리주 B277과 사람 분리주 B369를 산발하였다. 폐사율은 각 26.7%, 56.7%로 나타나고 맹장에서 각각 60% 균 분리율을 나타났다. 둘째, B369와 B277 두 균주를 선발하여 adjuvant ISA70로 제조된 불활화백신은 mouse에서 접종한 후 wild type로 공격 접종 후 생존율 90%로 나타났다. 셋째, 불활화백신을 닭에 접종한 후 3주에 항체가가 유의성 있게 나타났으며, 공격접종 6일 후 높은 항체가가 3주까지 관찰되었다.

3. *S. Enteritidis* 폴리인산키나아제결손변이주의 개발

Polyphosphate는 살모넬라를 비롯한 수종의 세균종에서 stress에 대한 저항성과 관련되어 있다. Polyphosphate를 생성하는 polyphosphate kinase (PPK)는 세균의 정체적 단계 (stationalry phase) 에서의 생존성에 직접적인 연관이 있는 것으로 알려져 있고 병원성관련 유전자로 보고되고 있다. 그러나 PPK가 *S. Enteritidis*의 병원성과 관련된 연구보고가 없기 때문에 PPK결손 변이주의 병원성 소실과 이를 이용한 약독화생균백신 개발을 시도하였다. 따라서 본 연구에서는 PPK가 결손된 SE변이주를 제조하였다. P22 transduction을 이용하여 두 개의 SEppk변이주를 선발하여 세균의 침투성, heat shock에 저항성, 증식성 등을 wild type과 비교하였을 때 침투성과 heat shock에 대한 저항성은 wild type에 비해 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 또한 마우스에서의 병원성을 폐사율을 기준으로 측정한 결과 접종량에 따라 폐사정도는 다르나 wild type에 비해 병원성이 소실된 것으로 나타났다. 그러나 병아리에서의 병원성 실험을 한 결과 간, 비장, 및 뱉장에서의 분리율이 wild type에 비교할 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 최근 *S. Typhimurium* PPK변이주는 닭과 마우스에서 병원성이 소실되나 *S. Gallinarum*에서는 닭에서의 병원성이 전혀 소실되지 않는다는 최근의 연구결과와 일치하는 것으로 PPK변이주가 *Salmonella*의 혈청형에 따라 약독화 정도가 다를 수 있음으로 확인되었다.

4. *S. Enteritidis* 영양요구성변이주의 개발

S. Enteritidis 분리주를 가지고 영양요구성변이주의 개발의 일환으로 방향족 아미노산 생합성 과정에 관여하는 aroA유전자 결손 변이주를 제작하였다. aroA유전자가 결손된 것을 확인하였고 최소배지와 방향족 아미노산이 첨가된 혼합배지에서 증식성을 비교한 결과 SE aroA 결손변이주는 최소배지에서는 전혀 증식하지 않지만 방향족 아미노산 혼합배지에서는 증식이 잘 일어나는 것이 관찰되었다. 이 변이주의 병원성이 소실된 것을 마우스에서 측정한 결과, SE wild type의 경우 $10^7\sim10^9$ cfu를 접종한 마우스에서 모두 100%폐사를 보였으나 2개의 SE aroA결손변이주(B46과 W1)는 10^9 cfu접종 마우스군에서는 100% 폐사되었으나 $10^7\sim10^8$ cfu 접종군에서는 100%생존하였다.

5. *S. Enteritidis* 온도감수성 변이주 개발

시판되고 있는 살모넬라 생균백신 중 온도감수성 변이주가 있는 것을 확인하여 본 연구과제에서는 온도감수성 변이주를 제조하였다. 국내 *S. Enteritidis* 분리주중 대표적인 국내분리주인 SE369와 SE277을 사용하여 NTG를 처리하여 28°C에서는 증식이 잘되고 37°C에서는 증식이 거의 일어나지 않는 온도감수성 변이주를 제조하였다. SE369의 경우 온도감수성 변이

주는 총 10개가 선발되었으나 SE277주의 경우 1주의 변이주만 선발되었다. 이들 변이의 병원성을 마우스에서 병원성을 측정한 결과 SE 369 및 SE277의 wild type의 경우 $10^7 \sim 10^9$ cfu를 접종한 마우스에서 20~40% 또는 100% 폐사를 보였으나 각각의 온도변이주들은 $10^7 \sim 10^9$ cfu에서 모두 생존하였다.

6. *S. Enteritidis* 이중변이주의 개발 및 방어효과 및 교차방어효과 조사

이중 변이주를 만들기 위해 상기에 제조한 SEppk변이주를 사용하여 온도 감수성 변이주(ppk변이 및 온도감수성 변이를 포함한 이중변이주, SEppk-ts변이주)를 제작하였다. 총 7개의 온도감수성 변이주를 선발하였다. SEppk변이주는 37°C와 28°C에서 각각 1.5×10^{10} cfu/ml와 6.2×10^9 cfu/ml를 보이는 반면 SEppk-ts 변이주는 28°C에서 $3.1 \times 10^9 \sim 6.6 \times 10^{10}$ cfu/ml를 보이는 반면에 37°C에서는 $0 \sim 6.0 \times 10^6$ cfu/ml를 보이는 것으로 나타났다. 이들 변이주에 대한 병원성을 마우스를 사용하여 10^7 , 10^8 , 10^9 cfu를 접종한 후 관찰한 결과 SE wild type에서는 각 용량에서 모두 폐사하였고, SEppk변이주에서는 10^9 cfu을 접종한 군에서는 모두 폐사하였으나 10^8 cfu 및 10^7 cfu 접종군에서는 60%와 100%의 생존율을 보였다. 그러나 SEppk-ts 변이주들의 접종군에서는 세 가지 농도의 접종량에서 모두 100% 생존율을 보였다.

SEaroA대사변이주 (B46과 W1)을 사용하여 온도감수성 변이주를 제조한 결과 W1주에서 1주의 온도감수성변이주가 제조되었다 (SEaroA-ts). SEaroA변이주의 경우 28°C와 37°C에서 각각 $4.6 \sim 7.4 \times 10^9$ cfu/ml 및 $6.5 \sim 8.4 \times 10^9$ cfu/ml를 나타내는데 비해 SEaroA-ts주는 28°C와 37°C에서 각각 6.7×10^9 와 2.7×10^5 cfu/ml를 나타냈다. 이들 변이주의 병원성을 마우스를 사용하여 10^7 , 10^8 , 10^9 cfu를 접종한 후 관찰한 결과 SEaroA변이주는 10^9 cfu을 접종한 군에서는 모두 폐사하였으나 10^8 및 10^7 cfu 접종군에서는 모두 100%의 생존율을 보였다. 그러나 SEaroA-ts변이주는 접종량에 관계없이 모두 100%의 생존율을 보여 병원성이 많이 소실된 것으로 나타났다.

SE온도감수성변이주와 이중변이주 (SEppk-ts 및, SEaroA-ts)변이주의 온도감수성에 대한 안전성을 조사하고자 각각의 변이주를 5회 계대배양한 후 reversion rate을 조사한 결과 가장 낮은 reversion rate을 보이는 것은 SEppk-ts, SEts, SEaroA-ts순으로 나타났다.

각각의 단일 변이주 또는 이중 변이주가 생균백신균주로 사용될 수 있는지를 확인하기 위해 마우스를 사용하여 방어력을 시험하였다. 6-8주령의 마우스에 변이주를 동량으로 마우스의 복강에 접종한 후 3주후에 100LD_{50} 의 공격접종균주를 복강으로 접종하였다. 공격접종후 3주 동안 폐사를 측정한 결과 무접종대조군에서는 0%의 생존율을 나타낸 반면에 SEppk-ts-3군 주와 SE277ts-1을 접종한 군에서는 100%의 생존율을 보여 가장 우수한 방어효과를 나타냈

고 백신접종에 대한 부작용도 없는 것으로 나타났다. 그러나 대사변이주인 SEaroA와 SEaroA-ts변이주를 접종한 군은 50~60%의 생존율을 나타냈다.

마우스를 사용한 방어시험에서 가장 우수한 방어효과를 보인 SEppk-ts-3과 SE277ts-1군 주를 목적동물인 닭에서 방어효과를 조사하였다. 2주령의 SPF닭에 10^9 CFU의 양으로 경구로 3주간격으로 2회 접종한 후 3주후에 공격접종을 1×10^8 cfu/dose/0.5mL을 경구와 피하로 접종하였다. 백신접종전, 2차접종 2주후, 공격접종 후 18일째에 채혈을 한 후 항체가를 측정한 결과 2차접종후부터 항체가 검출되기 시작했다. 또한 간, 비장, 및 맹장내에 균 검출율이 백신비접종 대조군에 비해 낮게 검출되는 것으로 나타났다. 이중 방어효과가 좋은 SEppk-ts-3군주에 대한 방어효과를 접종횟수에 따른 방어효과를 재시험하였다. 3-4주령의 SPF닭을 8수씩 2군으로 나눈 뒤 1군에서는 SEppk:ts-3을 피하로 10^9 CFU씩 1회 접종하였고 2회 접종군에서는 2주뒤에 동량으로 2차 접종을 실시하였다. 2차접종 후 2주뒤에 공격접종군 주로 공격 접종(1×10^8 cfu/dose/0.5mL)을 실시한 후 접종후 7일과 14일 뒤에 비장, 간 및 맹장에서 균분리를 실시하였다. 균분리율은 대조군에 비해 2회접종군과 1회접종군이 훨씬 낮은 검출율을 보여 생균백신에 의한 방어효과가 있음이 확인되었다. 이러한 결과를 다시 확인하기 위해 동일한 시험을 실시한 결과 백신접종군이 유의성이 있게 맹장, 간, 비장에서의 검출율이 대조군에 비해 훨씬 낮게 나타났다.

본 연구과제에서의 개발된 SE불활화 백신, SE 약독화 변이주가 가금티푸스를 일으키는 *S. Gallinarum*에 대한 교차방어효과를 확인하기 위해 3-4주령의 갈색산란계를 사용하여 방어효과를 살펴본 결과 SE불활화 백신과 생균백신은 가금티푸수 9R백신의 방어율 대비 84.3%의 방어율을 보였다. 따라서 본 연구과제에서 개발한 SE불활화 백신주 및 약독화 변이주는 국내에서 유행하고 있는 *S. Enteritidis*의 감염에 대해 효과적으로 방어할 수 있는 예방백신으로 사용할 수 있으리라 판단된다.

V. 연구개발결과에 대한 추후 계획

본 연구성과는 불활화백신의 경우 현재 진행중인 농장에서의 임상시험을 거쳐 제품허가를 획득할 계획이며 계란 및 계육을 통해 식중독을 일으키는 살모넬라 타 혈청형, 예를 들어 *S. Typhimurium*이나 대장균을 혼합한 이종백신으로 사용할 계획이다. 생균백신의 경우 추가적인 방어효과시험과 임상시험을 거쳐 특허를 출원할 계획이며 궁극적으로 제품허가를 신청할 계획이다. 아울러 SE불활화백신은 현재 기술이전단계에 있어 조만간 품목허가를 거쳐 시판될 예정이다.

SUMMARY

Salmonella Enteritidis is the most common cause of salmonellosis in humans in South Korea. It has been recognized that the principal source of human infection with *S. Enteritidis* is chickens and their products such as meat and eggs. A total of 173 *S. Enteritidis* isolates from humans (65 isolates) and chickens or their products (108 isolates) were analyzed by antibiotic susceptibility assay, phage typing, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Drug resistance was found to streptomycin (32.3%), ampicillin (30.6%), nalidixic acid (30.1%), ticarcillin (30.1%), and tetracycline (28.3%). More than 70% of the isolates were found to be resistant to one or more antibiotics tested. The most frequent patterns of resistant isolates were resistance to nalidixic acid only (28.3%) and resistance to two antibiotics (four combinations; 20.2%). The most predominant phage type (PT) was PT1 (27.2%) followed by PT21 (20.8%) and PT4 (8.7%) in chicken and human isolates. Nineteen different PFGE patterns were found among the 173 isolates, and A1 was the most common PFGE pattern, followed by A6 (17.3%). Most *S. Enteritis* isolates (except two isolates with patterns B and C) showed similar PFGE patterns that differed by only a few bands. These results show that 2 or 3 subtypes of *S. Enteritidis* are shared to a large extent by humans and chickens. This implies the possibility of the spread of chicken *S. Enteritidis* to humans.

Also we evaluated a newly developed killed bacterin using a representative SE isolate in Korea. Among pool of SE isolates, two highly virulent isolates (the one isolate from chicken, the other from human) were selected by measuring mortality in mouse and chickens administered. The chickens were injected intramuscularly with killed vaccine and were challenged with highly virulent SE strain 3 week after vaccination. The recovered colony count (cfu/g) of spleen and cecal content in the vaccinated groups was reduced compared with those of the unvaccinated control group. The antibody level in the vaccinated groups was higher at 3 week post vaccination. These results indicate that vaccination with killed vaccine was effective in preventing the infection of virulent SE. Further study for a large number of layers

should be needed for the effect of egg production, SE shedding in feces, persistence of antibody level.

Polyphosphate is involved in resistance to stress in a number of bacterial species; however, its role in the virulence of *S. Enteritidis* has not described. Two SEppk mutants were produced and selected after transduction using P22 bacteriophage carrying defective ppk gene. Polymerase chain reaction (PCR) proved that SEppk mutants had defective ppk gene compared with the ppk gene in wild type. Compared with *S. Enteritidis* wild type, invasion and resistance to heat shock in SEppk mutants were reduced but growth in regular media was not different with that of *S. Enteritidis* wild type. The virulence of SEppk mutants was significantly attenuated following intraperitoneal infection of ICR mice. However, inactivation of the ppk gene of *S. Enteritidis* did not affect the virulence in SPF chickens because recovery rate of SE in spleen, liver and ceca was similar between *S. Enteritidis* wild type and SEppk mutants. In previous study, the virulence of *S. Typhimurium* defective ppk mutant was significantly attenuated following oral infection of chickens and mice but *S. Gallinarum* mutant defective ppk gene was not attenuated in its virulence. Therefore, the differential contribution of polyphosphate to the virulence of *S. Typhimurium* and *S. Gallinarum* may reflect aspects of the pathogenesis and host range of these serovar.

S. Enteritidis aroA mutants, unable to grow in host tissue, were constructed and selected. The aroA gene was defective in the mutants by PCR and nucleotide sequencing. The mutants also were characterized in that mutants were not grown in the minimal medium but were grown in minimal medium supplemented with aromatic amino acid mixture. Two *S. Enteritidis* aroA mutants (B46 and W1) were intraperitoneally inoculated ($10^7\sim 10^9$ cfu) in mice, all inoculated mice were survived at all range of inoculum while the mice inoculated with the wild type were all dead.

Temperature-sensitive *S. Enteritidis* mutants able to grow well at 28°C but not 37°C have been produced and tested for their pathogenicity in mice. When the mutants were intraperitoneally inoculated ($10^7\sim 10^9$ cfu) in mice, all inoculated mice were survived at all range of inoculum while the mice inoculated with the wild type were all dead.

To evaluate protection of *S. Enteritidis* mutants as a live attenuated vaccine, the mice were vaccinated with the mutants. At 3 weeks later, the vaccinated mice were challenged with 100LD₅₀ highly virulent *S. Enteritidis*. In control groups, all mice were dead while the mice vaccinated with SEppk-ts-3 and SE277ts-1 mutants were all live which these mutants were protected from the highly virulent *S. Enteritidis* infection.

The protection of double *S. Enteritidis* mutants, SEppk-ts-3 and SE277ts-1 was evaluated in the chickens. The SPF chickens were vaccinated with 10⁹ CFU orally and were vaccinated again on three weeks post 1st vaccination. The chickens were challenged subcutaneously and orally with 1x 10⁸cfu/dose/0.5mL. The antibodies to *S. Enteritidis* began to be detected from the second vaccination. Fewer challenge bacteria were recovered from the cecal contents, liver and spleen 2 weeks post-challenge. An alternate vaccination scheme of the SEppk:ts-3 (10⁹ CFU for vaccination once versus twice vaccination 2 weeks apart) also decreased colonization of internal organs, spleen, liver, and the cecal contents when the chickens were challenged with 1 x 10⁸cfu/dose/0.5mL virulent *S. Enteritidis*.

The inactivated vaccine and the SEppk:ts-3 attenuated strain was shown to give cross-protection against *S. Gallinarum* which is the agent of fowl typhoid.

In summary, these data indicate that the inactivated *S. Enteritidis* vaccine and the several *S. Enteritidis* mutants including SEppk:ts-3 could be considered as a valuable tool in controlling the *S. Enteritidis* which is major food poisoning in humans.

CONTENTS

Submission	1
Abstract	2
Summary	7
Contents (English)	10
Contents (Korean)	12
Chapter 1. Introduction	15
1. The necessity and Importance	15
Chapter 2. Present state in the techniques	19
1. Present state of International techniques	19
2. Present state of our related techniques	20
Chapter 3. Purpose and Methods	22
1. Purpose of research development	22
2. Detailed annual plan	22
1) First year development purpose and plan	22
2) Second year development purpose and plan	23
3) Third year development purpose and plan	24
4) Fourth year development purpose and plan	24
3. Range and methods of research development	25
1) Characterization of <i>S. Enteritidis</i> field isolations	25
2) Inactivated vaccine development of <i>S. Enteritidis</i>	27
3) <i>ppk</i> gene and temperature sensitivity mutant development of <i>S. Enteritidis</i>	29
4) Vaccine efficiency test	32
5) General experiments	34
6) Safety confirmation test	39
7) Experimental animal antibody titer measurement	39

4. Results	40
1) Characterization of <i>S. Enteritidis</i> field isolations	40
① Antibiotic resistance analysis	40
② PFGE and Phage type patterns	43
③ Correlation with antibiotic resistance, genotype and phenotype	45
2) Inactivated vaccine development of <i>S. Enteritidis</i>	49
① Selection of vaccine strains	49
② Growth pattern, inactivation methods and adjuvant selection of selected strains	53
③ Vaccine efficiency test	57
3) Live vaccine research	63
① Selection of challenge strains	63
② Polyphosphate kinase(<i>ppk</i>) mutant strain of <i>S. Enteritidis</i>	65
③ Aromatic acid A(<i>AroA</i>) mutant of <i>S. Enteritidis</i>	70
④ Temperature sensitive(ts) mutant of <i>S. Enteritidis</i>	79
⑤ Temperature sensitive mutant based on <i>ppk</i> mutant	82
⑥ Aromatic acid A(<i>AroA</i>) mutant based on ts mutant	85
⑦ Aromatic acid A(<i>AroA</i>) mutant based on <i>ppk</i> mutant	87
⑧ Comparison with single mutants and double mutants	90
Chapter 4. Evaluation and Contribution related fields	97
Chapter 5. Achievement and Plan of practical use	100
Chapter 6. Science and Technology Information	102
Chapter 7. References	104

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	7
CONTENTS (영문목차)	10
목차	12
제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	19
제 1 절 국내외 기술개발 현황	19
제 2 절 본 연구팀의 선행연구 수준	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절 연구개발의 목표 및 내용	22
제 2 절 연차별·세부과제별 연구개발의 목표 및 내용	22
1. 1차년도 개발목표 및 개발내용	22
2. 2차년도 개발목표 및 개발내용	23
3. 3차년도 개발목표 및 개발내용	24
4. 4차년도 개발목표 및 개발내용	24
제 3 절 연구개발 범위 및 실험방법	25
1. S.Enteritidis의 특성규명 시험	25
2. S. Enteritidis의 불활화 백신 개발 시험	27
3. S. Enteritidis의 ppk변이주에서 온도변이주 (ppk변이주+ ts주) 시험	29
4. S. Enteritidis백신 효능평가를 위한시험	32
5. 일반시험	34
6. 안정성 확인 시험	39
7. 목적동물 역가 시험	39

제 4 절 연구개발 수행결과	40
1. <i>S. Enteritidis</i> 의 분리·동정 및 특성 규명	40
가. 항생제 내성 패턴 분석	40
(1) 다제내성	40
(2) 항생제내성 패턴의 변화	40
나. PFGE 와 Phage type	43
(1) PFGE	43
(2) Phage type	44
다. PFGE 과 phage type과 항생제 내성	45
2. <i>S. Enteritidis</i> 의 불활화 백신 개발을 위한 연구	49
가. <i>S. Enteritidis</i> 의 불활화 백신용 백신균주 선발	49
나. 불활화 백신 제조를 위한 <i>S. Enteritidis</i> 의 증식성 시험, 불활화 방법, 보조제 선발, 항원량 결정	53
다. <i>S. Enteritidis</i> 불활화 시험백신에 대한 시험	57
3. <i>S. Enteritidis</i> 의 생균 백신 개발을 위한 연구	63
가. 생균백신방어능 분석을 위한 공격접종균주의 선발	63
나. <i>S. Enteritidis</i> 의 polyphosphate kinase (ppk) 변이주	65
다. <i>S. Enteritidis</i> 의 영양요구성 변이주 (aroA주)	70
라. <i>S. Enteritidis</i> 의 온도 변이주 (ts주)	79
마. <i>S. Enteritidis</i> 의 ppk변이주에서 온도변이주 (ppk변이주+ ts주)	82
바. <i>S. Enteritidis</i> 의 aroA변이주를 사용한 온도변이주 (aroA주+ ts주)	85
사. <i>S. Enteritidis</i> 의 ppk변이주를 사용한 aroA주 (ppk변이주+ aroA주)	87
야. <i>S. Enteritidis</i> 의 단일변이주들과 더블변이주들의 비교 실험	90
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	97
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	100
1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	100
2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	100

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	100
4. 추가연구, 타연구에 활용 계획	101
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	102
제 7 장 참고문헌	104

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성

국민 1인당 계란의 소비는 미국의 경우 년간 254개, 국내의 경우는 193개이며, 계육의 소비는 미국의 경우 45.4 Kg이고 국내의 경우는 12.2 Kg, 유럽의 경우는 16.4 Kg으로 매년 증가하는 추세이다. 특히 국내의 경우 최근 몇 년간 계란과 계육의 소비는 증가추세에 있다. 전 세계적으로도 축산 식품을 통한 식중독은 해마다 증가되고 있으며, 그 중 살모넬라에 의한 식중독이 해마다 팔목할 정도로 증가하고 있는 추세이다.

계란 및 계육에서 보고된 위해 미생물은 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* 등이나 최근 미국과 EU를 중심으로 살모넬라의 오염이 가장 큰 문제로 대두되고 있다. 전세계적으로 발생하는 살모넬라의 식중독 중 *Salmonella Enteritidis* (SE)는 살모넬라 식중독 중 가장 주요한 원인이 되고 있으며, 계란 또는 계육을 통해 사람의 SE에 의한 식중독이 가장 큰 관련성이 있다고 보고되었다. 사람에서 일어나는 살모넬라 식중독의 60-70%가 계란 또는 계육이 원인이라고 하며 2004년 영국의 경우 계란 290개당 한 개가 *Salmonella*에 오염되어 있다는 보고가 있다.

S. Enteritidis (SE)는 1970년 후반부터 유럽과 아메리카 대륙에서 발생이 분포하였고 미국의 경우 살모넬라에 의한 식중독이 연간 140만 건이 보고되고 있고, 그 중 400명이 사망하였다. 과거에는 *S. Typhimurium*이 살모넬라 식중독의 가장 큰 원인이었는데, 1990년부터 SE가 가장 큰 문제로 대두되고 있다. 특히, 1996년도에는 미국의 경우 살모넬라 식중독의 25%를 SE가 차지하고 있다.

국내에서 식중독 환자의 발생을 집계해 보면, 작년 국감 자료에 의하면 지난 4년간 식중독 환자가 4년간 187만명이 집계되었고 (이는 식약청 통계보다 62배 높은 수치임) 식약청이 발표한 최근 5년간 원인균별로 분류하면 살모넬라에 의한 식중독이 가장 많은 것으로 보고되고 있다(년도에 따라 13%-32%를 차지). 살모넬라가 사람의 식중독의 주요 원인체이라는 보고는 질병관리본부의 통계자료에도 유사하게 나타나 있다(Table 1-1).

국내의 식중독 원인 살모넬라 혈청형에 따른 분포를 보면 최근 10년 동안 살모넬라 혈청형 중 SE가 차지하는 비율이 42%로서 살모넬라에 의한 식중독의 거의 절반을 차지하고 있다(Table 1-2). 2002년부터 2003년까지 국내의 양계관련 산업에서 살모넬라 오염도를 조사

한 결과 종계장 (38.7%), 부화장 (88.5%), 실용계농장 (70%), 닭 도축장 (94.1%)가 살모넬라균에 오염되어 있음이 확인되었고, *S. Enteritidis*의 오염율이 분야별 1.7~75%로 가장 주된 오염원으로 나타났고 특히 최종 도계육에서 69.4%의 오염율을 보여 사람으로 이행되어 식중독을 일으킬 수 있는 확률이 매우 높은 것으로 사료된다.

계란과 계육에서 오염된 *S. Enteritidis*가 사람의 식중독을 일으키는 관련성은 선진국의 경우 이미 광범위한 조사가 있으나, 국내의 경우 계란과 계육에서 분리된 SE가 사람의 식중독을 일으킨다는 연관성에 대해서는 전무한 실정이다. 선진국의 경우 *S. Enteritidis*에 의한 식중독은 주로 생계란이나 가열하지 않은 계란에서 유래하는 것으로 규명되어 있고, 1985년에서 1999년 사이에는 사람에서 SE의 식중독의 80%가 계란에서 유래하는 것으로 보고되었다. 계란 또는 계육내의 *S. Enteritidis*의 오염을 감소시키기 위해 선진국에서는 저온살균, 보관방법지침, 농장내 예방방법 개발, 계란 품질인증제도개발등 제도적, 시험적 제거방안이 강구되어 실제 적용되어지고 있고, 미국의 경우 계란품질인증제를 실시한 후 *S. Enteritidis*에 의한 식중독이 50%로 감소되었다. 그러나 계육을 통한 *S. Enteritidis* 식중독은 증가되는 추세이다. 국내에서는 이에 대한 방안이 미흡한 실정이다.

세계보건기구(WHO)에서는 1988년부터 축산물 유래 살모넬라에 대한 식중독 발생을 억제시키기 위해서는 효과적인 생균백신을 대상 동물에 접종할 것을 권장하였다. 2003년 조사에 의하면, 선진국의 경우 도계장에서 생산된 계육의 12.8%가 살모넬라에 오염된 것으로 나타났고, 이중 3.5%가 *S. Enteritidis*인 것으로 보고되었다. 미국의 경우 계육에서의 *S. Enteritidis*의 오염도가 2000년도에 7%에서 2005년에는 25%로 점점 증가하고 있다.

숙주 특이성을 지닌 *S. Pullorum* (SP)과 *S. Gallinarum* (SG) 경우 닭에 병원성이 높아 심한 임상증상을 동반한 폐사로 인해 양계산업에 피해를 일으키는 반면 숙주 특이성이 없는, 즉 광범위한 숙주영역을 지닌 *S. Enteritidis*나 *S. Typhirium* (ST)의 경우 닭 자체에는 큰 피해를 일으키지 않으나 사람에 감염되어 식중독을 일으켜 공중보건학상 경제적인 피해를 일으키는 병원체이다. *S. Enteritidis*의 경우 *S. Pullorum* 또는 *S. Gallinarum*와는 달리 많은 포유동물에 감염이 되기 때문에 특히 양계장의 설치류에도 감염되기 때문에 이로 인해 전파가 잘 일어나며 따라서 *S. Pullorum* 나 *S. Gallinarum*의 근절보다 더욱 어려운 상황이다.

국내에서는 1990년 중반부터 시작해서 최근까지 산란계에서 *S. Gallinarum*의 발생으로 인해 심한 경제적 피해가 있었으나 수입백신인 약독화백신(9R)의 보급으로 상당히 그 피해가 줄어들고 있다. 그러나 9R의 경우 병원성이 있다는 관계로 선진국에서는 사용이 극히 제한적이다. 최근 *S. Enteritidis*가 *S. Gallinarum*을 교차방어할 수 있다는 연구결과가 보고되었다. 따라서 국내의 경우 *S. Gallinarum*과 *S. Enteritidis*를 동시에 예방할 수 있는 백신 기술이 국내에서는 필요하다고 판단된다.

*S. Enteritidis*의 경우 불활화 백신과 생균백신으로 나눌 수 있지만 *Salmonella*가 일반적으로 세포매개성 면역에 의해 방어가 되기 때문에 전 세계적으로 생균백신의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 불활화 백신의 경우 야외 병원성 *Salmonella*가 실질장기에 침투되는 것을 방어할 수는 있으나 장내의 집락화를 방어할 수 없는 것으로 알려져 있다. 가금티푸스의 원인균인 *S. Gallinarum*의 경우도 생균백신이 훨씬 효과적이라는 사실은 이러한 이론을 뒷받침한다. *S. Enteritidis* 불활화 백신 접종에 대한 효과분석을 보면 미국의 경우 백신을 하지 않은 계군에서 *S. Enteritidis*의 분리율이 2.2%(환경)-8%(닭)인데 비해 *S. Enteritidis*백신을 한 계군에서는 분리율이 0.2%(환경)-0.6%(닭)으로 감소하는 것을 볼 때 불활화 백신도 *S. Enteritidis*를 제거하는데 효과가 있는 것으로 보고되었다. 따라서 생균백신과 혼합 사용할 경우 훨씬 더 효과적으로 제거할 수 있으리라 판단된다.

국내의 경우 식중독의 가장 큰 원인체가 *S. Enteritidis*임에도 불구하고 축산식품에 대한 *S. Enteritidis*의 제거 또는 예방 기술개발에 대한 연구는 매우 미흡한 상태이다. 따라서 국내에서 계란 또는 계육 등의 축산식품을 통해 일어나는 식중독의 주요 원인체인 *S. Enteritidis* 예방기술의 개발과 더불어 가금티푸스의 원인체인 *S. Gallinarum*을 동시에 예방할 수 있는 새로운 예방 기술을 개발하여 양계산업의 보호와 국민의 식중독의 발생을 감소시켜 소비자에 대한 계란 및 계육제품에 대한 신뢰도를 제고하고자 본 연구를 수행하였다.

Table 1-1. 최근 10년간 사람에서 발생한 식중독 원인체의 분포 (단위: 환자수)

원인체	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Vibrio	68	2	10	0	3	0	162	4	1	10	16
Salmonella	400	484	274	392	319	241	437	634	297	319	221
Shigella	23	9	11	906	1781	2462	928	767	1117	487	317
E.coli O157:H7	-	-	-	-	-	1	11	8	52	118	43

(질병관리본부전염병통계)

Table 1-2. 1996년부터 2005년까지의 서울 지역에서 발생한 식중독 환자에서 분리한 살모넬라 혈청형 분포

Serotype	No. of Isolates										Total (%)
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
S. Enteritidis	12	10	51	135	58	32	60	10	7	41	416 (42.0)
S. Typhimurium	7	7	18	42	10	3	8	12	1	7	115 (11.6)
S. Typhi	10	15	73	51	19	50	10	4	14	10	256 (25.9)
Other <i>Salmonella</i>	6	8	18	57	18	9	58	7	7	14	202 (20.4)
Total	35	40	160	285	105	94	136	33	29	72	989

(박 등, 2002; 2006)

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발 현황

현재까지 국내 연구결과를 살펴보면 충남대학교에서는 분자생물학적 기술을 이용한 살모넬라균 감염증의 진단과 예방기술 개발과제로 살모넬라균의 일부 유전자를 이종 벡터에 삽입하여 발현 시켰고, 상지대학교에서는 축산 식품의 병원성 세균 신속검출을 위한 Board-range PCR법을 개발하였다. 대한제당 중앙연구소에서는 닭의 살모넬라 예방을 위한 경쟁적 배제 미생물 제제 개발하였고, 한국식품연구원에서는 산란계를 이용하여 *S. Gallinarum*에 대한 항체 개발 연구를 하였다. 진바이텍에서는 살모넬라 병원 특이 유전자를 이용한 가금티푸스 예방용 황국균 생균제 개발을 하였고, 전남대학교에서는 특정 유전자 결손을 이용한 돼지 살모넬라 생균백신 개발을 진행중이다. 아직까지 연구성과들을 활용하지는 못하고 있는 실정이다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
충남대학교	분자생물학적 기술을 이용한 살모넬라균 감염증의 진단과 예방기술 개발이라는 과제로 살모넬라균의 일부 유전자를 이종 벡터에 삽입하여 발현시켰음	살모넬라의 일부 단백질을 발현으로 (활용 현황은 미확인)
상지대학교	축산 식품의 병원성 세균 신속검출을 위한 Board-range PCR법의 개발	진단법 (활용 현황은 미확인)
대한제당 중앙연구소	닭의 살모넬라 방제를 위한 경쟁적 배제 미생물 제제 개발	생균제를 이용한 예방법 (활용 현황은 미확인)
한국식품연구원	산란계를 이용한 항-살모넬라 갈리나륨 IgY개발 연구	<i>S. Gallinarum</i> 에 대한 항체 개발 연구 (활용 현황은 미확인)
진바이텍	살모넬라 병원 특이 유전자를 이용한 가금티푸스 예방용 황국균 생균제 개발	생균제를 이용한 <i>S. Gallinarum</i> 예방에 관한 연구 (활용 현황은 미확인)
전남대학교	특정 유전자 결손을 이용한 돼지 살모넬라 생균백신 개발	돼지의 <i>S. Typhimurium</i> 에 대한 백신개발로 연구진행중임

위에서 언급한 바와 같이, 국내에서의 살모넬라의 연구는 주로 닭의 가금티푸스의 원인균인 *Salmonella Gallinarum*과 돼지에서의 *Salmonella Typhimurium*에 대한 연구가 주를 이루고 있다.

외국의 경우 *S. Enteritidis*에 대한 온도감수성 변이주, 아미노산 영양요구주 등의 연구가 진행되어 일부는 상품화되어 있으나 국내에서는 특허출원 또는 등록이 되어 있지 않은 상황이다. 또한, 폴리인산 키나아제 결손 *S. Enteritidis*는 아직 까지 연구보고나 특허가 되어 있지 않다. 최근까지 가금티푸스 예방을 위해 *S. Gallinarum* 9R을 수입하였고, 수입초기에는 수입물량의 부족으로 고가에 판매되었고 독점적인 공급형태를 이루어 양계농가에 큰 경제적인 부담이 있었으며 막대한 외화손실을 초래하였다. 따라서 *S. Enteritidis*에 대한 불활화 백신 및 생균백신의 개발은 질병 예방 및 수입품 대체 등의 경제적 효과가 크다고 할 수 있다.

제 2 절 본 연구팀의 선행연구 수준

1. 계란, 계육, 닭에서 분리한 *S. Enteritidis*와 식중독 환자의 분변에서 분리한 *S. Enteritidis*에 대한 PFGE를 이용한 유전형 분석

Table 2-1에서 보는 바와 같이 특정 유전형의 *S. Enteritidis*가 사람의 식중독을 일으키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 특정 유전형의 *S. Enteritidis*가 사람에 대한 식중독의 발병가능성이 높은 것으로 사료된다.

Table 2-1. 계란, 계육 및 닭과 식중독 환자에서 분리한 *S. Enteritidis*의 유전형 비교

PFGE type	No. of <i>S. Enteritidis</i> (%)	
	Eggs, Chicken meat or Chickens	Human
A	19 (33.9)	20 (47.6)
A1	3 (6.3)	4 (9.5)
A2	3 (6.3)	-
A3	1 (1.9)	-
A4	1 (1.9)	-
A	22 (39.3)	4 (9.5)
	-	3 (7.1)
	-	5 (11.9)
	-	1 (2.4)
	3 (6.3)	1 (2.4)
	-	3 (7.1)
	1 (1.9)	-
	1 (1.9)	-
	-	1 (2.4)
	1 (1.9)	-
	-	-
B	1 (1.9)	-
B2	-	1 (2.4)
C	1 (1.9)	-
C2	1 (1.9)	-
Total	56	42

2. 폴리인산 키나아제(ppk) 결손 변이주의 병원성 시험

PFGE 유전형 중 A type에 속한 *S. Enteritidis* 분리주를 이용하여 형질도입 방법에 의해 ppk 결손 유전자를 지닌 *S. Enteritidis* 변이주를 제작하였다. 이들 변이주는 염기서열분석을 실시한 결과 폴리인산 키나아제가 결손이 된 것을 확인하였다. 제작된 변이주에 대한 병원성이 소실된 것을 확인하기 위하여 시험관내에 내열성 시험과 침투성 시험을 실시한 결과 wild type에 비해 병원성이 급격히 소실되었음이 확인되었다. (Table 2-2, 2-3). 따라서 폴리인산 키나아제 결손은 wild type에 비해 병원성이 상당히 저하되는 것으로 나타났다.

Table 2-2. 폴리인산 키나아제 결손 변이 *S. Enteritidis*의 내열성 시험

	Amount of Inoculation			Amount of Inoculation		
	5×10^3 cfu/0.1ml			5×10^2 cfu/0.1ml		
	2min	4 min	6 min	2 min	4 min	6 min
Wild type	1509	263	37	102	12	12
Mutant 1	171	11	0	1	0	0
Mutant 2	345	13	0	22	2	2

Table 2-3. 폴리인산 키나아제 결손 변이 *S. Enteritidis*의 침투성 시험

	Amount of Inoculation			Amount of Inoculation				
	1×10^4 cfu			Mean \pm SD	% loss	1×10^3 cfu	Mean \pm SD	% loss
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd		
Wild type	160	239	235	211 \pm 44	-	28	22	16
Mutant 1	3	2	69	24.7 \pm 38.4	89.3	0	2	15
Mutant 2	1	48	0	16 \pm 27.4	92.4	1	5	1
							2.3 \pm 2.3	89.5

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

국내 식중독의 주원인이 되는 계란과 계육에서 유래한 *S. Enteritidis*의 제거 기술을 개발 한다.

- 가. *S. Enteritidis* 온도감수성 변이주를 이용한 생균백신 개발
- 나. *S. Enteritidis* 폴리인산 키나아제 결손 변이주를 이용한 생균백신개발
- 다. *S. Enteritidis* 아미노산 영양요구성 변이주를 이용한 생균백신 개발
- 라. 계란과 계육에 오염되어 있는 위해 미생물인 *S. Enteritidis*를 제거하기 위한 불활화백신의 개발
- 마. *S. Gallinarum*이 원인체인 가금 티프스와 계란 또는 계육을 통해 사람의 식중독을 일으키는 *S. Enteritidis*를 동시에 방어할 수 있는 *S. Enteritidis* 생균백신의 개발
- 바. 계란, 계육 및 닭에서 분리된 *S. Enteritidis*와 식중독을 일으킨 환자에서 분리된 *S. Enteritidis*와의 관련성 확보

제 2 절 연차별 · 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

1. 1차년도 개발목표 및 개발 내용

가. 계란, 계육 및 닭에서의 *S. Enteritidis*의 분리 동정 및 불활화 백신용 백신균주의 선발

- (1) 국내 전역에서 유통되는 계란(계란 도매상 및 재래시장)에서 난각, 난백, 난황에서 *Salmonella*의 분리 및 동정
- (2) 도계두수 20000여두 규모의 도계장에서 도계된 계육에서 *Salmonella*의 분리 및 동정
- (3) 대표적인 *S. Enteritidis*를 대상으로 한 병원성 및 면역원성 시험
- (4) 불활화 백신균주의 선발

나. 국내에서 분리된 *S. Enteritidis*의 특성 규명 (강원대)

- (1) 세부과제에서 분리된 살모넬라의 혈청형 규명을 통해 계란, 계육 및 닭에서 분리된 *S. Enteritidis*의 규명

다. 계란 및 계육에서 분리된 *S. Enteritidis*와 식중독을 일으킨 사람에게서 분리된 *S. Enteritidis*와의 연관성 분석 (강원대)

- (1) 식중독을 나타내는 사람의 분변에서의 살모넬라의 분리 및 혈청형 규명을 통해 *S. Enteritidis*의 동정 및 균주 확보
- (2) 닭과 사람에서 분리된 *S. Enteritidis*의 특성 및 연관성 규명
 - (가) 국내 대표분리주의 파이지 타입규명
 - (나) Pulsed field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 유전학적 특성 규명
 - (다) 항생제 감수성 시험을 통한 항생제 내성패턴의 규명
- (3) 분석된 자료를 이용한 *S. Enteritidis*의 계란, 계육과 사람에게서 분리된 *S. Enteritidis*의 연관성 분석

라. 계란 및 계육 유래 식중독 원인 *S. Enteritidis*의 선발 (강원대)

계란 및 계육을 통해 식중독을 일으킬 수 있는 *S. Enteritidis* 대표 균주의 선발

마. *S. Enteritidis* 의 목표 유전자 aro유전자의 제작 (건양대)

- (1) *S. Enteritidis*의 전염성을 간직한 target gene aro유전자를 cloning
- (2) *S. Enteritidis*의 전염성을 간직한 target gene aro유전자의 염기서열분석

2. 2차년도 개발목표 및 개발 내용

가. *S. Enteritidis* 불활화 시험백신의 효과 분석, 임상적용 및 생산공정 연구 (중앙백신)

- (1) 불활화 백신 제조를 위한 *S. Enteritidis*의 증식성 시험, 불활화 방법, 보조제 선발, 항원량 결정
- (2) *S. Enteritidis* 불활화 시험백신에 대한 방어효과 시험
- (3) *S. Enteritidis* 불활화 시험 백신에 대한 안전성, 접종경로 및 접종량 시험

나. 폴리인산키나아제결손 *S. Enteritidis* 변이주의 개발 및 안전성 연구 (강원대)

- (1) 폴리인산키나아제 결손 파아지의 제조
- (2) 국내 대표 *S. Enteritidis* 분리주를 이용한 형질전환 및 결손변이주의 검색
- (3) 결손변이주에 대한 생화학적 시험
 - (가) 열에 대한 저항성 시험
 - (나) 단핵구내의 생존 시험
 - (다) 산에 대한 저항성 시험
 - (라) 증식성 시험
- (4) 병아리를 통한 결손변이주의 병원성 소실 시험

다. S. Enteritidis aro유전자 영양요구성 변이주 확립 (건양대)

- (1) 유전자 재조합 기술을 이용한 aro 유전자 영양요구주의 선발
- (2) 선발된 영양 요구주에 대한 특성규명

3. 3차년도 개발목표 및 개발 내용

가. 폴리인산키나아제결손 S. Enteritidis 변이주의 임상적용 연구 (중앙백신)

- (1) 폴리인산키나아제 결손 S. Enteritidis의 접종량에 따른 방어효과 시험

나. S. Enteritidis 온도 감수성 변이주의 개발 및 병원성 연구 (강원대)

- (1) S. Enteritidis 온도감수성변이주의 생산 및 후보 균주의 선발
 - (가) 연속계대배양시 온도감수성 변이주의 비허용온도에서의 증식성 및 안정성 조사
 - (나) 감수성 온도에서의 증식성 시험
 - (다) 병아리를 이용한 병원성 소실시험을 통해 온도감수성 백신 후보주의 선발
 - (라) 선발된 백신 후보주의 방어효과 검사

다. 추가적인 Aro유전자 결손을 통한 영양요구주이 선발 (건양대)

- (1) 추가적인 Aro 유전자 결손을 통한 영양요구주의 선발
- (2) 선발된 영양요구주에 대한 특성 규명

4. 4차년도 개발목표 및 개발 내용

가. S. Enteritidis 영양요구성 변이주에 대한 임상적용 연구 및 변이주에 대한 생산공정개발 (중앙백신)

- (1) S. Enteritidis 영양요구성 변이주의 방어효과 시험
- (2) 접종량에 따른 방어효과 시험
- (3) 접종경로에 따른 방어효과 시험
- (4) 개발된 백신에 대한 S. Gallinarum의 공격접종에 대한 교차 방어효과 시험

**나. S. Enteritidis 온도감수성 변이주의 방어효과 분석 및 최적의 예방 프로그램 개발
(강원대)**

- (1) S. Enteritidis 온도감수성 변이주의 접종량에 따른 방어효과 시험

다. 복합 결손변이주의 개발 (건양대)

- (1) 온도변이주와 폴리인산키나아제 변이주에 대한 aro유전자 결손변이시험을 통한 새로운 변이주의 개발

제 3 절 연구개발 범위 및 실험방법

1. *S. Enteritidis*의 특성규명 시험

가. 항생제 내성 패턴분석 실험

(1) 실험방법

- (가) disk agar diffusion의 방법에 의해 실험을 수행하며 실험방법은 다음과 같다.
- (나) 분리된 173개의 strain을 Nutrient broth에서 24시간동안 진탕배양시킨다.
- (다) 멸균된 swab을 이용하여 Mueller-Hinton agar(Difco)에 골고루 퍼바른 후에 항생제 disk를 일정간격으로 배열하여 37°C에서 24시간 배양한다.
- (라) 사용된 항생제와 그의 농도는 Table 3-1과 같다.

(2) 결과

- (가) 결과해석은 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)의 guideline에 의한다.
- (나) Inhibitory zone의 직경이 intermediate에 속하면 sensitive으로 간주한다.
- (다) 항생제 내성패턴에 의한 통계분석은 Chi-square test 와 Fisher's exact test를 이용한다.

Table 3-1. used antibiotic and their concentration

Antibiotic	Concentration(μg)
Amikacin(AN)	30
amoxicillin/clavulanic acid(AmC)	20/10
ampicillin(AM)	10
cephalothin(CF)	30
kanamycin(K)	30
ticarcillin(TIC)	75
streptomycin(S)	10
nalidixic acid(NA)	30
tetracycline(Te)	30
ampicillin/sulbactam(SAM)	10/10
trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT)	1.25/23.75
ceftriaxone(CRO)	30
neomycin(N)	30

나. PFGE type 분석실험

(1) 실험방법

- (가) 137개의 분리된 *S.Enteritidis* 균주를 LB agar plate에서 37℃로 overnight 배양한다.
- (나) 자란 colony를 TE cell suspension buffer(100mM Tris와 100mM EDTA, pH 7.5)에 부유시켜 탁도를 colorimeter를 사용하여 20% 투과율에 맞춘다.
- (다) Proteinase K 와 1.2% agarose 를 cell 부유액에 넣어준다.
- (라) mixure를 disposable plug molds 에 넣어준다.
- (마) plug에 ES buffer(0.5M EDTA, pH9.0 ; 1% sodium-lauroyl-sarcosine)와 proteinase K를 넣어준 후에 55℃ 항온수조에서 1시간동안 정치시킨다.
- (바) 1시간이 지나면 plug를 멸균증류수에 15분간 담가 세척하고 TE buffer(10mM Tris과 1mM EDTA, pH7.5)로 다시 30분간 4번씩 세척하여준다.
- (사) 세척이 끝난 plug를 1mm 의 너비로 자른 후에 *Xba* I 이나 *Spe* I 제한효소를 처리하여 준다.
- (아) plug 내의 DNA를 1% agarose gel 에서 전개시킨다. 전기영동의 조건은 다음과 같다.
- (자) initial switch time : 2.0 s, final switch time: 40.0 s, run time : 16 h
- (차) 전기영동이 끝난후에 gel을 ethidium bromide 로 염색하여 UV transilluminator를 이용하여 결과를 관찰한다.

(2) 결과

- (가) 전개된 DNA fingerprinting을 BioNumerics program을 이용한 dendrogram으로 fragment의 위치에 따라서 pattern을 분류한다.
- (나) Tenover의 분류법에 따라 분석한 *S. Enteritidis* 중 가장 많은 수가 속한 PFGE type을 A1으로 명명한다.

다. Phage type 분석실험

(1) 실험방법

- (가) phage type 분석실험은 ward 의 방법에 준하며(ward *et al*, 1987) 실험에 사용된 12개의 phage는 국립보건원으로부터 분양받았다.
- (나) 분리된 173개의 균을 blood agar plate에서 37℃, 18시간동안 배양한다.
- (다) 얻어진 colony를 3ml의 phage broth(Double concentration Nutrient broth with 0.85% NaCl)에서 1시간 30분동안 진탕배양을 실시한다.
- (라) 배양이 끝난 broth를 phage agar plate에 spreading하여 준다.

(마) 충분히 균이 배지에 분주되면 15개의 bacteriophage를 plate에 일정한 간격으로 떨어뜨려준 후 37℃에서 overnight 배양하여 결과를 판독한다.

(2) 결과

- (가) phage에 의해 lysis된 zone을 동정된 균의 phage type이라 정한다.
- (나) phage type pattern은 published pattern list를 참고한다.
- (다) 어떤 phage에 의해서도 lysis가 되지 않은 분리주는 RDNC(reacted but did not conform)로 기록한다.

2. *S. Enteritidis*의 불활화 백신 개발 시험

가. *S. Enteritidis* 균주 선발 실험

(1) 실험방법

(가) 사람과 닭에서 분리한 *S. Enteritidis* 총 173주를 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), 항생제 감수성시험, phage type 등을 분석하였다.

(2) 결과

(가) 대표적인 phenotype을 가진 사람에서의 분리주 5주와 닭에서의 분리주 6주를 포함한 총 11주의 *S. Enteritidis*를 선택하여 본 실험에 사용하였다.
(Table 4-7)

나. 병아리에서의 *S. Enteritidis*의 병원성 평가 실험(1차 & 2차)

(1) 실험방법(1차)

- (가) 총 11주의 *S. Enteritidis* 분리주를 nutrient broth에 접종한다.
- (나) 37℃에서 진탕배양한 후 배양액내의 균수를 접종량당, 6×10^7 cfu/0.2ml/chicken으로 조정한다.
- (다) 1~2일령 병아리를 각 균주당 40마리씩 경구로 0.2ml씩 접종한 후 10일간 폐사를 관찰하여 기록하고, 10일째 되는 날에 각 그룹에서 생존한 병아리를 부검하여, 맹장을 채취하여 균을 검출한다.
- (라) 맹장을 유제로 갈아 유제액을 만든 후 10ml selenite cystine broth (SC, BD, France)에 넣고 41℃에 24시간 진탕 배양한 후 MacConkey agar (BD)와 XLT4 agar (BD)에 접종한다.
- (마) 접종 후 37℃에서 24시간 배양한 후 *S. Enteritidis*의 증식 유무를 판정한다.

(2) 결과(1차)

(가) 대표균주 11개 중에서 사람과 닭에서 분리된 균주 중 병원성이 높은 2개 균주를 각각 선별하여 재시험을 실시한다.

(3) 실험방법(2차)

(가) 배양한 후 접종량당, 3×10^7 cfu/chicken (1차시험의 1/2dose)로 조정한다.

(나) 3-5일령 병아리에 균주당 30마리씩 0.2ml씩 경구로 접종한 후 2주간 폐사를 관찰한다.

(다) 각 장기의 무게를 측정한 후, 멸균된 buffered peptone water (BPW, BD)를 장기당 1 ml씩 첨가한 후 유제한다.

(라) 유제액을 10배로 희석한 후, 희석된 유제액 0.1ml를 살모넬라 분리 배지인 XLT4 배지 (BD)에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한다.

(마) 배양 후 XLT4 배지에 자란 *S. Enteritidis*균 특이적인 집락수를 측정하여 장기 별 g당 cfu를 산출한다.

(4) 결과(2차)

(가) 병원성이 높은 것으로, 사람과 닭에서 유래된 균주를 각각 한 개씩 선택한다.

다. *S. Enteritidis*의 증식성 실험

(1) 실험방법

(가) 두 개의 균주(Table 4-9)를 LB broth에 접종한 후 37°C에서 최대 5시간까지 진탕배양한다.

(나) 일정시간 간격으로 sampling 하여 spectrophotometer를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정한다.

(2) 결과

(가) 증식성 확인 및 최적의 배양조건을 확립한다.

라. 불활화 실험

(1) 실험방법

(가) 배양된 bulk를 균수확인용 sample을 일부 채취한 뒤 0.3%(v/v) formalin을 넣고, 37°C 항온실에서 진탕하면서 3일간 반응시킨다.

(나) 반응이 끝난 뒤, Nutrient agar, Nutrient broth 및 Thioglycolate agar에 각각 접종하여 22°C 및 37°C 배양기에 7일간 배양하여 불활화 확인 시험을 실시한다.

(2) 결과

(가) 시험백신 제조용 bulk의 불활화를 확인한다.

마. 4종 시험백신에 대한 Mouse 공격접종 시험

(1) 실험방법

- (가) 백신 1, 2, 3 및 4(Table 4-10)를 균별로 10수씩, 마리당 0.2 ml씩 복강내로 접종한다.
- (나) 대조군은 백신대신 PBS 0.2ml를 접종한다.
- (다) 시험백신 0.2ml/mouse 복강에 접종하고 2주 후, 각각의 백신주를 생균으로 0.2ml/mouse (10LD₅₀) 복강에 공격접종 한다.

(2) 결과

- (가) 10일간 생존여부를 관찰한다.

바. 불활화 시험백신의 항체역가 지속시험

(1) 실험방법

- (가) 6주령 닭 24수를 준비하여 8수에는 1회 접종, 8수에는 3주간격 2회 접종하고 나머지 8수에 대해서는 백신을 접종하지 않고 대조군으로 두어 약 5개월간 1개 월 간격으로 채혈한다.
- (나) 1개월 간격으로 채혈된 혈청은 항체역가의 변화를 확인하기 위해 microplate agglutination test(MAT)를 실시한다.

(2) 결과

- (가) 항체역가를 확인한다.

3. *S. Enteritidis*의 polyphosphate kinase의 변이주에서 온도 변이주 시험

가. *S. Enteritidis*의 polyphosphate kinase (ppk) 변이주의 제작

1차년도에서 선발된 불활화 백신균주인 닭에서 분리된 *S. Enteritidis*주 (IVK B01277)와 사람에서 분리된 *S. Enteritidis* 분리주 (IVK B01369)를 사용하여 polyphosphate kinase (ppk) 변이주를 transduction 방법에 의해 제작하였다. Δppk:kan유전자를 지닌 phage P22HT와 *S. Enteritidis*균주를 혼합한 후 37°C에서 15분간 배양한 후 LB-broth EDTA에 첨가한 후 37°C에서 20분간 배양시켰다. 혼합액을 kanamycin으로 첨가한 LB agar에 접종한 뒤 24시간 배양한 후 변이주를 선발하였다. 총 3회의 걸친 실험에서 닭에서 분리한 *S. Enteritidis*주 (IVK B01277)에서 두개의 mutant를 얻을 수 있었으며 이를 각각 SEppk-1, SEppk-2로 명명하였다.

(1) *S. Enteritidis* ppk변이주의 heat shock에 대한 영향

*S. Enteritidis*의 wild type과 ppk변이주를 16시간 배양한 후 stationary phase에서 수확한 후 media성분을 제거하기 위해 1회 세척한 후 0.9% NaCl로 cell농도를 5×10^3 또는 $5 \times 10^2/ml$ 로 희석하였다. 희석한 세균을 유리시험관에 옮긴 후 55°C에서 2, 4, 6분간 처리를 하였다. 열처리 후 각각의 세균 희석액을 LB agar에 0.1mL씩 접종한 후 살아있는 세균수를 측정하였다.

(2) SE의 In vitro 침투성 시험

10% fetal bovine serum (Gibco/BRL)과 1 mM sodium pyruvate가 포함된 EMEM 배지에서 배양한 HeLa세포를 1×10^6 cells/ml로 조정하여 24well plate에 계대분주하고 confluent monolayer가 형성될 때까지 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. Dinjus등의 방법에 준하여 준비된 cell line을 phosphate buffered saline (PBS, pH7.2)으로 2회 세척한 후 1% FBS가 함유된 PBS로 희석한 1×10^5 colony forming unit (cfu)의 세균 배양액을 균주당 각각 2개의 well에 접종하여 5분동안 1,000 rpm으로 원심분리한 후 30분동안 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 항생제를 혼합하지 않은 배약액 1ml을 첨가한 다음 2.5시간 동안 다시 배양한 후 세포내 침투된 세균수를 측정하였다. 3회 세척한 후 150μg/ml의 gentamicin (Sigma)을 첨가하고 2시간동안 배양한 후 2회 세척하여 앞서 기술한 동일한 방법으로 HeLa세포내에 존재하는 세균수를 구하였다. 접종한 총세포를 확인하기 위하여 HeLa 세포가 들어있지 않은 well에 동일한 조건으로 균을 배양한 후 LB agar에 접종, 배양한 뒤 세균수를 측정하였다.

(3) 결손된 PPK의 유전자의 확인

*S. Enteritidis*의 wild type과 ppk변이주에서 ppk의 유전자를 증폭한 후 ppk유전자가 변이주에서 결손되었는지를 확인하고자 PCR을 실시하였다. ppk유전자를 증폭하기 위한 primer는 *S. Typhimurium*의 ppk유전자 40~60bp에 위치한 5`-TGG TTA GCA TTT AAC GAA CGC-3`와 2040~2060에 위치한 5`-GGT TGC TCG AGT GAT TTG ATG-3`로 제작하였다. PCR조건은 94°C에서 3분간 denaturation후, 94°C에서 30초, 40°C 2분, 72°C 2분간 반응한 뒤 72°C에서 10분간 반응시켰다.

(4) *S. Enteritidis* wild type과 ppk 변이주의 증식성 비교

*S. Enteritidis*의 wild type과 SEppk 변이주를 10^3 cfu/ml로 tryptic soy broth에 희석한 후 *S. Enteritidis* wild type과 SE ppk변이주 두균주를 동일한 양으로 tryptic soy

broth(TSB, BD, France)에 접종한 후 진탕 배양한 후 3시간, 6시간 및 9시간째에 각 시간에 1 ml 채취하여 균수(cfu)를 측정하였다. 또한 동일한 균주를 TSB에 접종하여 37℃에서 24시간 배양하면서 시간마다 OD₆₀₀ 을 측정하였다.

(5) *S. Enteritidis* wild type와 ppk변이주의 마우스에서의 병원성 시험

변이주의 병원성을 확인하기 위해 ICR 마우스를 사용하였다. 마우스를 군당 5마리씩 나눈 후 SE-WT, SE-ppk균주를 배양한 후 10⁹, 10⁸, 10⁷ cfu로 희석한 후 마우스 복강내로 접종 한 후 2주간 생존성을 관찰하였다.

(6) *S. Enteritidis* wild type와 ppk변이주의 닭에서의 병원성

SE wild type과 ppk변이주의 병원성을 닭에서 시험하기 위해 3일령의 SPF병아리를 사용하였다. *S. Enteritidis* wild type과 ppk변이주를 6x10⁷CFU/chicken(0.2ml)의 양으로 3 일령의 SPF병아리에 경구로 접종한 후 10일간 폐사유무를 관찰하여 기록하고, 10일째에 5마리를 부검하여, 비장, 간, 맹장을 채취하였다. 채취된 sample의 무게를 측정한 후, 1ml의 buffered peptone water(BPW)를 넣어 유제하였다. 유제액을 10배 희석한 후, 0.1ml를 *Salmonella* 분리 배지인 XLT-4에 접종한 후, 37℃에서 18시간 배양한 후 장기별 살모넬라의 검출율을 측정하였다.

나. *S. Enteritidis*의 영양요구성 변이주 (aroA주)

aroA의 제작은 연구결과에 기술하였다.

다. *S. Enteritidis*의 온도 변이주 (ts주)

(1) *S. Enteritidis* 온도변이주(temperature sensitive mutant; ts mutant)의 제조

불활화 백신균주인 닭에서 분리된 *S. Enteritidis*주 (IVK B01277; SE277로 명명)와 사람에서 분리된 *S. Enteritidis*분리주 (IVK B01369; SE369로 명명)를 사용하여 온도변이주를 생산하였다. 각각의 균주를 TSB에 접종하고 37℃에서 18시간 배양하였다. 자란 균을 50μl 채취하여 세 개의 3ml TSB에 넣고 37℃에서 4-5시간 대수성장 까지 배양하였다. 1mg/ml N-methyl-N'-Nitro-nitrosoguanidine(NTG)를 넣고 최종농도 20μg/ml로 맞춘 후 배양된 균액에 혼합한 후 진탕호기배양을 하지 않은 10분 동안 37℃ incubator에서 반응한 뒤에 3,000rpm 10분간 원심하고 침전물에 신선한 TSB 5ml 넣고 잘 혼합하고 3,000rpm 10분간 원심하고 2회

washing하여 부유시킨 한 후 세균을 0.5ml로 희석한 후 총량을 측정하여 부피의 20배량으로 TSB로 희석한 후 28°C incubator에 진탕 18시간(O/N) 배양하였다. Stock 된 penicillin를 배양액에 최종 농도 5,000U/ml되도록 넣고 37°C에서 3시간 동안 진탕 반응한 후 3000rpm에서 10분간 원심하고 침전물을 신선한 TSB를 넣고 3-5회 washing하여 최종 10ml TSB로 희석하여 28°C incubator에 overnight 배양하였다. D-cycloserine 이용하여 최종 농도 2mM 되도록 희석한 후 37°C에서 3시간 동안 진탕 반응하였다. 배양액을 3000rpm에서 10분간 원심하고 침전물을 신선한 TSB를 넣고 3-5회 washing하여 최종 10ml TSB로 희석하여 28°C incubator에 overnight 배양하였다. 배양한 후 세균용액을 10^{-1} 부터 10^{-8} 까지 10진씩 희석하여 각 희석별로 100 μ l씩 TSA에 spreading 접종하여 28°C에서 배양한 후 작은 single colony 선택하여 TSA에 접종하여 일분 28°C 일분 37°C에서 배양한 후 37°C에서 군 자라지 않고 28°C만 자라고 그 28°C에서 자란 군 선택하여 ts mutant를 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) *S. Enteritidis* 온도변이주의 스크리닝

제조한 온도변이주를 replica plating을 한 후 28°C 및 37°C에서 배양한 후 28°C에서 접락을 형성하나 37°C에서는 접락을 형성하지 않는 온도변이주를 일차로 선발하였다.

(3) 온도변이주의 마우스에서의 병원성 시험

변이주의 병원성을 확인하기 위해 ICR 마우스를 사용하였다. 마우스를 군당 5~10마리씩 나눈 후 각각의 변이균주를 배양한 후 10^9 , 10^8 , 10^7 cfu로 희석한 후 마우스 복강내로 접종 한 후 2주간 생존성을 관찰하였다.

4. *S. Enteritidis*백신 효능평가를 위한 시험

가. 생균백신 방어능 분석을 위한 공격접종균주의 선발

(1) 목적

생균백신의 경우 충분히 약독화되지 않은 경우 비장, 간, 맹장내에 검출이 가능함. 따라서 공격접종균주는 생균백신균주와 감별을 할 수 있는 항생제 내성이 있는 마커가 필요하다. 기존의 보고에 의하면 Nalidixic acid 또는 rifampin에 내성이 있는 균주를 선발하여 사용하였다. 따라서 본 연구에서는 두 종류의 항생제 간에 내성이 있고 병원성이 높은 균주를 선발하여 공격접종균주로 사용하였다.

(2) 배지내 항생제 첨가에 따른 균의 cfu의 조사

(가) 방법

- ① 배지: tryptic soy broth (TSB, BD, France, cat. No. 211825) 및 TSA를 사용하였다.

② Rifampin (Duchefa), 10 μ g/ml: 0.01g를 1ml methanol에 (10mg/ml) 녹인 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 사용시 10mg/ml 용액 1ml을 9ml PBS에 넣고 충분히 혼합하여 1L TSA에 혼합하여 사용하였다. 30 μ g/ml: 0.03g를 1ml methanol에 (30mg/ml) 녹인 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 사용시 30mg/ml 용액 1ml을 9ml PBS에 넣고 충분히 혼합하여 1L TSA에 혼합하여 사용하였다..

③ Nalidixic acid (Duchefa), 30 μ g/ml, 60 μ g/ml; 0.03g를 1ml NaOH/water에 (30mg/ml) 녹인 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 사용시 30mg/ml 용액 1ml을 9ml PBS에 넣고 충분히 혼합하여 1L TSA에 혼합하여 사용하였다.

④ 선택된 균주를 TSB에 접종하고 18시간 37°C에서 배양하였다.

⑤ 배양된 균을 10⁻¹부터 10⁻⁸까지 10진씩 희석하여 항생제 첨가된 TSA에 100 μ l씩 도말하고 37°C에 18시간 배양한 후 균수를(cfu) 측정하였다.

⑥ 항생제 각 농도에서 cfu 차이 없는 균주를 선택하였다.

(3) 선발된 공격접종균주의 마우스에서의 병원성 시험

(가) 목적: NA내성균주중에서 마우스에서의 공격접종을 통해 LD₅₀를 조사하였다.

(나) 방법:

① 선택된 균주를(SE 271, 356) TSB에 접종하고 37°C에 18시간 배양하였다

② 배양한 후 각 균주에 균수를 10⁷, 10⁶ 및 10⁵ CFU로 맞추었다.

③ 한 균주당 15마리 6-8주령 마우스를 3 그룹 나누어 각 희석별로 5마리씩 복강으로 0.1ml씩 접종하였다.

④ 10일간 폐사유무를 관찰하며 결과를 기록하며, LD₅₀를 측정하였다.

나. 마우스에서 생균백신의 방어율 시험

(1) 목적

개발된 다양한 약독화 변이주를 닭에 적용하기 전에 마우스에서 온도변이주 및 기타 변이주에 대한 방어력을 시험하고자 실시하였으며 이를 통해 닭에 사용할 수 있는 최종적인 생균백신후보균주를 선발하고자 함.

(2) 방법

(가) 생균백신후보균주 : 1.1 SE 369 ts-8, 277 ts-1, ppk, ppk:ts-3, ppk:ts-4, aroA(B46), aroA(W1), aroA(W1):ts-1.

(나) 공격접종 균주: SE B271 (LD₅₀: 6.8×10⁶ cfu/ml)

(다) 선택된 균주를 TSB에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한다. (온도 변이주는 28°C에서 배양한다)

- (라) 배양된 균주를 아래 표 대조하여 균수를(cfu) 맞춘 후 6-8주령 마우스에 0.1ml 씩 복강으로 접종한다. 접종 3주 후 선발된 공격 균주 사용하여 100LD₅₀로 복강으로 접종한다.
- (마) 접종 후 3주에 폐사유무를 관찰한다.
- (바) 3주 후 부검하여 간 및 비장 채취하여 균수를 측정한다.
- (사) 폐사 전 채혈하여 혈청검사 실시한다.

다. 생균백신 후보주의 닭에서의 방어효과 분석 시험

(1) 실험방법

- (가) 백신균주(DTS SE PPK TS3-2-2)를 50mL LB broth-KM(50ug)에 접종한 후 28℃에 진탕배양(220rpm)을 18시간동안 배양한다.
- (나) 배양액을 1:5으로 LB에 희석한 후 다시 OD₆₀₀1.0까지 배양한다. 배양 후 12000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 제거한다.
- (다) 냉장된 멸균생리식염수로 pellet을 부유하여 OD₆₀₀1.2으로 조정한 후 백신접종 균주로 사용한다(이동시 냉장보관). 일부를 채취하여 최종 cfu를 측정한다.
- (라) 백신접종량은 3.5X10⁹cfu/0.5mL/수수로 조정하여 사용한다.(OD₆₀₀1.0에 맞춘 cfu 계산 후 0.5ml 접종)
- (마) 1차 백신접종 전에 2주령된 병아리를 7마리 채혈을 실시한 후 MAT와 ELISA를 혈청학적 검사를 실시하여 S. Enteritidis와 S. Typhimurium 항체를 가지고 있는지 확인한다.
- (바) I~IV군 모두 백신을 각각 구강과 피하로 접종한다.
- (사) 1차 접종 후 2주 후에 I~IV군 모두 채혈을 실시한 후 2차 백신접종을 한다.
- (아) 2차 백신접종 후 3주 뒤에 I~V군 모두 채혈을 실시한 후 공격접종을 실시한다.

(2) 결과

- (가) 공격접종 7일 까지 임상증상 (설사) 및 폐사수수를 측정하며 7일째에 살아있는 닭을 모두 도태시킨 후 채혈을 하며, 체중을 측정한다. 또한 도태시킨 후 간, 비장 및 맹장내용물을 채취하여 g당 살모넬라 균수를 측정한다.

5. 일반시험

가. 불활화 백신의 일반 검정시험

(1) 특성시험

2개 이상의 백신에 대하여 직경 18-22mm의 무색투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 특성시험을 실시한다.

(가) 시험방법

시 험	시험방법
색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰
투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰
이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰
이취시험	코를 이용해 개봉된 백신의 냄새 확인
내용물의 균일성시험	불활화백신은 투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰

(나) 시험결과

불활화 백신은 본래의 조성을 지녔으며, 색조, 투명도(혼탁도), 이물, 이취 내용물의 균일성 시험에 대해서 이상이 없어야 한다.

(2) 무균시험

(가) 백신의 개봉

시험은 무균실에서 엄격한 무균 조작법에 의하여 실시한다. 백신의 개봉시에는 내용이 오염되든가, 소독제가 내부에 침입하지 않도록 주의하여야 한다.

(나) 배 지

배지는 nutrient agar, nutrient broth 사면 및 액제 thioglycolate 배지를 사용한다. 액제 thioglicolate 배지의 상부에서 30% 이상이 핑크색으로 변한 것은 사용하여서는 안 되며 가열하여 산소를 제거하였을 때에는 무방하다.

(다) 결 과

시험의 결과 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않아야 한다.

백 신	22°C incubator			37°C incubator		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
백신 1						
백신 2						
백신 3						

* - : 세균발육 인정 안 됨, + : 세균발육 인정됨.

(3) 수소이온농도시험 (간이 pH측정법)

(가) 시험방법

간이용 pH 측정 paper를 이용하여 검사품의 pH를 측정한다.

(나) 결과

2개의 백신에 대하여 각각 측정한 결과 수소이온농도는 pH 6.0 ~ 8.0 이내에 있어야 한다.

백신	시험방법	시험결과(pH)
백신 1	간이 pH 측정법	
백신 2	(pH test strip, Sigma)	

(4) 방부제 정량시험 (비색법)

(가) 시험방법

백신 2병을 적당량 희석하여 각각 Schiff 시약 0.2ml 첨가하고 Formalin 표준용액에도 동일하게 가한 뒤, 실온 30분간 방치 후, Spectrophotometer 이용하여 520nm에서 흡광도 측정하여 Formalin 농도를 산출한다.

(나) 결과

백신의 Formalin 함량은 0.2% 이하이어야 한다.

백신	추세선 수식(Linear)	OD 값 (x값)	백신 희석배수	포르말린 농도 (%)
백신 1	$y = \text{_____}x + \text{_____}$		배	
백신 2	$R^2 = \text{_____}$		배	

* 최종 포르말린 농도(%) = $y_{\text{값}} \times \text{백신 희석배수}$

나. 생균 백신의 일반 검정시험

(1) 특성시험

2개 이상의 백신에 대하여 동결건조된 백신을 백신 전용 희석액으로 용해하여 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 특성시험을 실시한다.

(가) 시험방법

시험	시험방법
색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰
투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰
이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰
이취시험	코를 이용해 개봉된 백신의 냄새 확인
내용물의 균일성시험	회석액으로 용해 전 및 후에 내용물의 균일성 관찰

(나) 시험결과

건조된 생균 백신은 본래의 조성을 지녔으며, 색조, 투명도(혼탁도), 이물, 이취 내용물의 균일성 시험에 대해서 이상이 없어야 한다.

(2) 무균시험

(가) 백신의 개봉

시험은 무균실에서 엄격한 무균 조작법에 의하여 실시한다. 백신의 개봉시에는 내용이 오염되든가, 소독제가 내부에 침입하지 않도록 주의하여야 한다.

(나) 배지

배지는 nutrient agar, nutrient broth 사면 및 액제 thioglycolate 배지를 사용한다. 액제 thioglycolate 배지의 상부에서 30% 이상이 핑크색으로 변한 것은 사용하여서는 안 되며 가열하여 산소를 제거하였을 때에는 무방하다.

(다) 결과

시험의 결과 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않아야 한다.

백신	22°C incubator			37°C incubator		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
백신 1						
백신 2						
백신 3						

※ - : 세균발육 인정 안 됨, + : 세균발육 인정됨.

(3) 수소이온농도시험 (간이 pH측정법)

(가) 시험방법

간이용 pH 측정 paper를 이용하여 검사품의 pH를 측정한다.

(나) 결과

2개의 백신에 대하여 희석액으로 용해 후, 각각 측정한 결과 수소이온농도는 pH 6.0 ~ 8.0 이내에 있어야 한다.

백신	시험방법	시험결과(pH)
백신 1	간이 pH 측정법	
백신 2	(pH test strip, Sigma)	

(4) 진공도 시험

(가) 시험

건조백신에 대한 시험으로 암실에서 백신으로부터 5~10 mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰한다.

(나) 판정

건조백신은 방전이 인정되어야 한다.

시험	시험방법	시험결과 (방전수/시험수)
발췌시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	

(5) 함습도시험 (칼-피쉬 방법)

3개 이상의 백신 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2 mm이하로 하여 시험에 사용한다.

(가) 칼-피쉬시약

pH범위(5~7)를 적절히 조절할 수 있는 염기인 imidazole이나 diethanolamine을 포함하고 있는 Hydralal composite 5 pyridine free시약을 사용한다. 이외에 Hydralal-Solvent와 Hydralal-Titrant, Hydralal-Coulomat A와 Coulomat C을 사용하여 적정할 수도 있다.

(나) 조작법

- ① 뷰렛에 칼-피쉬 시약(Hydralal composite 5)을 넣는다.
- ② 적정용기에 용제인 methanol을 넣는다.
- ③ 칼-피쉬 시약으로 methanol내의 수분을 제거한다.

- ④ 시료를 가한다.
- ⑤ 칼-피쉬 시약으로 시료내의 수분을 정량한다.
- ⑥ 칼-피쉬 시약으로 hydralal composite 5외에 다른 시약을 쓸 경우는 그 시약에 맞는 적당한 용제로 바꾸어 쓰면 된다.

(다) 관정

백신의 함습도는 칼피쉬 측정법으로 검사시는 6% 이하이어야 한다. 단, 그 함습도는 시험한 성적 중 최고치로 한다.

백신	시험방법	시험결과
백신 1		
백신 2	Karl-Fischer 방법 (최고치가 6.0% 이하이어야 함)	
백신 3		

6. 안전성 확인 시험

가. 실험동물

살모넬라 갈리나룸(*S. Gallinarum*)에 감수성이 있는 3~4주령 닭을 사용한다.

나. 시험방법

시험군에 백신 2수분을 사용법(근육)에 따라 접종하고 14일간 관찰한다.

다. 결과

모든 시험군은 관찰기간 동안 건강하여야 한다.

7. 목적동물 역가시험

가. 실험동물

살모넬라 갈리나룸(*S. Gallinarum*)에 감수성이 있는 3~4주령 닭을 사용한다.

나. 시험방법

시험군에 백신의 1수분을 피하 접종하고 4주후에 대조군과 함께 채혈하여 응집 항체가 또는 ELISA 항체가를 측정한다.

다. 결과

microplate 방법에 준하여 응집항체가는 시험군은 64배 이상이 80% 이상, 대조군은 음성이어야 하며 ELISA 역가는 시판중인 ELISA kit의 기준에 따른다.

제 4 절 연구개발 수행 결과

1. *S. Enteritidis* 의 분리동정 및 특성 규명

가. 항생제 내성 패턴 분석

2000년부터 2007년까지 국내 서울지역 사람에서 분리된 *S. Enteritidis* 64주와 계란, 계육, 닭(이하 닭이라고 총칭)에서 분리된 108주 및 표준균주 ATCC4931 등, 총 173주의 *S. Enteritidis*의 항생제 감수성 결과는 Table 4-1과 같다. 닭에서 분리된 균주 중 NA 내성주는 40주(37.0%)로 높았으며, AM 26주(24.1%), TE 22주(20.4%), TIC 25주(23.1%), S 26주(24.1%), CF 2주(1.9%) 및 SXT 1주(0.9%)이었다. 사람에서 분리된 65주의 *S. Enteritidis*에서는 AM 내성 27주(41.5%), TE 27주(41.5%), NA 12주(18.5%), TIC 27주(41.5%) 및 S 30주(46.2%)이었다. 총 173개 균주에서 AM 53주(30.6%), TE 49주(28.3%), NA 52주(30.1%), TIC 52주(30.1%), S 56주(32.3%), CF 2주(1.2%) 및 SXT 1주(0.6%)이었다.

(1) 다제내성

닭에서 분리된 *S. Enteritidis* 108주와 사람에서 분리된 *S. Enteritidis* 65주에 대한 항생제 다제내성 양상은 Table 4-2에 나타냈다. 173주의 *S. Enteritidis*가 총 14종의 다제 내성 양상을 나타내었다. 닭에서 분리된 *S. Enteritidis*에서는 NA 단일 내성이 34주(31.5%) 가장 높았다. AM-TIC 11주(10.2%), TE-S 11주(10.2%), TE-NA 2주(1.9%), AM-S-TIC, AM-TE-S-TIC 각 5주(4.6%), AM-TIC-CF, AM-S-NA-TIC, TE-S-SXT-CF 각각 1주(0.9%) 및 TE-S-NA-TIC-AM에 대해 3주(2.8%)의 *S. Enteritidis*가 내성을 보였다. 사람에서 분리된 *S. Enteritidis*에서는 AM-TE-S-TIC 17주(26.2%), NA 12주(18.5%), TE-S 6주(9.2%), AM-TIC, AM-S-TIC 각 4주(6.2%), TE, TE-S-TIC 각 2주(3.1%), AM, AM-S 각 1주(1.5%)의 다제 내성을 보였다. 총 173주 균주에서 NA 단일 내성이 46주(26.6%) 가장 높았으며, 닭에서 분리된 균주의 다제내성은 1제 내성을 보인 34주(31.5%) 가 가장 많았으며, 사람에서 분리된 균주에서는 4제 내성이 17주(26.2%)로 가장 높게 나타났다(Table 4-3).

(2) 항생제 내성 패턴의 변화

사람에서의 항생제에 대한 내성이 발생하는 것은 감염된 동물에서 유래된 고기, 계란등에 의해 옮겨진 세균이 이미 항생제에 대해 내성을 가지고 있다가 그 세균이 사람에게로 이행되면서 발생하는 것으로 생각되어지고 있다[35]. 또한 다제내성의 증가는 한국을 포함한 다른 나라에서 이미 발견되어지고 있으며 특히 *S. Enteritidis* 균에 대한 항생제 내성패턴이 많

이 보고되어 지고 있다[11,29]. 양 등[36]의 보고에 따르면 1995년부터 1999년 동안 14개의 *S. Enteritidis* 분리주 중에서 13개의 분리주가 sulfisoxazole에서만 항생제 내성을 띠었고 그 중 3균주만이 ampicillin, streptomycin, tetracycline과 sulfisoxazole에 다제내성 패턴을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 또한 수와 송[32]은 2001년부터 2002년 사이의 22개 분리주에서 모든 균들이 sulfisoxazole에 감수성이 있음을 보고하였으며 이중 3개 균주만이 다제내성 패턴을 가졌다. 두 연구 모두 *S. Enteritidis*의 분리수가 비교적 적어 충분한 대표성을 갖지 못하였으나 본 연구에서는 173개의 분리주에 관한 항생제내성 패턴을 분석하였으므로 한국에서 발생되는 *S. Enteritidis* 균주에 대한 표준 결과를 제시 할 것으로 기대된다. 또한 10개의 유럽국가에서 2000년에 사람에서 발생한 27,000건의 살모넬라증에서 분석된 항생제 내성 패턴을 비교한 결과 nalidixic acid, streptomycin, ampicillin등의 순서로 감수성을 보인 분리주들의 특성이 본 실험의 결과와 동일함을 알 수 있었다[33].

Table 4-1. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from humans and chickens

Sample	Chickens	Humans	Total
Number of strains tested	108(%)	65(%)	173(%)
Resistance to antimicrobial agent (%)	AM	26 (24.1)	27 (41.5)
	TE	22 (20.4)	27 (41.5)
	NA	40 (37.0)	12 (18.5)
	TIC	25 (23.1)	27 (41.5)
	S	26 (24.1)	30 (46.2)
	CF	2 (1.9)	0 (0.0)
	SXT	1 (0.9)	0 (0.0)
	K	0 (0.0)	0 (0.0)
	N	0 (0.0)	0 (0.0)
	AN	0 (0.0)	0 (0.0)
	AMC	0 (0.0)	0 (0.0)
	SAM	0 (0.0)	0 (0.0)
	CRO	0 (0.0)	0 (0.0)

amikacin (AN, 30 μ g), amoxicillin/clavulanic acid (Amc, 20/10 μ g), ampicillin (AM, 10 μ g), cephalothin (CF, 30 μ g), gentamicin(GM, 10 μ g), kanamycin(K, 30 μ g), ticarcillin (TIC, 75 μ g), streptomycin (S, 10 μ g), nalidixic acid(NA, 30 μ g), tetracycline(Te, 30 μ g), cefoxitin (FOX, 30 μ g), ampicillin/sulbactam (SAM,10/10 μ g), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75 μ g), ceftriaxone (CRO, 30 μ g).

Table 4-2. Distribution of antimicrobial resistance patterns in *Salmonella* Enteritidis from chickens and humans

Resistant pattern	Number of isolates		
	Chickens		Total
	Number	(%)	
AM	0	(0.0)	1 (0.6)
TE	0	(0.0)	2 (1.2)
NA	34	(31.5)	46 (26.6)
AM-TIC	11	(10.2)	15 (8.7)
TE-S	11	(10.2)	17 (9.8)
AM-S	0	(0.0)	1 (0.6)
TE-NA	2	(1.9)	2 (1.2)
AM-S-TIC	5	(4.6)	9 (5.2)
TE-S-TIC	0	(0.0)	2 (1.2)
AM-TIC-CF	1	(0.9)	1 (0.6)
AM-TE-S-TIC	5	(4.6)	22 (12.7)
AM-S-NA-TIC	1	(0.9)	1 (0.6)
TE-S-SXT-CF	1	(0.9)	1 (0.6)
TE-S-NA-TIC-AM	3	(2.8)	3 (1.7)
None	34	(31.5)	50 (28.9)
Total	108	(100)	173 (100)

Table 4-3. Multi-drug resistance and patterns of *Salmonella* Enteritidis

	No. (%) of resistance patterns						
	None	1	2	3	4	5	6
Chickens (n=108)	34(31.5)	34(31.5)	24(22.2)	6(5.6)	7(6.5)	3(2.8)	0(0.0)
Human (n=65)	16(24.6)	15(23.1)	11(16.9)	6(9.2)	17(26.2)	0(0.0)	0(0.0)

나. PFGE 와 Phage type

(1) PFGE

총 173주의 *S. Enteritidis* 에 대한 PFGE 결과 Figure 4-1과 같이 일반적으로 30-1,135kb 크기의 fragment가 11-13개로 전개되었다. 전개된 DNA fingerprinting을 BioNumerics program을 이용한 dendrogram으로 fragment의 위치에 따라서 pattern을 분류한 결과 Figure 4-1과 같이 19종류의 PFGE pattern이 나타났다. Tenover의 분류법에 따라 분석한 *S. Enteritidis* 중 가장 많은 수가 속한 PFGE type을 A1으로 명명하였으며 A, B 와 C 총 3개의 cluster로 분류 되어졌고 A의 subtype은 총 17가지로 분석되었다. 닭에서 분리된 55주와 사람에서 분리된 34주를 합한 총 89주(51.4%)의 *S. Enteritidis*가 A1으로 분류되었다. 두 번째로 많은 수의 분리주가 속한 PFGE type A6에는 닭에서 분리된 26주(24.1%), 사람에서 분리 된 4주(6.2%)를 합한 총 30주(17.3%)가 속한 것으로 나타났다. PFGE type A1, A2, A3, A6, A8 및 A13에는 닭에서 분리한 *S. Enteritidis*와 사람에서 분리한 *S. Enteritidis*가 속해있는 것으로 나타났고 PFGE type A5, A7, A10, A12, A14는 닭에서 분리된 *S. Enteritidis* 만이 속해 있고 PFGE type A4, A9, A11, A15, A16, A17, B1 및 C1은 사람에서 분리된 *S. Enteritidis* 만이 속한 것으로 나타났다. 또한 PFGE type A1을 제외한 A6(24.1%)와 A2(9.3%)가 닭에서 가장 빈번하게 분리되었고 type A13(6.4%)은 사람분리균주에서 높은 빈도로 관찰되었다. PFGE를 실시한 173주는 서로 3개 이내의 fragment 차이로 98.8% 상동성을 보였으나 사람에서 분리된 2주의 경우 유전형의 연관성에서 다소 거리가 있는 것으로 나타났다.

PFGE 결과 매우 흥미로운 것은 닭과 사람에서 분리된 모든 *S. Enteritidis*가 유전형이 일치하지 않는 것이다. 특히 닭에서 분리된 *S. Enteritidis* 중 사람에게 잘 전파되는 유전형이 있는 것으로 확인되었고 이러한 결과는 외국의 보고와도 일치하는 것으로 나타났다. 따라서 백신후보균주는 사람 분리주와 닭 분리주 중 공통적인 유전형을 지니는 균주를 선발하였다.

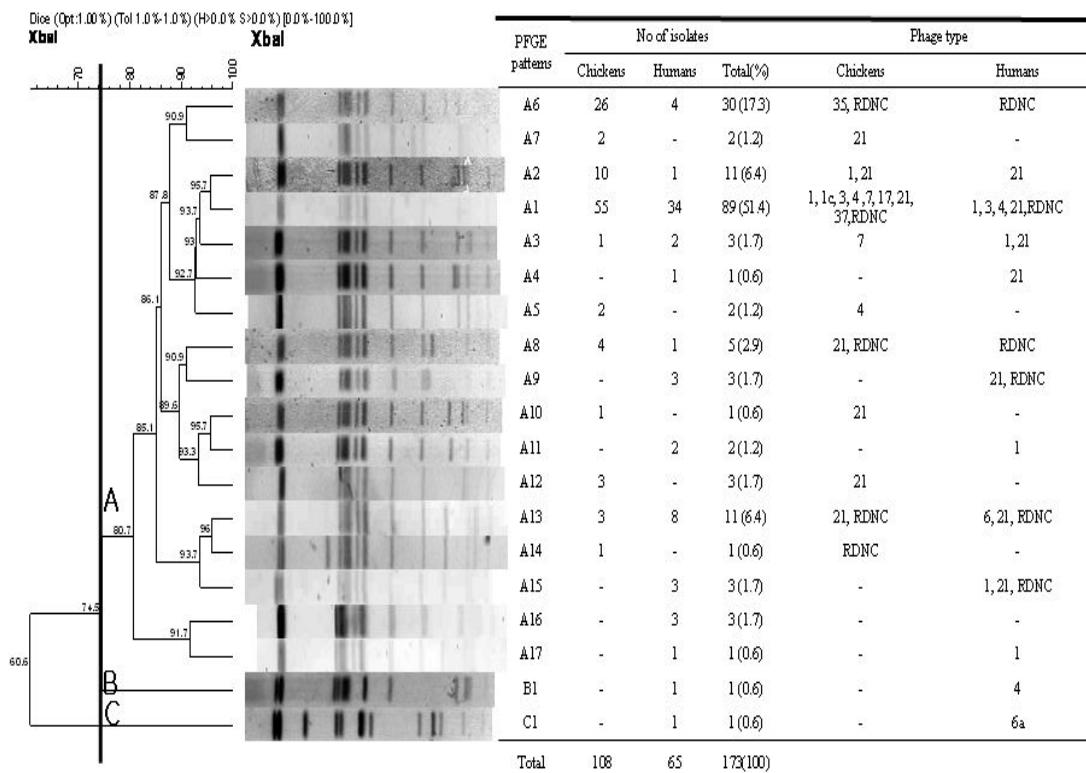


Figure 4-1. Dendrogram showing the similarities of *Xba*I digestion pattern after pulsed field gel electrophoresis (PFGE), phage types and resistance patterns for *Salmonella* Enteritidis strains from chickens and humans.

(2) Phage type

총 173주의 *S. Enteritidis* 대한 phage typing 결과는 Table 4-4와 Figure 4-1에 기술한대로 12종의 phage type(PT)으로 확인되었다. 닭에서 분리된 *S. Enteritidis* 108주 중, PT1에는 28주(25.9%) 및 PT21(18.5%)이 높게 나타났다. 그리고 PT1c가 4주, PT3이 5주, PT4가 4주, PT7이 6주, PT17이 3주, PT35가 6주 및 PT37이 2주였다. Phage와 반응은 하지만 type이 확인되지 않는 RDNC(reacted but did not conform)는 30주로 높게 나타났다. 또한 사람에서 분리된 *S. Enteritidis*에서 PT1 19주(29.2%) 및 PT21 16주(14.8%), PT4는 11주(16.9%)로 또 높게 보였으며 PT3, PT6, PT6a 각 1주, RDNC16주였다. 사람과 닭에서 분리된 총 173 균주 중에서 PT1이 47주(27.2%), 그 다음으로는 PT21이 36주(20.8%)로 가장 높게 나타났다. 1993년부터 2000년까지 닭과 사람에서 동정된 *S. Enteritidis*의 phage typing 결과 PT4(52.5%)가 가장 높게 나타났으며 PT7, PT7a가 그 다음 순으로 나타난바 있고[34], PT1의 경우에는 동기간동안 4.1% 밖에 확인되지 않았다. 그러나 최근 1994년부터 2005년까지 서울 및 수도권에서 동정된 *S. Enteritidis*의 phage typing 연구를 살펴보면 PT1과 PT21의 phage type이 현저하게 나타난 것을 볼 수 있었다[20]. PT4에서 PT1으로

S. Enteritidis phage type의 변화는 오랜기간에 걸쳐 점차적으로 바뀐 것으로 생각되며 이러한 phage type shift 현상은 이미 유럽에서 2000년 전까지 드물게 분리되던 PT14b가 현재 영국과 스웨덴에서 가장 높게 분리되는 phage type이라는 연구[35]를 보더라도 단지 우리나라에서만 일어나는 특이적인 일은 아니라는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 경향은 *S. Enteritidis*의 phage type도 시간적 또는 지역적으로 유행하는 경향이 달리 나타난다고 추측할 수 있다. 또한 사람과 닭 분리주간의 phage type간의 분포에는 유의적인 차이를 발견할 수 없었다.

다. PFGE 과 phage type과 항생제 내성

Phage type과 PFGE type간의 비교분석과 phage type과 항생제 내성과의 비교분석을 각각 table 4-5와 4-6에 나타냈다. PFGE type A1에서 닭과 사람에서 분리된 균주 중 PT1, 3, 4, 21, RDNC 같은 phage type이 주로 나타나는 것으로 보아 PFGE type이 같더라도 다른 Phage type을 보이고 이것은 김[20]등의 연구와 일치하는 것을 알 수 있다. 따라서 다른 phage type을 갖는 분리주 중에서도 유전적으로 밀접한 관련이 있는 *S. Enteritidis*를 찾을 수 있었다. phage type의 PFGE type A2에서 PT21이 주로 속해있고, type A6 및 A8에서 RDNC가 주로 속해 있으며, type A13에서는 PT21과 RDNC 균주가 주로 속해 있었다. PFGE type A3에서 닭 및 사람에서 분리된 균주의 PT은 다르게 나타나며, 닭에서 분리된 균주의 PT35는 PFGE type A6에서만 나타났다(Figure 4-1). *S. Enteritidis* PT35에서는 PFGE와 phage typing은 일치하였을 뿐 나머지 균주는 같은 PT에서 다양한 PFGE pattern이 나타나고 있어서 PFGE가 phage typing보다 훨씬 변별력이 있는 것으로 보여졌다. 그러나 사람과 닭에서 분리된 균주 중 PFGE type A1이 많은 수로 분리되어 진 것으로 보아 닭의 소비가 사람에서의 *S. Enteritidis*감염에 주요 위험요소와 관련하여 생각되어 질 수 있다.

Phage type과 항생제 내성간의 비교를 실시한 결과 특이한 연관성이 관찰되지 않았으며 사람에서의 분리주와 닭에서의 분리주간에도 어떠한 특이성은 관찰되지 않았다.

Table 4-4. Comparison of phage types for *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans

Phage type	Chickens (%)	Human (%)	Total (%)
1	28 (25.9)	19 (29.2)	47 (27.2)
1c	4 (3.7)	0 (0.0)	4 (2.3)
3	5 (4.6)	1 (1.5)	6 (3.5)
4	4 (3.7)	11 (16.9)	15 (8.7)
6	0 (0.0)	1 (1.5)	1 (0.6)
6a	0 (0.0)	1 (1.5)	1 (0.6)
7	6 (5.6)	0 (0.0)	6 (3.5)
17	3 (2.8)	0 (0.0)	3 (1.7)
21	20 (18.5)	16 (14.8)	36 (20.8)
35	6 (5.6)	0 (0.0)	6 (3.5)
37	2 (1.9)	0 (0.0)	2 (1.2)
RDNC	30 (27.8)	16 (24.6)	46 (26.6)
Total	108 (100.0)	65 (100.0)	173 (100.0)

Table 4-5. Combination of PFGE pattern and antimicrobial resistant patterns for *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and human

Group	Subtype	Resistance pattern	Combination pattern	No. of isolates	
				Chickens	Human
A	A1	NA	1	29	10
	A1	AM	2	-	1
	A1	TE-S	3	6	2
	A1	TE-NA	4	2	-
	A1	AM-TIC	5	-	2
	A1	TE-S-TIC	6	-	1
	A1	AM-TE-S-TIC	7	1	8
	A1	NA-AM-S-TIC	8	1	-
	A1	NA-AM-TE-S-TIC	9	3	-
	A1	-	10	13	10
	A2	AM-TIC	11	7	1
	A2	TE-S	12	1	-
	A2	AM-TIC-CF	13	1	-
	A2	-	14	1	-
	A3	TE	15	-	2
	A3	TE-S	16	1	-
	A4	AM-TE-S-TIC	17	-	1
	A5	NA	18	2	-
	A6	NA	19	2	-
	A6	TE-S	20	2	-
	A6	AM-TIC	21	1	-
	A6	AM-S-TIC	22	2	-
	A6	AM-TE-S-TIC	23	1	-
	A6	-	24	18	4
	A7	TE-S	25	1	-
	A7	TE-S-SXT-CF	26	1	-
	A8	NA	27	1	-
	A8	TE-S	28	-	1
	A8	AM-TE-S-TIC	29	1	-
	A8	-	30	2	-
	A9	TE-S	31	-	3
	A10	AM-TE-S-TIC	32	1	-
	A11	NA	33	-	2
	A12	AM-TIC	34	3	-
	A13	AM-TIC	35	-	1
	A13	TE-S-TIC	36	-	1
	A13	AM-S-TIC	37	2	3
	A13	AM-TE-S-TIC	38	1	3
	A14	AM-S-TIC	39	1	-
	A15	AM-S	40	-	1
	A15	AM-TE-S-TIC	41	-	2
	A16	AM-TE-S-TIC	42	-	3
	A17	AM-S-TIC	43	-	1
B	B1	-	44	-	1
C	C1	-	45	-	1

Table 4-6. Relationship of phage typing and multiple drug resistant patterns in *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans

Phage type	Resistance	Chickens	Humans	Total
1	NA	12	8	20
	TE	-	1	1
	TE-S	1	1	2
	AM-TIC	-	1	1
	AM-S	-	1	1
	TE-S-TIC	-	1	1
	AM-S-TIC	-	1	1
	AM-TE-S-TIC	-	3	3
	AM-S-TIC-NA	1	-	1
	AM-TE-S-TIC-NA	3	-	3
1c	None	10	2	12
	NA	4	-	4
3	NA	5	-	5
	None	-	1	1
4	NA	4	4	8
	TE-S	-	1	1
	None	-	6	6
6	AM-S-TIC	-	1	1
6a	None	-	1	1
7	NA	1	-	1
	TE-S	3	-	3
	AM-TE-S-TIC	1	-	1
	None	1	-	1
17	TE-S	3	-	3
21	AM	-	1	1
	TE	-	1	1
	NA	2	-	2
	TE-S	2	1	3
	AM-TIC	10	3	13
	AM-TIC-CF	1	-	1
	AM-S-TIC	-	1	1
	TE-S-TIC	-	1	1
	AM-TE-S-TIC	3	6	9
	TE-S-SXT-CF	1	-	1
35	None	1	2	3
	NA	1	-	1
	TE-S	1	-	1
	AM-TIC	1	-	1
	AM-TE-S-TIC	1	-	1
37	None	2	-	2
	NA	4	-	4
RDNC	TE-S	1	3	4
	TE-NA	2	-	2
	AM-S-TIC	5	1	6
	AM-TE-S-TIC	-	8	8
	None	18	4	22
	Total	108	65	173

2. *S. Enteritidis*의 불활화 백신 개발을 위한 연구

가. *S. Enteritidis*의 불활화 백신용 백신균주 선발

본 연구팀은 이전에 사람과 닭에서 분리한 SE 총 173주를 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), 항생제 감수성시험, phage type 등을 분석하였다[19]. 그 중 대표적인 phenotype을 가진 사람에서의 분리주 5주와 닭에서의 분리주 6주를 포함한 총 11주의 *S. Enteritidis*를 선택하여 본 실험에 사용하였다. 대표균주 11개 중에서 사람과 닭에서 분리된 균주 중 병원성이 높은 2개 균주를 각각 선발하고, 병원성 및 면역원성에 대한 재시험을 실시하여 사람과 닭 분리균주 각각 1 개씩 불활화 백신균주를 선발하였다.

(1) 균주목록

Table 4-7. *Salmonella Enteritidis* strains used in this study.

DCA No.	IVK No.	origin	Bacterial name	PFGE type	Phage type	Resistant pattern
DCA 0031	IVKB01277	chicken	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A6	PT35	AM-TE-S-TIC
DCA 0032	IVKB01295	chicken	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A1	PT7	AM-TE-S-TIC
DCA 0033	IVKB01390	human	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A6	RDNC	
DCA 0034	IVKB01296	chicken	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A6	PT35	
DCA 0035	IVKB01350	human	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A1	PT21	AM-TIC
DCA 0036	IVKB01352	human	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A6	RDNC	
DCA 0037	IVKB01365	human	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A1	PT3	
DCA 0038	IVKB01369	human	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A1	PT21	AM-TE-S-TIC
DCA 0039	IVKB01322	chicken	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A1	PT1	
DCA 0040	IVKB01270	chicken	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A6	PT35	AM-TIC
DCA 0041	IVKB01298	chicken	<i>Salmonella</i> Enteritidis	A1	PT17	TE-S

RDNC=reacted but did not conform

AM, ampicillin; TIC, ticarcillin; TE, tetracycline; S, streptomycin.

(2) 병원성 및 면역원성 시험

(가) 1차시험

총 11주의 *S. Enteritidis* 분리주를 nutrient broth에 접종한 후 37°C에서 진탕배양한 후 배양액내의 균수를 접종량당, 6×10^7 cfu/0.2ml/chicken으로 조정하였다. 1-2일령 병아리를 각 군주당 40마리씩 경구로 0.2ml씩 접종한 후 10일간 폐사를 관찰하여 기록하고, 10일째 되는 날에 각 그룹에서 생존한 병아리를 부검하여, 맹장을 채취하여 균을 검출하였다. 장 내용물이 포함된 맹장을 유제로 갈아 유제액을 만든 후 10 ml selenite cystine broth (SC, BD, France)에 넣고 41°C에 24시간 진탕 배양한 후 MacConkey agar (BD)와 XLT4 agar (BD)에 접종하였다. 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 후 살모넬라의 증식 유무를 판정하였다.

① 폐사율 확인



Figure 4-2. Chick's mortality(first test).

② 맹장에서 접종균의 재분리율



Figure 4-3. Recovery in cecum.

③ 1차시험 결론

대표균주 11개 중에서 사람과 닭에서 분리된 균주 중 병원성이 높은 2개 균주를 각각 선발하여 재시험을 실시하였다.

Table 4-8. First selected strains

Origin	1차선발 균주	
chicken	DCA0031	DCA0032
human	DCA0037	DCA0038

(나) 2차시험

2차 실험의 경우 선발된 균주를 상기에 언급한 방법대로 배양한 후 접종량당, 3×10^7 cfu/chicken(1차시험의 1/2dose)로 조정하였다. 3-5일령 병아리에 균주당 30마리씩 0.2ml씩 경구로 접종한 후 2주간 폐사를 관찰하였다. 폐사되지 않은 병아리의 경우 안락사 시킨 후 간, 비장 및 맹장을 오염되지 않게 채취하였다. 각 장기의 무게를 측정한 후, 멸균된 buffered peptone water (BPW, BD)를 장기당 1ml씩 침가한 후 유제하였다. 유제액을 10배로 희석한 후, 희석된 유제액 0.1ml를 살모넬라 분리 배지인 XLT4 배지(BD)에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 XLT4 배지에 자란 S. Enteritidis균 특이적인 집락수를 측정하여 장기별 g당 cfu를 산출하였다.

① 폐사율 확인

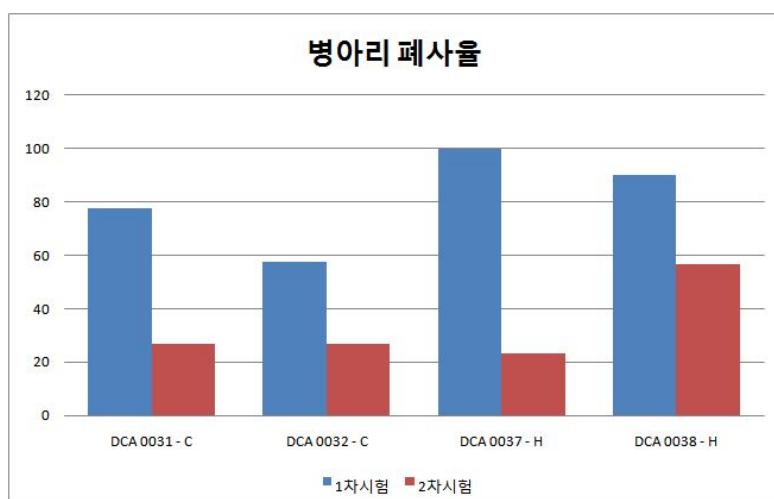


Figure 4-4. Chick's mortality (secondary test).

② liver, spleen에서 접종균주의 재분리(1차, 2차 누적 분리율)

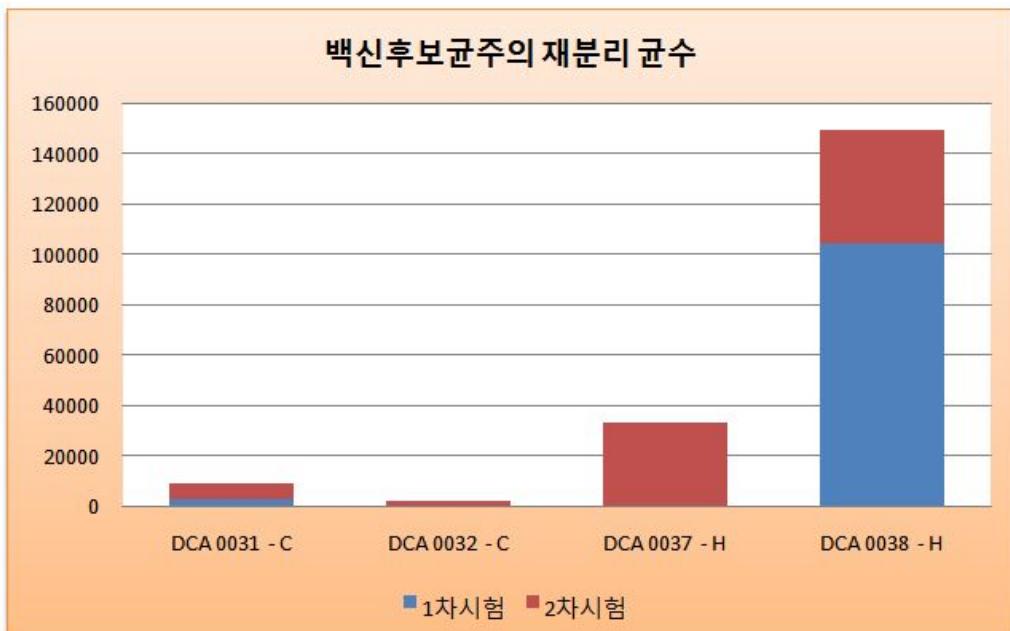


Figure 4-5. Recovery in liver and spleen.

③ 맹장에서 접종균주의 재분리 (1, 2차시험 누적 분리율)

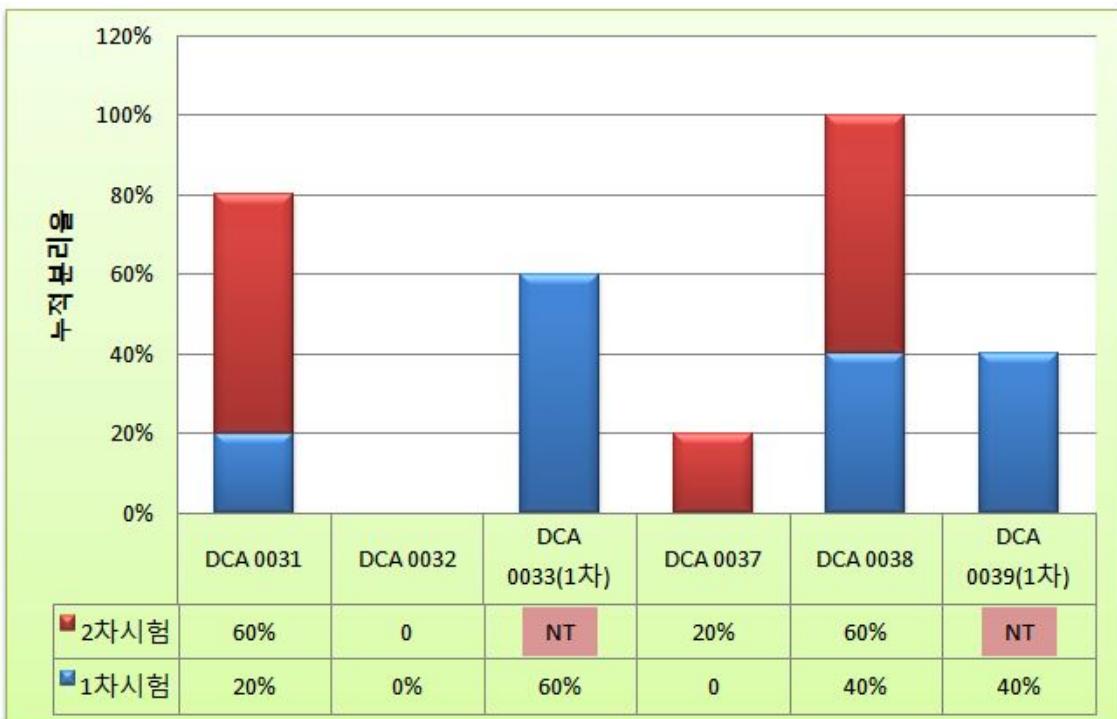


Figure 4-6. Recovery in cecum.

(3) 최종 불활화 백신후보주 선택

병원성이 높은 것으로, 사람과 닭에서 유래된 균주를 각각 한 개씩 선택하였다.

Table 4-9. Final selected strains

Origin	최종선발 균주
chicken	DCA0031
human	DCA0038

나. 불활화 백신 제조를 위한 *S. Enteritidis*의 증식성 시험, 불활화 방법, 보조제 선발, 항원량 결정

(1) *S. Enteritidis*의 증식성 시험

선발된 두 개의 균주에 대하여 배양시간에 따른 균주의 증식성을 확인하였다. 두 개의 균주를 LB broth에 접종한 후 37°C에서 최대 5시간까지 진탕배양하였다. 일정시간 간격으로 sampling 하여 spectrophotometer를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하고 증식성 확인 및 최적의 배양조건을 확립하였다.

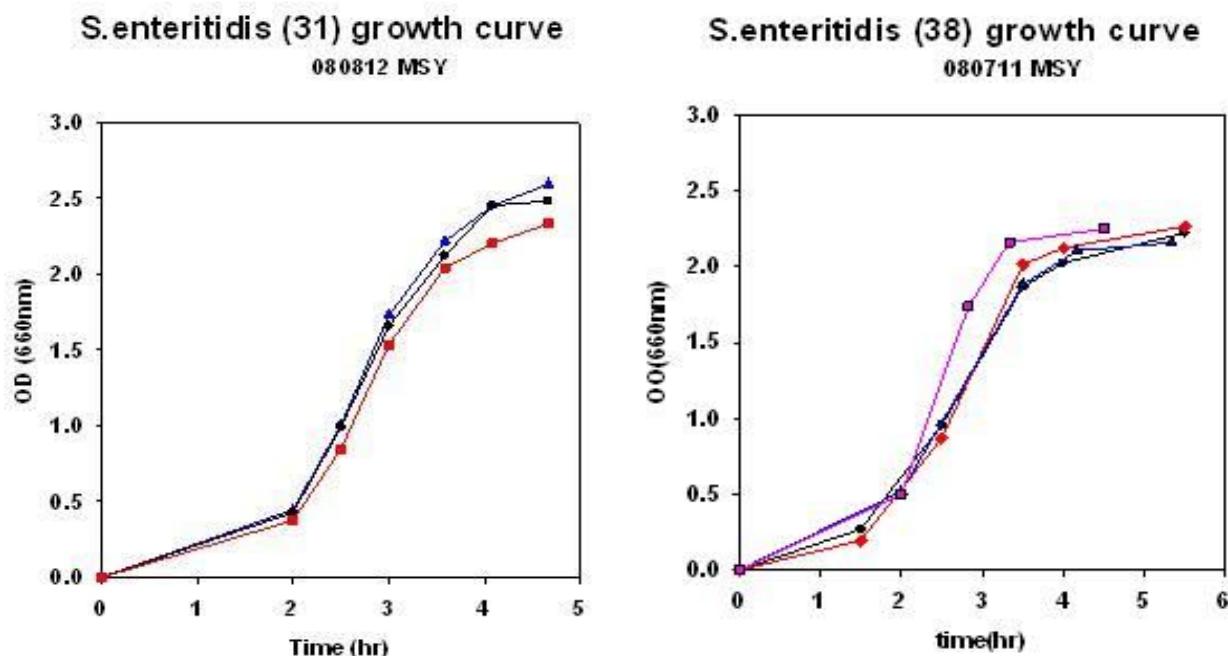


Figure 4-7. Growth curve of selected *S. Enteritidis* vaccine strains.

(2) 불활화 방법

배양된 bulk를 균수확인용 sample을 일부 채취한 뒤 0.3%(v/v) formalin을 넣고, 37°C 항온실에서 진탕하면서 3일간 반응시킨다. 반응이 끝난 뒤, Nutrient agar, Nutrient broth 및 Thioglycolate agar에 각각 접종하여 22°C 및 37°C 배양기에 7일간 배양하여 불활화 확인 시험을 실시한 결과 모든 시험백신 제조용 bulk의 불활화가 확인되었다.

(3) 보조제 선발

ISA70과 Aluminum hydroxide gel을 사용하여 백신을 제조하였으나, ISA70을 사용한 백신은 항체역가는 높았으나, 안전성에 문제가 있었고 gel을 사용한 백신은 항체역가가 상대적으로 낮았으나 안전성에는 전혀 문제가 없었다.

따라서 백신효능과 안전성에 모두 효과가 좋은 보조제를 선택하기 위하여 아래와 같은 시험백신을 제조하여 추가시험을 실시하였다.

Table 4-10. Making test vaccines with different adjuvant

시험백신	백신균주	Adjuvant 종류
I	S. Enteritidis DCA0031	gel 1
II		gel 2
III		gel + sol
IV		sol
V		gel 3

각 시험백신마다 8수의 6-8주령 닭에 접종하고 3주와 4주뒤 각각 채혈하여 MAT로 항체역가를 측정하였으며, 그 결과는 아래와 같다. Gel을 사용한 시험백신은 안전성에는 이상이 없었으며, 항체 역가의 경우 거의 차이가 없었으며 그 중 상대적으로 gel 3와 sol로 제조한 시험백신의 역가가 양호한 것으로 확인되었다.

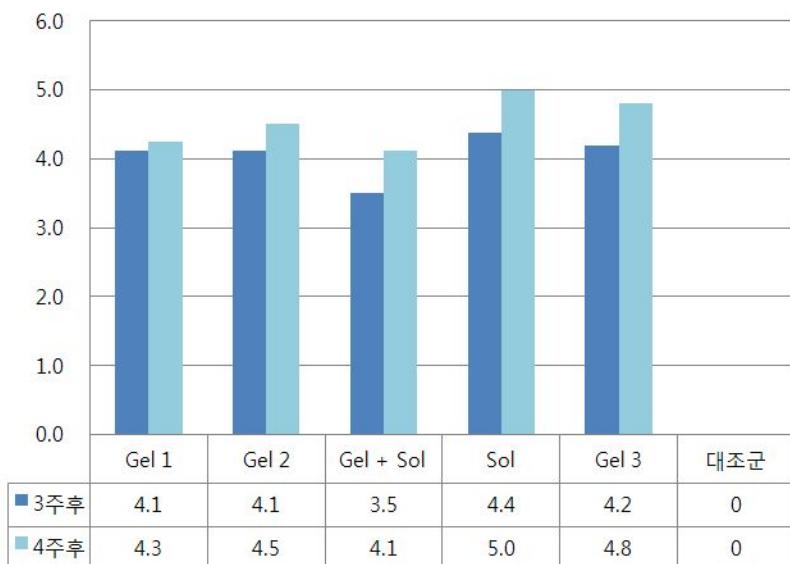


Figure 4-8. Measuring an Antibody titer after 3 and 4 weeks.

(4) 항원량 결정

(가) 시험백신 4종 생산

닭과 사람에서 분리된 균주를 각각 1OD 및 2OD에 맞춰 농도를 조절한 뒤, 불활화시켜 적절한 항원량을 알아보고자 4가지 시험백신을 제조하였다.

Table 4-11. Making test vaccines to confirm accurate antibody volume

번호	시험백신	균수	기타
1	DCA0038, 2OD	18×10^8 cfu/ml	Human-origin
2	DCA0038, 1OD	9×10^8 cfu/ml	
3	DCA0031, 2OD	28×10^8 cfu/ml	Chicken-origin
4	DCA0031, 1OD	14×10^8 cfu/ml	

(나) 4종 시험백신에 대한 Mouse 공격접종 시험

제조한 SE 불활화 백신의 방어효능을 마우스를 사용하여 평가하였다. 백신 1, 2, 3 및 4를 균별로 10수씩, 마리당 0.2ml씩 복강내로 접종하였다. 대조군은 백신대신 PBS 0.2ml를 접종하였다. 시험백신 0.2ml/mouse 복강에 접종하고 2주 후, 각각의 백신주를 생균으로 0.2ml/mouse ($10LD_{50}$) 복강에 공격접종 후 10일간 생존여부를 관찰하였다.

Table 4-12. Protection of *Salmonella* Enteritidis inactivated vaccines
against homologous and heterologous challenges in mice.

그룹	시험백신균주 및 접종량	공격접종 균주에 따른 방어율	
		DCA0038	DCA0031
1	DCA0038, 2OD	88 %	90 %
2	DCA0038, 1OD	90 %	100 %
3	DCA0031, 2OD	100 %	90 %
4	DCA0031, 1OD	90 %	70 %
대조군	무 접 종	0 %	0 %

다. *S. Enteritidis* 불활화 시험백신에 대한 시험

(1) 불활화 시험백신의 방어효과 시험

모든 혈청에 대하여, 평판응집 및 Microplate agglutination test(MAT) 및 시판중인 *Salmonella* D group에 대한 ELISA 항체 kit를 사용하여 항체역가를 측정하였으며, 백신접종 3주후 공격접종을 실시한 후 맹장과 비장에서 균 분리 시험을 실시하였다.

ELISA 방법은 *S. Enteritidis*항체 측정용 ELISA kit(BioChek)을 사용하였으며 제조회사의 방법대로 실시하였다. 최종 ELISA reader(405nm)를 이용하여 흡광도를 측정한 후 방법에 기준하여 S/P수치를 산출하여 *S. Enteritidis* 항체가를 측정하였다.

(가) ISA70을 포함한 불활화 백신에 대한 시험

① 항체역가(MAT)

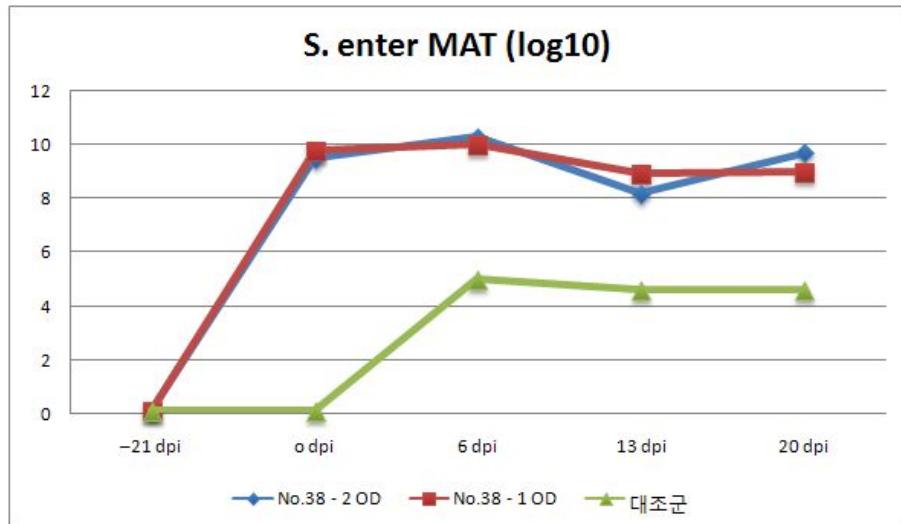


Figure 4-9. Antibody titer(MAT).

② 항체역가(ELISA)

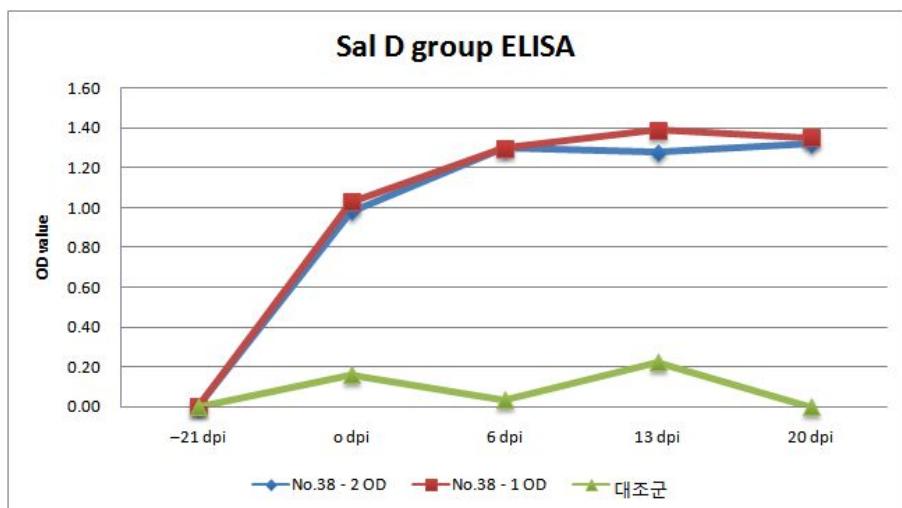


Figure 4-10. Antibody titer(ELISA).

③ 항체역가(평판응집)

Table 4-13. Antibody titer(Plate agglutination test)

Group	시험백신 1 (2 OD)										시험백신 2 (1 OD)										대조군									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
백신접종전	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
공격접종전	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
공격접종후 (6 ~ 20 dpi)		6 dpi			13 dpi			20 dpi			6 dpi			13 dpi			20 dpi			6 dpi			13 dpi			20 dpi				
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

④ 균분리 시험 결과

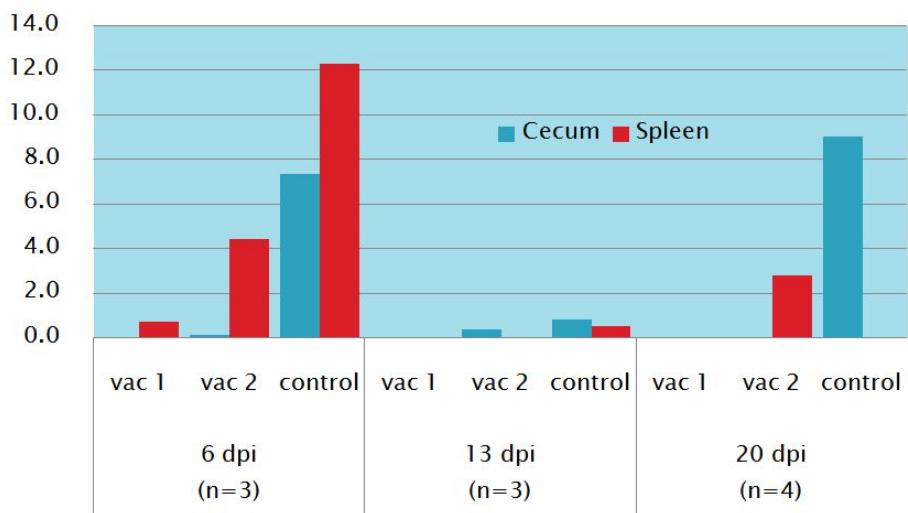


Figure 4-11. Mean colony forming unit of *S. Enteritidis* bacteria recovered from spleen and cecum in chickens.

(나) Aluminum hydroxide gel 을 포함한 불활화 백신에 대한 시험
 ① 항체역가(MAT)

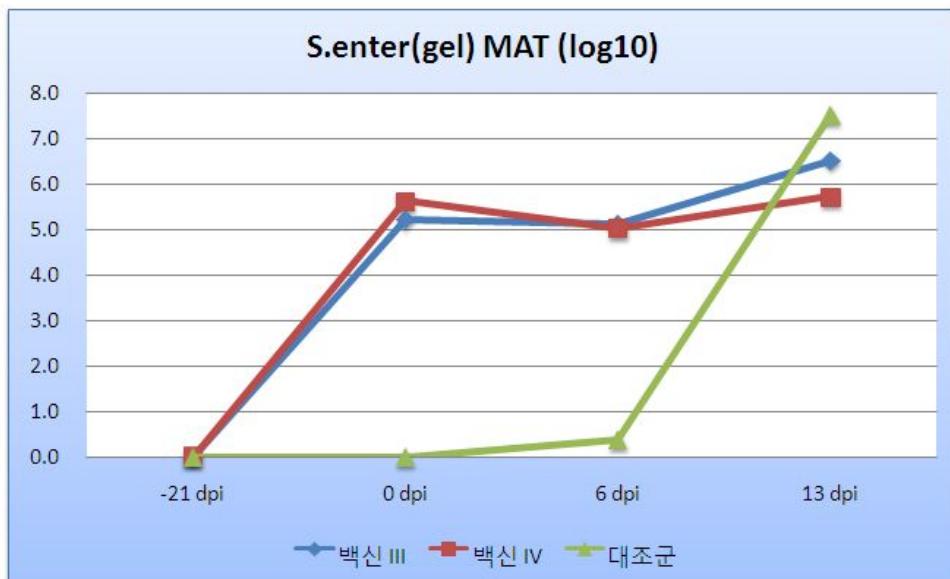


Figure 4-12. Antibody titer(MAT).

(2) 불활화 시험백신의 안전성 시험

(가) 백신접종부위 확인시험

모든 시험백신 접종 후, 접종된 시험계는 100% 생존하였으나, 접종부위를 확인한 결과, ISA70으로 제조된 백신은 접종 2주후 접종부위에 염증 반흔이 남아 있었으나, Aluminum hydroxide(gel)로 제조된 백신은 모두 흡수되어 전혀 이상이 없었다.

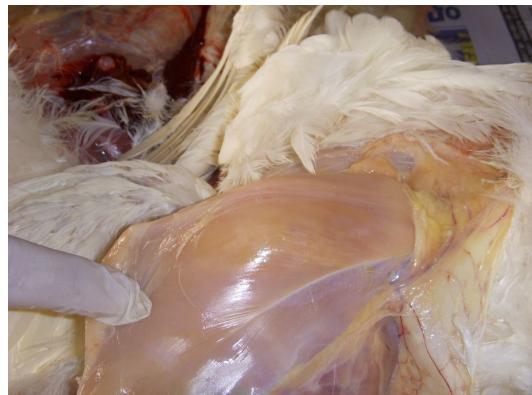


Figure 4-13. After 2 weeks, the vaccine made by ISA70 has inoculated.



Figure 4-14. After 2 weeks, the vaccine made by Aluminum hydroxide(gel) has inoculated.

(나) 백신접종 후 체중변화 확인

시험백신의 안전성을 확인하기 위해, 한 그룹은 시험백신을 사용법에 따라 근육 접종하고 다른 한 그룹은 4주 간격으로 2회 접종하여 무접종 대조군과 함께 백신 접종

10주후 까지 매주 체중을 측정하였다. 확인결과 3개의 그룹 사이에서는 유의적인 수준의 체중변화에 대한 차이를 확인할 수 없었다.

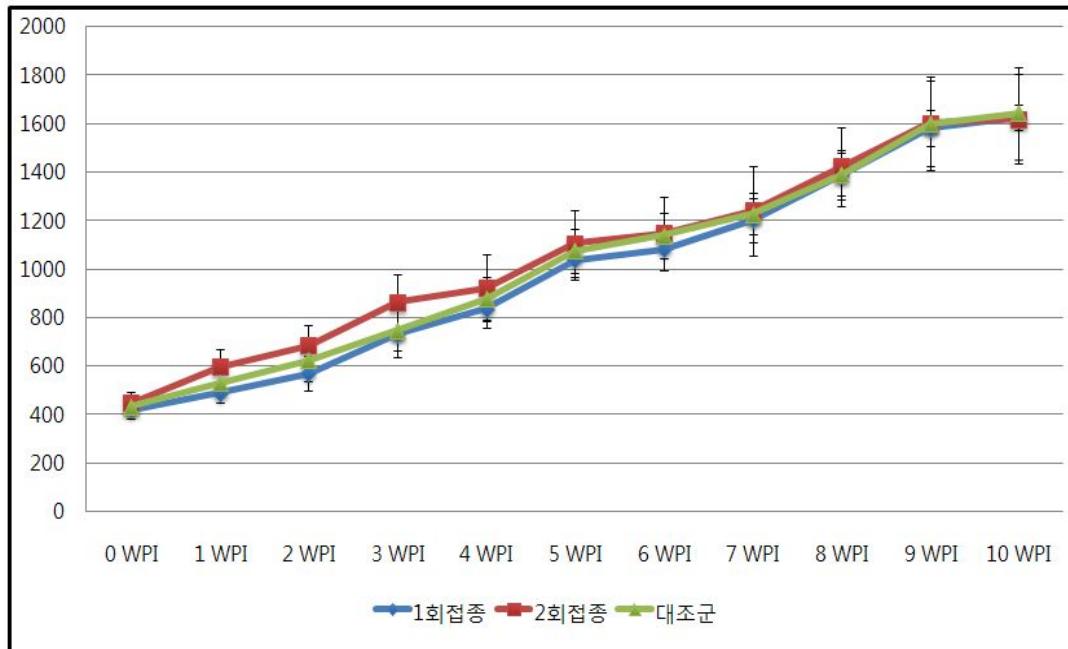


Figure 4-15. Weight change of vaccinated chickens after inoculation.

(3) 불활화 시험백신의 접종경로 및 접종량

접종경로 및 접종량은 일반 불활화 백신의 접종방법을 따라 흉부근육에 0.3ml을 접종하는 것으로 결정하였다.

(4) 불활화 시험백신의 항체역가 지속시험

(가) 동물시험방법

불활화 시험백신에 항체역가 지속 정도를 확인해 보기 위하여 6주령닭 24수를 준비하여 8수에는 1회 접종, 8수에는 3주간격 2회 접종하고 나머지 8수에 대해서는 백신을 접종하지 않고 대조군으로 두어 약 5개월간 1개월 간격으로 채혈하였다.

(나) 항체역가 측정방법 및 결과

1개월 간격으로 채혈된 혈청은 항체역가의 변화를 확인하기 위해 microplate agglutination test(MAT)를 실시하였다. MAT용 항원을 tryptose phosphate broth (Difco,

USA)에 접종하여 37°C에서 6-8시간 진탕 배양한 후 배양액을 농도 0.3% 되도록 포르말린을 첨가한 후 2-3일간 불활화한 후 7,000rpm, 10분간 원심한 뒤 PBS로 적정농도로 희석한 후 MAT용 항원으로 사용하였다. 항원 stock액을 96 well microplate에서 PBS로 2진 희석하여 4°C에서 pellet의 크기가 약 1.0-1.5mm 정도의 희석단계를 MAT 항원의 최종 희석배수로 결정하며 실험에 사용하였다. 96 well microplate 모든 well에 50μl PBS를 넣고 피검혈청을 50μl 넣고 2진 희석한 후 항원을 모든 well에 50μl씩 넣고 4°C에서 24시간 반응시킨 후 응집반응이 일어나는 최대희석배수를 혈청응집가로 인정하였다.

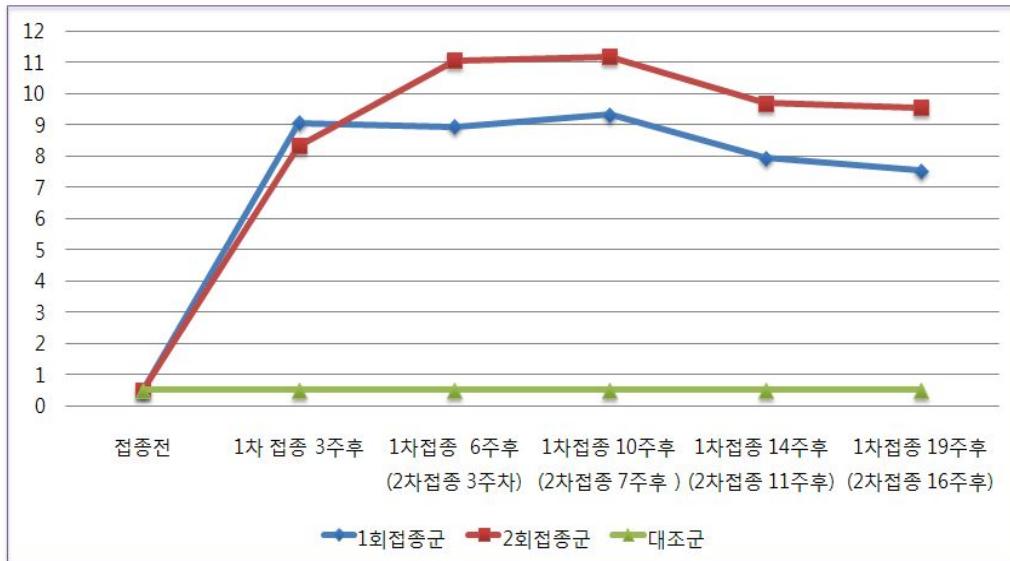


Figure 4-16. Confirming a antibody titer after inoculation.

항체역가는 1차접종 3주 후 및 2차접종 3주 후 최고 항체역가를 보인 뒤, 약 3개월까지는 거의 변화가 없다가 3개월 이후 약간의 감소를 보여, 관찰기관 5개월동안 약 1단계(2배)의 MAT역가 감소만이 확인되었다.

3. *S. Enteritidis*의 생균 백신 개발을 위한 연구

가. 생균백신 방어능 분석을 위한 공격접종균주의 선발

① 항생제 저항성 및 유전형 및 파아지형을 고려하여 아래의 균주에서 선발 하였다.

Table 4-14. *S. Enteritidis* strains having antibiotic(NA and Rifampicin) resistance

No.	IVK	Isolated from	PFGE	Resistance	Phage type	Plasmid	Time
4	IVK B01271	Chicken	A1	NA-RA	PT 21	1	
22	IVK B01292	Chicken	A1	NA-RA	PT 1	1	
49	IVK B01319	Chicken	A1	NA-RA	PT 1	2	
77	IVK B01458	Chicken	A1	AM-S-TIC-NA-RA	PT 1	2	2005
79	IVK B01460	Chicken	A1	AM-TE-S-TIC-NA-RA	PT 1	1	2005
81	IVK B01462	Chicken	A1	AM-TE-S-TIC-NA-RA	PT 1	1	2005
106	IVK B01497	Chicken	A1	AM-TE-S-TIC-NA-RA	PT 1	1	2006
121	IVK B01356	Human	A1	NA-RA	PT 1	2	2005
162	IVK B01397	Human	A1	NA-RA	PT 1	2	2004
173	IVK B01408	Human	A1	NA-RA	PT 1	2	2006

(Abbreviation은 Table 3-1 참조)

- ② 이중 SE356과 SE271을 선발하여 NA와 rifampicin이 함유된 배지에 접종하여 cfu의 감소되는 정도를 확인하였다.
- ③ NA와 Rifampicin에서 가장 %reduction이 적은 균주를 선발하고자 하였다. Rifampicin의 경우 5ug/ml에서도 상당이 균수가 감소되어 적당하지 않은 것으로 나타났다.
- ④ NA의 경우 가장 적게 균수가 감소하는 균주를 SE에서 각각 2주씩을 선발하였다.

Table 4-15. Antibiotic resistance test of virulent *S. Enteritidis* strains

Strains		CFU(cfu/ml)						
		TSA (control)	Nalidixic acid			Rifampicin		
			30 μ g/ml	% reduction	50 μ g/ml	5 μ g/ml	% reduction	7.5 μ g/ml
SE	271	1.7 x 10 ¹⁰	1.6 x 10 ¹⁰	5.8%	1.3 x 10 ¹⁰	1.3 x 10 ¹⁰	23.5%	6 x 10 ⁹
	356	7.2 x 10 ¹⁰	6.7 x 10 ¹⁰	6.9%	4.1 x 10 ¹⁰	2.5 x 10 ¹⁰	65.3%	2.1 x 10 ¹⁰

상기의 표에서 나타났듯이 5 μ g/ml rifampicin아 첨가된 TSA배지에서도 23.5~65.3%의 균역제가 나타났기 때문에 공격접종균주만 분리할 수 있는 선택배지로는 부적합한 것으로 나타났다. 이에 반면에 nalidixic acid (NA)의 경우 30 μ g/ml 첨가한 배지에서는 5.8~6.9%의 비교적 낮은 균역제가 일어났기 때문에 30 μ g/ml의 농도로 공격접종균주 분리용 선택배지로 사용하였다.

(3) 선발된 공격접종균주의 마우스에서의 병원성

Table 4-16. challenge strains investigation in mice

Strain		Dead/total			LD ₅₀
		10 ⁵ cfu	10 ⁶ cfu	10 ⁷ cfu	
SE	271	2/5	5/5	5/5	6.8×10 ⁵
	356	4/5	5/5	5/5	2.4×10 ⁴

SE271의 경우 LD₅₀가 6.8X10⁵, SE356의 경우 2.4X10⁴을 보여 SE356 strain이 다소 낮게 나타났다. 최종적으로 SE356과 SE 271을 공격접종균주로 선발하였다.

나. *S. Enteritidis*의 polyphosphate kinase (ppk) 변이주

(1) Heat shock에 대한 영향

아래 그림에서 나타난 바와 같이 SE wild type (WT)에서는 약 36.2%의 생존율을 보인 반면에 SEppk-1과 SEppk-2 변이주는 각각 mutant들은 5.4%이하의 생존율을 보여 열처리에 대한 저항성이 소실된 것으로 나타났다 (Figure.4-17)

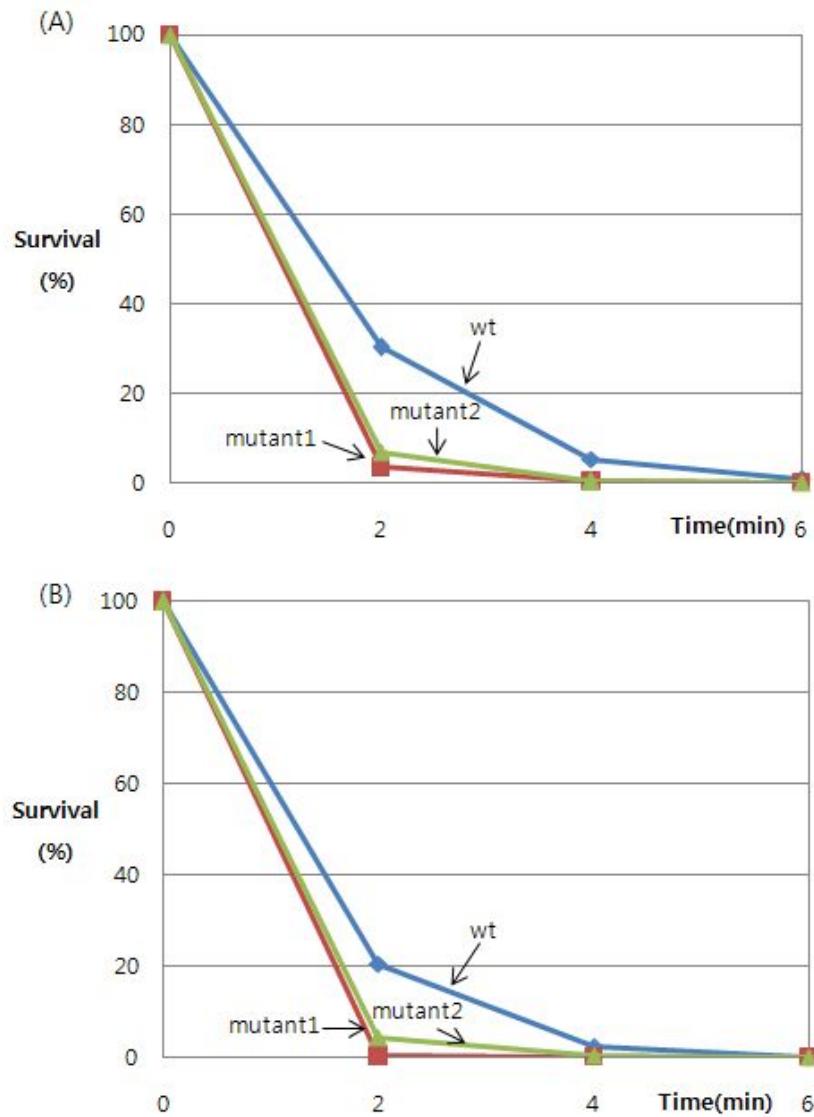


Figure 4-17. Heat-shock survival of WT and ppk mutants of *S. Enteritidis*.

(A) 5×10^3 cfu/0.1ml (B) 5×10^2 cfu/0.1ml

(3) *S. Enteritidis* ppk변이주의 침투성에 대한 영향

HeLa cell에서 invasion 검사를 실시한 결과 SE ppk 변이주가 WT에 비해 74.1~92.4% 정도로 침투성이 소실하였다. 이러한 결과는 ppk변이주가 병원성을 소실하였음이 확인되었다($p<0.05$).

Table 4-17. Invasion assay of *S. Enteritidis* WT and ppk mutants in HeLa cell line

	Amount of Inoculation						Amount of Inoculation					
	1×10^4 cfu			Mean ±SD	% loss	1×10^3 cfu			Mean ±SD	% loss		
	1st	2nd	3rd			1st	2nd	3rd				
SE(WT)	160	239	235	211±44	-	28	22	16	22±6	-		
SEppk-1	3	2	69	24.7±38.4	89.3	0	2	15	5.7±8.1	74.1		
SEppk-2	1	48	0	16±27.4	92.4	1	5	1	2.3±2.3	89.5		

(4) PCR에 의한 ppk유전자의 deletion의 확인

SE WT의 경우 2021bp의 완전한 ppk유전자가 검출된 반면, ppk변이주들은 2021보다 작은 1700bp정도 크기의 절편이 합성되었다. SE WT에서 증폭한 유전자와 SEppk-1과 SEppk-2에서 합성한 유전자를 TOPO에 삽입한 후 염기서열을 분석한 결과 WT에서는 GeneBank에서 등재된 ppk유전자와 동일한 염기서열의 2021bp의 염기서열이 확인된 반면에 ppk변이주에서는 897~1200bp사이의 303bp가 결손된 염기서열을 지니는 것으로 확인되었다 (data not shown).

(5) *S. Enteritidis* wild type과 ppk 변이주의 증식성 비교

동일한 접종량을 TSB에 접종 후 37°C에서 배양한 후 3, 6, 9시간에 cfu를 측정한 결과 *S. Enteritidis* wild type과 *S. Enteritidis* ppk-2변이주는 증식성에 있어서 별다른 차이가 나타나지 않았으나 *S. Enteritidis* ppk-1변이주는 증식성이 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 동일한 균주를 TSB에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하면서 시간마다 OD₆₀₀을 측정하였다. *S. Enteritidis* wild type에 비해 두 종류의 SEppk 변이주가 증식성이 떨어지는 것으로 나타났으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다(Figure 4-19).

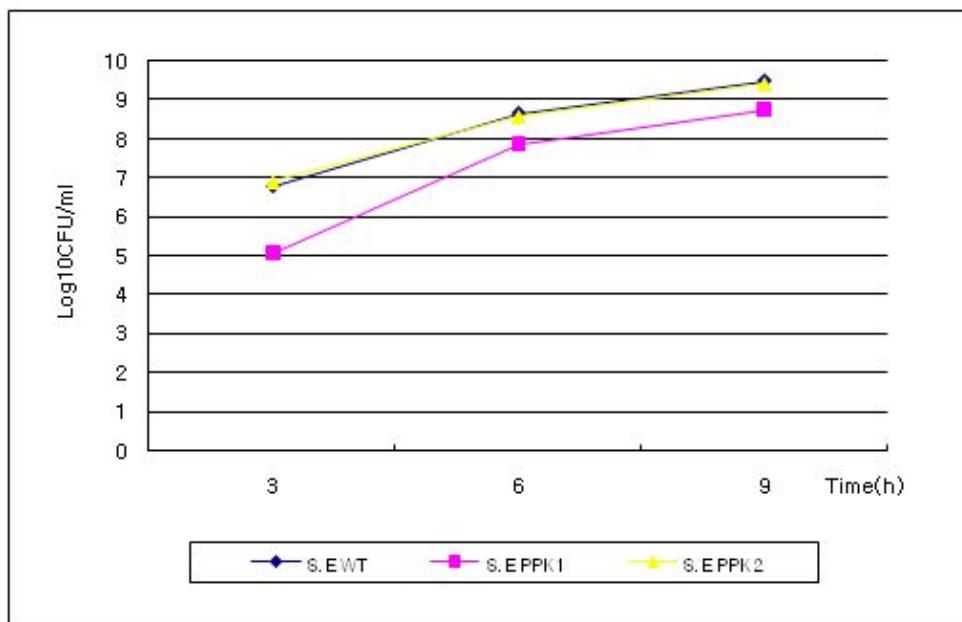


Figure 4-18. Grown patterns of *S. Enteritidis* wild type and PPK strain at 3, 6 and 9 hours.

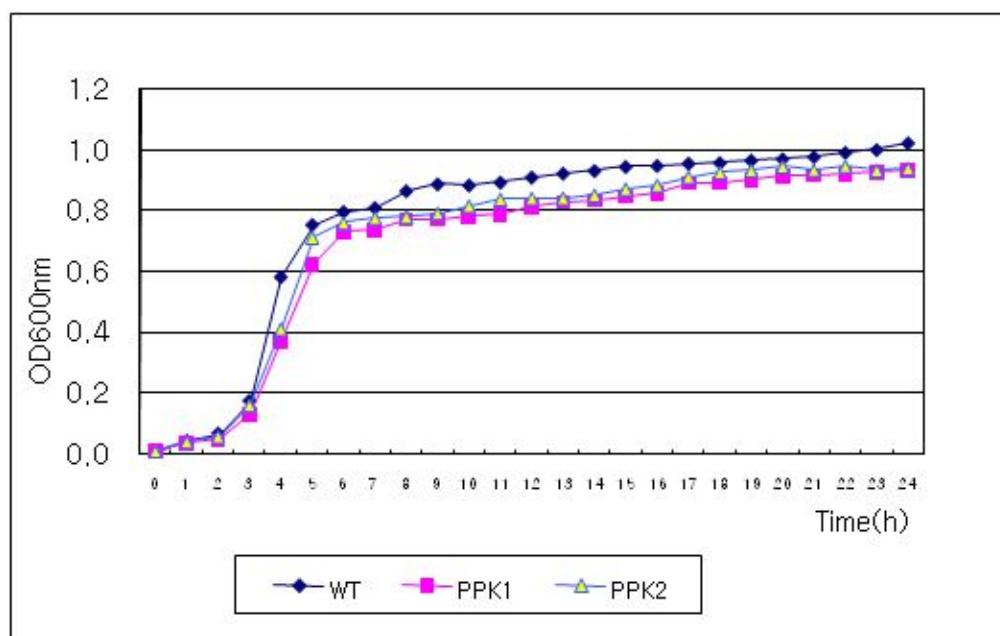


Figure 4-19. Grown patterns of *S. Enteritidis* wild type and PPK strain in 24 hours.

(6) *S. Enteritidis* wild type와 ppk변이주의 마우스에서의 병원성 시험.

S. Enteritidis wild type과 ppk변이주를 표 4-18에서 나타난 농도로 마우스의 복강내로 접종한 후 2주에 걸쳐 마우스의 생존성을 비교하여 병원성을 측정하였다. *S. Enteritidis* wild type에서는 전용량에 걸쳐 생존한 마우스가 없기 때문에 매우 높은 병원성을 지니는 것으로 나타났다. 그러나 ppk변이주에서는 10^9 cfu를 접종한 마우스에서는 모두 생존하였고 10^8 cfu를 접종한 마우스에는 40~60%가 생존하였으며 10^7 cfu를 접종한 군에서는 100% 생존율을 보여 wild type에 비해 병원성이 많이 소실된 것으로 나타났다 (Table 4-18).

Table 4-18. Virulence of *Salmonella* Enteritidis wild type and ppk mutants in mice

type	Survivors/Total(%)		
	10^9 cfu	10^8 cfu	10^7 cfu
wt	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
ppk-1	0/5 (0)	3/5 (60)	5/5 (100)
ppk-2	0/5 (0)	2/5 (40)	5/5 (100)

(7) *S. Enteritidis* wild type와 ppk변이주의 닭에서의 병원성

Figure 4-20에서에서 나타난 바와 같이 wild type의 경우 간에서 40%, 비장과 맹장에서는 100%의 SE가 검출되었다. 그러나 SEppk변이주의 SEppk-1변이주에서는 간과 비장에서는 80%, 맹장에서는 100%의 검출율을 보였고, SEppk-2변이주의 경우 간에서는 60%, 비장에서는 80%, 맹장에서는 100%의 검출율을 보였다. 이러한 검출율은 SE wild type보다는 다소 낮은 것으로 나타나 병원성이 소실된 것으로 보여지나 경우 간과 비장에서 다소 낮은 수치의 검출율을 보였다. 이러한 수치는 SEppk변이주가 wild type보다는 병원성이 감소되었지만 백신으로서 충분히 약독화 되지 않은 것으로 판단된다.

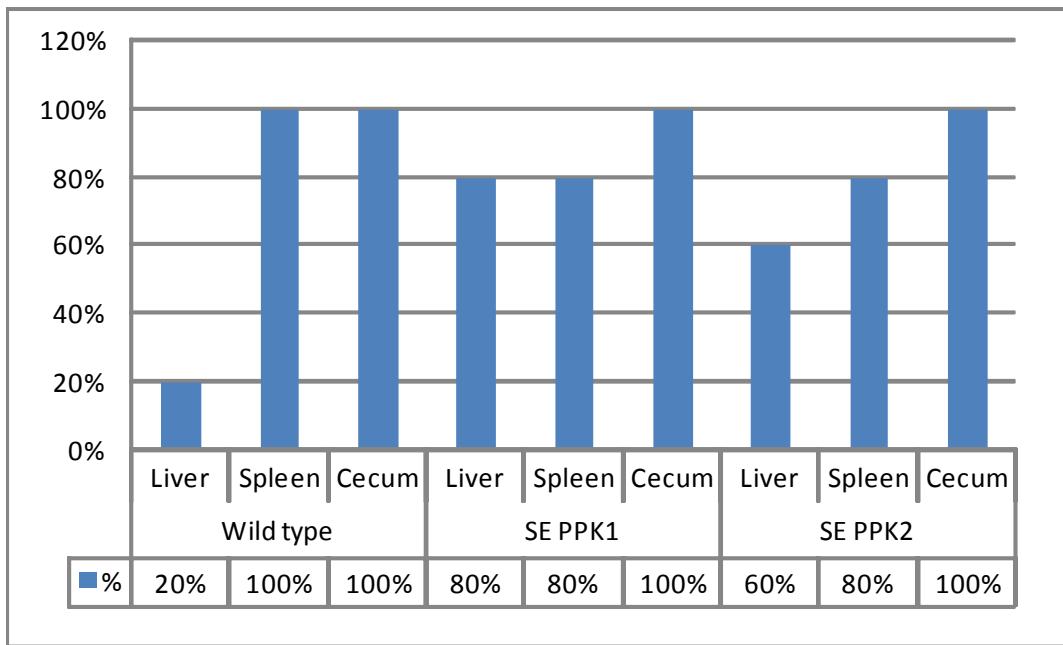


Figure 4-20. Recovery of *S. Enteritidis* wild type and ppk mutant from liver, spleen and cecum of infected chickens.

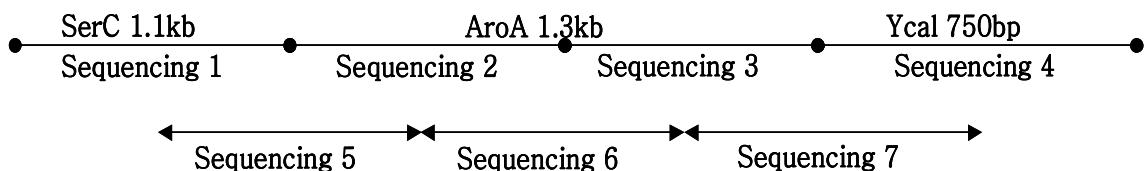
또한 In vitro에 시험결과와 In vivo의 시험결과가 서로 상이할 수 있고 마우스에서의 병원성이 소실되었다 하더라도 최종 목적동물인 닭에서는 병원성이 소실 되지 않을 수 있음이 확인되었다. McMeechan 등[24]의 보고에 의하면 *S. Typhimurium*의 ppk변이주는 마우스와 닭에서 충분히 병원성이 소실되었으나 *S. Gallinarum*에서는 병원성이 소실되지 않는 것으로 확인되었다. 동일한 살모넬라인데도 불구하고 ppk결손 변이주가 살모넬라 혈청형에 따라 병원성이 소실되거나 소실되지 않는 이유는 각 혈청형에 따른 병원성의 차이와 숙주 영역에 따른 차이라고 설명하고 있다. 그러나 본 연구과제에서 나타났듯이 *S. Enteritidis*가 닭에서 병원성이 소실되지 않는 이유는 앞서 발표된 연구고찰과는 다름을 제시한다. 따라서 각 혈청형에 따른 병원기전의 차이가 다르기 때문으로 사료된다. 또한 실험실적으로 ppk 변이주가 약독화된 것으로 관찰되었고, 마우스에서도 병원성이 다소 소실된 것으로 나타났으나 닭에서는 병원성의 차이가 없는 것으로 볼 때 목적동물을 가지고 병원성 소실을 정확히 판단하는 것이 약독화 변이주를 스크리닝하는데 직접적이고 효율적이라는 판단이 든다. 비록 *S. Enteritidis*에서 병원성이 소실되지 않는 것으로 나타났지만 본 연구는 세계 최초로 ppk변이주에 대한 병원성 소실 유무를 관찰하는데 의의가 있다고 볼 수 있다.

다. *S. Enteritidis*의 영양요구성 변이주 (aroA주)

국내에서 분리된 *S. Enteritidis*에 대한 영양요구성 백신을 제조하기 위하여 방향족 아미노산의 생합성 과정에 관여하는 aro A유전자를 mutation시킨 뒤 성장률을 비교 관찰하였다.

(1) *S. Enteritidis*로부터 aro A 유전자의 클로닝

(가) *S. Enteritidis*의 전염성을 간직한 target gene *aroA*를 cloning.



S. Typhimurium, *S. Enterica*, *S. Gallinarum*의 AroA부분 homology 비교 후 *S. Enteritidis*와 가장 유사한 *S. Enterica*에서 primer 제작.

(나) 확보된 *S. Enteritidis*를 minimal media에서 aromatic amino acid를 공급하면서 키웠다.

(다) Chromosomal DNA를 뽑은 후 polymerase chain reaction을 이용하여 aroA gene을 *S. Enteritidis*의 chromosomal DNA에서 증폭시켰다.

① *S. Enteritidis*에서 genomic DNA preparation.

: aroA를 PCR하기 위해 genomic DNA 확보.

② *S. Enteritidis* genomic DNA에서 aroA PCR.

: 1.3kb정도되는 aroA를 PCR후 sequencing하기 위해 650bp정도로 나눠서 PCR.

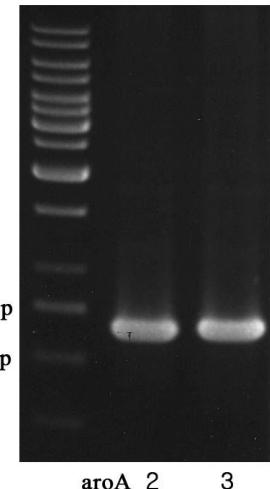


Figure 4-21. PCR of *S. Enteritidis* genomic DNA hybridized with PCR product of aro A gene.

Table 4-19. Nucleotide and deduced amino acid sequence of aro A gene in *S. Enteritidis*

(aroA)
atggaatccc tgacgttaca acccatcgcg cgggtcgatg ggcgcattaa tttacctggc tccaaaagtg ttcaaaacgg tgctttgctc ctggcgctt tagcttgtgg taaaaccgtt ctgacgaatc tgctggatag cgatgacgtc cgccatatgc tcaatgccct gagcgcgttg gggatcaatt acacccttc tgccgatcgc acccgctgtg atatcacggg taatggcggc ccattacgtg cgccaggcgc tctggaactg ttctcggtt atgcccgaac cgcgatcgct ccgttagcgg cagcgctatg tctggggcaa aatgagatag ttttaaccgg cgaaccgcgt atgaaagagc gtcctatagg ccatctggtt gattcgctgc gtcaggcgg ggcgaatatt gattacctgg agcaggaaaa ttatccgccc ctgegtctgc gcccgggtt tattggcggc gacattgagg ttgatggtag cgttccagc cagttctga ccgtctgtc gatgacggcgc ccgctggccc ctaaagacac aattattcgc gttaaaggcg aactggtatac aaaaccttac atcgatatac cgctaaattt aatgaaaacc ttggcggtgg agatagcgaa ccaccactac caacaatttgc tcgtgaaggg aggtcaacag tatcaetctc caggtcgcta tctggcggag ggcgatgcct cgtcagcgtc ctatcttc gcccgggg cgataaaagg cggcacggta aaagtgaccg gaattggccg caaaagtatg cagggcgata ttgtttgc cgatgtgtcg gagaaaaatgg gcgcgaccat tacctggggc gatgattttt ttgcctgcac gcgccgtgaa ttgcacgcca tagatatgg tatgaaccat attccggatg cggcgatgac gattgccacc acggcgctgt ttgcgaaagg aaccacgacg ttgcgcaata ttataactg gcgagtgaaa gaaaccgatc gcctgtcg c gatggcgacc gagctacgta aagtggcgcc tgaagtgaa gaagggcaccg actatattcg tatcacggc cggcgaagc tccaacacgc ggatattggc acgtacaacg accaccgtat ggcgatgtgc ttctcaactgg tcgcactgtc cgatacgc gttacgatcc tggaccctaa atgtaccgca aaaacgttcc ctgattattt cgaacaactg gcgcgaatga gtacgcctgc ctaa

(2) SerC와 Ycal PCR 후 sequence

재조합을 위해 aroA의 앞뒤 유전자가 필요하여 *S. Enteritidis*에서 aro A 앞뒤 유전자 SerC와 Ycal 을 찾아 primer를 제작하여 PCR 후 sequencing하였다(Fig.4-22).

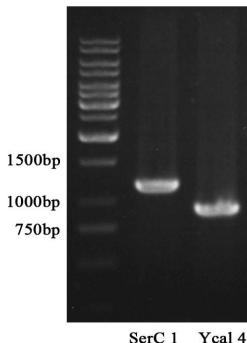


Figure 4-22. PCR of *S. Enteritidis* genomic DNA hybridized with PCR product of SerC and Ycal gene.

Table 4-20. Nucleotide and deduced amino acid sequence of SerC and Ycal gene in *S. Enterica*.

(SerC)

```
atggctcagg tcttaattt tagttcaggt ccggcgatgc taccggcgga agtacttaaa  
ctggcgcaac aggaactgcg tgactggcac ggtcttggta cgtcggtaat ggaaatttagc  
catcgaggca aagagttat ccaggtcgct gaagaggcgg agcaggattt tcgcgatctc  
cttaatatcc cctccaacta taaagttta ttttgtcacg gcggcggtcg cgggcagttt  
gctggcggtgc cgctcaatct gctggcgat aaaaccacgg cggattatgt cgatgctgg  
tactggcgccg cgagcgccat caaagaagcc aaaaaatact gtgcgccgca gattatcgac  
gccaatca ccgttgacgg caaacgtgcc gtaaaaaccga tgcgcgagtgc gcaagcttc  
gataacgcgg cttatttaca ctattgccc aatgagacca ttgacggcat cgccatcgat  
gaaacgcggg atttggccc ggaagtggtc gtcacggcg attttcttc taccatctg  
tctgcgccgc tggacgtctc tcgctatggc gtaatttatg ctggcgcgca gaagaatatc  
ggtccggcag gactgacgct gttatcgct cgggaggatc tgtaggcaa ggccatgag  
agctgeccgt ccatectcgta ctacaccgtc ctgaatgata acgactcgat gttaaatacg  
ccgcccgaattt tgectggta tcttccggc tgggtgtca aatgggtgaa agcgcaggc  
ggcgtggcg cgatgcacaa aatcaatcag caaaaagcgg agttgtgtta cgggtgtgatt  
gataacagcg atttctaccg taacgtgtc gcacaggcca accgttcgcg gatgaatgtt  
ccgttccagt tagcggacaa tgcgtggac aaggcttgc tggaaaggatc ttgcgc  
ggtctgcacg cttaaaagg gcaccgtttt gttggcgaaa tgcgcgcctc tatctataac  
gccatgccga ttgaagggtt aaaaagcgtta accgatttca tgcgtgtt tgacgtgc  
cacggctaa
```

(YcaL)

```
atgaaaaata aatcattact actggcggtg gcgattccg ccacgctact ggcaggatgt  
aaaaatggcg tgaatggcaa ttaatcgcc agttcaggca tgtcagccaa caaagccgc  
acaactgtccg atgeggatgt taaggcatta tctaataatg cctgtaaaca aatggacagc  
gagaatcaac tggcagggttc gaaaagcaaa tacaccaa ac gcttgagcaa aatgc当地  
gctgctggta acaacattga cggtacgccc gtttagctata aagtctatat gaccagcgat  
atcaacgcatttgc gggcgatggc gaacgggttc gttcgcgtat actccggct gatggatctg  
atgaccata atgaaattga aggctactg ggccatgtct cttagggca ctctcgcaag  
gcaatgcaga ccgettatgc caegetggcg gtcgcgtat cgattccgc caccagcggc  
gtcgcagcgc agcttccca gtctcaatttggcgatctgg cgaaaggcgt catcaatttgc  
gcgttttcgc gcaacttcaggca gtcggatgatg gatgacttcttacatct gctgaaaaaaa  
cgcgggatttacacccaggctttagtcacg gcattcgata aattgc当地 aatggacgca  
ggcatgcaa aatcatttgc gactccac ccggatttcag ccgatgcgc gcagcatatg  
cgcgacagaa ttgccgaaga taaaaagtaa
```

(3) SerC와 aro A/ aro A와 YcaL 사이의 sequence

SerC와 aro A 그리고 aro A와 YcaL 사이의 염기서열을 알기 위해 각각의 primer 제작 후 PCR 시행하였다(Figure 4-23).

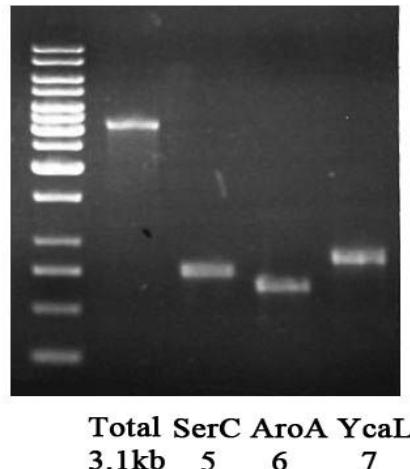


Figure 4-23. PCR of *S. Enteritidis* genomic DNA hybridized with PCR product of between SerC and aro A, between aro A and YcaL gene.

Table 4-21. Nucleotide and deduced amino acid sequence of between SerC and aro A, between aro A and YcaL gene in *S. Enteritidis*

(SerC와 aro A사이 sequence)
ttcgtttctt tttcatccc cacggccagt ctgtggggtt tttatttcg tttttgaga gttgagttc
(aro A와 YcaL사이 sequence)
gtcttctgtt gcgccagtcg acgggctggc gcgcgcagtc cgtattcgca ctattttat aattatgact aatgctaatt tggtgatgtat ttaacacatt gatttatgtg tttttataa tagttatcaa cggaagatta gt

(4) *S. Enteritidis*에서 SerC, aro A, YcaL를 모두 포함한 유전자

*S. Enteritidis*에서 SerC, aro A, YcaL를 모두 포함한 유전자를 PCR을 시행하였다. 전체를 포함한 결과는 3.3kb였다(Figure 4-24).

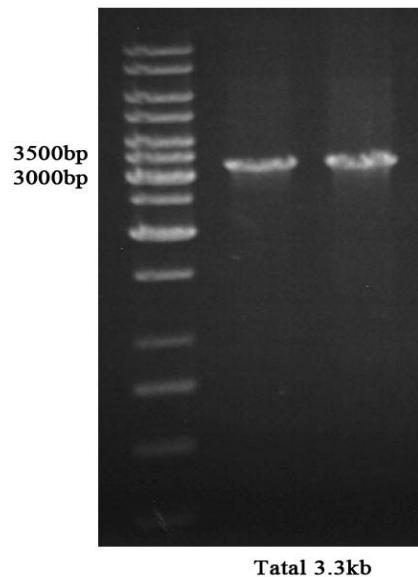


Figure 4-24. PCR of *S. Enteritidis* genomic DNA hybridized with PCR product of SerC, aro A, YcaL gene.

(5) T vector ligation

aro A부분 3.3Kb PCR product를 T vector에 ligation을 실시한 뒤, T vector가 suicide vector가 되는지 시험하기 위하여 PCR을 시행하였다(Figure 4-25).

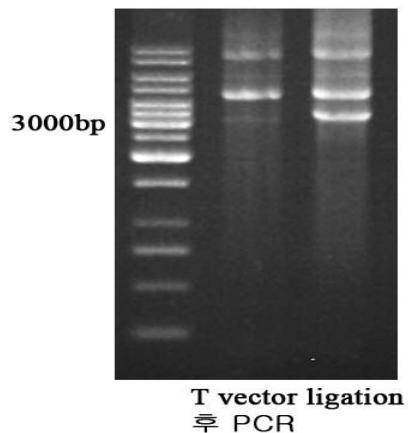


Figure 4-25. PCR after T vector ligation.

(6) Mutant aro A 유전자의 클로닝

Conjugation 유무를 확인하기 위해 selection marker인 Kanamycin cassette를 넣고 enzyme site를 추가하는 aroA 100bp deletion primer 제작하였다.

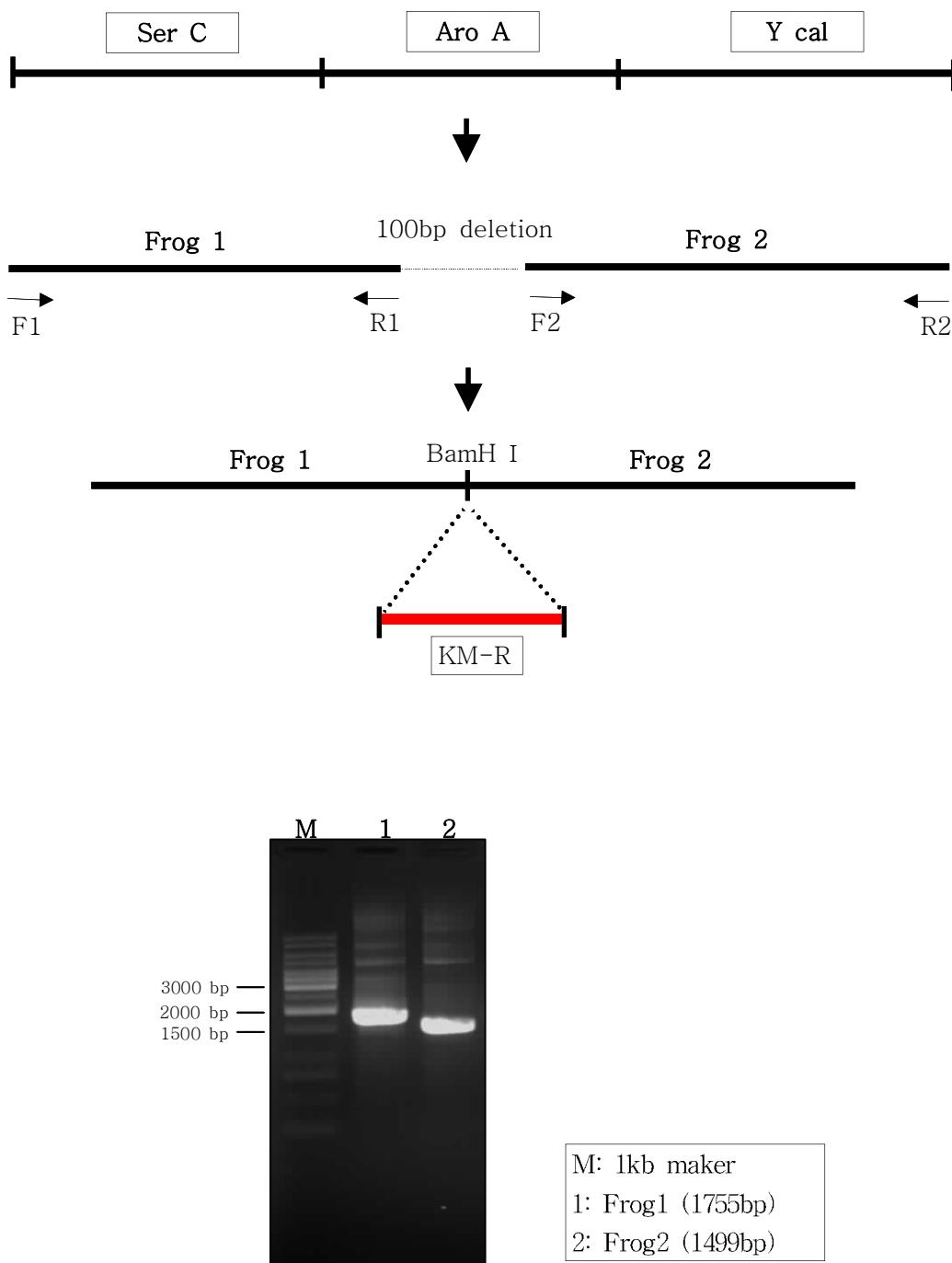


Figure 4-26. PCR of aro A 100bp deletion.

앞의 primer를 이용하여 aroA 100bp deletion 된 약 1.8kb와 1.5kb 두 개의 PCR 산물을 얻었다(Figure 4-26). 각각의 PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 삽입하고 sequencing을 맡겨 확인하였다. 그리고 각각의 산물을 제한효소 BamH I을 처리한 후 두 산물을 ligation 하였으며 그 사이에 Kanamycin cassette(pS43-Km3)를 삽입하였다.

이렇게 제작된 재조합 mutant aroA 유전자를 *Salmonella*에 형질전환하기 위해 제한효소 SacII를 처리하여 linearization 해준 후 electroporation하였다. Kanamycin이 포함된 LB plate에 키웠다.

(7) Mutant *Salmonella*의 선별

Kanamycin이 포함된 LB plate에서 자란 colony들 중에 원하는 mutant salmonella를 선별하기 위해 최소배지 plate와 aromatic amino acid가 포함된 혼합배지 plate에 각각 키웠다. 그리고 aromatic amino acid가 포함된 혼합배지 plate에서 잘 자라는 colony만 선택하였다.

(8) 정상적인 *S. Enteritidis*와 aroA mutant *S. Enteritidis*의 성장률 비교

위의 결과로 만들어진 aroA mutant *S. Enteritidis*의 성장률을 실험하였다. LB + kanamycin medium 3ml에 control과 aroA mutant *Salmonella*를 키운 뒤, 각각의 sample 을 최소배지(minimal medium)와 방향족 아미노산 혼합 배지(aromatic amino mix minimal medium) 20ml에 20 μ l씩 넣고 37°C, shaking incubation을 하였다. 0, 1, 3, 5, 7, 22, 24, 28, 30, 46, 48H 별로 O.D600 값 측정하여 성장률을 비교 관찰하였다.

성장률 비교 결과 대조군-최소배지(C-m)와 대조군-aromatic acid 혼합 배지(C-Aam)의 경우, 두군 간에 배지에 따른 성장률의 차이는 보이지 않았다. 반면에 실험군-최소배지(M-m)와 실험군-aromatic acid 혼합 배지(M-Aam)의 경우 성장률의 큰 차이를 보였다. 즉, 실험군-최소배지의 경우 시간에 따른 성장률에 큰 변화가 없는 반면, 실험군- aromatic acid 혼합 배지의 경우 대조군의 실험과 유사한 양상을 보였다(Figure 4-27).

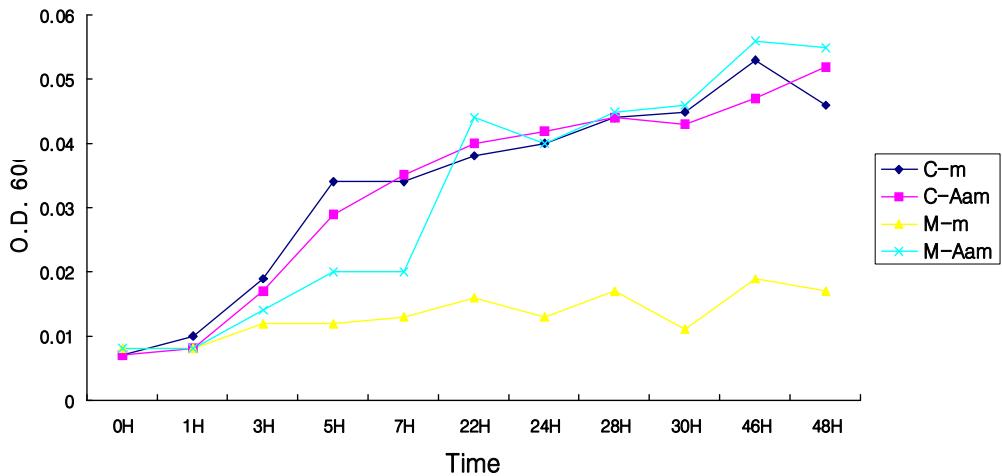


Figure 4-27. C-m: minimal medium에서 키운 control; C-Aam: Aromatic amino minimal medium에서 키운 control; M-m: minimal medium에서 키운 mutant ; M-Aam: Aromatic amino minimal medium에서 키운 mutant

(9) Intracellular survival test

Cell(Raw 264.7)을 24-well에 5×10^4 /well로 cell을 깔아 18h incubation 후 control *S. Enteritidis*, aroA mutant *S. Enteritidis* 을 배양 후 키워 둔 cell(Raw 264.7)에 treat 하여 2h, 6h, 14h 각각 cfu(Colony forming Unit)를 측정하여 *S. Enteritidis*의 aroA gene 을 mutation 시키는 것이 intracellular survival에 어떤 영향을 끼치는지 알아본 결과 *S. Enteritidis* wild type을 treat 한 실험군은 2h에서 이미 4.7cfu로 aroA mutant *S. Enteritidis* 을 treat한 대조군의 138cfu에 비해 survival rate이 현저히 낮았으며 16h이 지난 후엔 *S. Enteritidis* wild type을 treat 한 실험군은 survival cell이 남아 있지 않았다. 그리고 24h이 지난 후에도 aroA mutant *S. Enteritidis*를 treat한 대조군 cell은 4.3cfu 남아 있었다. 이로써 aroA mutant *S. Enteritidis* 군주가 *S. Enteritidis* wild type 군주에 비해 병원성이 급격히 소실되었음을 알 수 있었다(Figure 4-28).

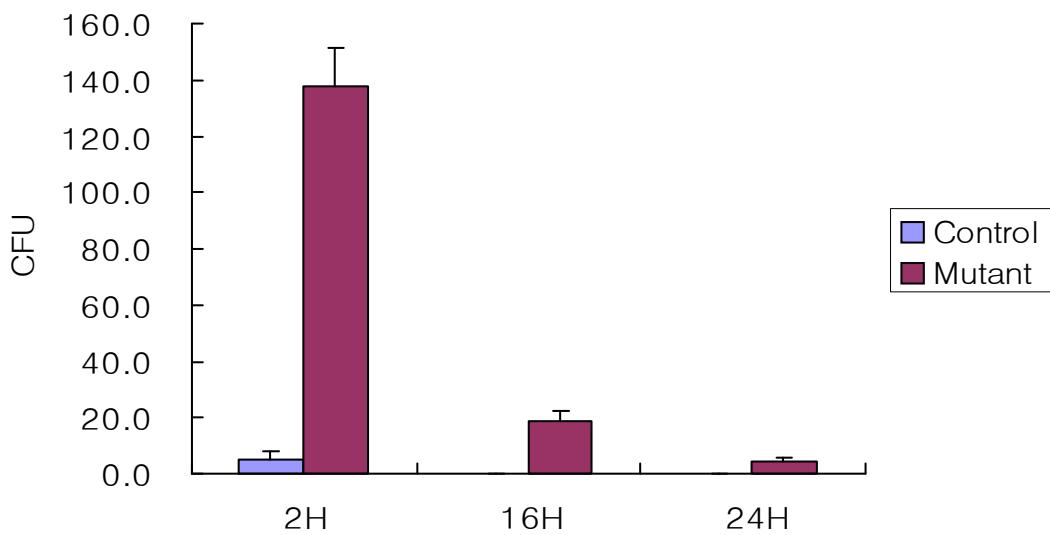


Figure 4-28. Intracellular survival test. control : *S. Enteritidis* wile type, mutant : aroA mutant *S. Enteritidis*

라. *S. Enteritidis*의 온도 변이주 (ts주)

(1) *S. Enteritidis* 온도변이주(temperature sensitive mutant; ts mutant)의 제조 및 스 크리닝

제조한 온도변이주를 replica plating을 한 후 28°C 및 37°C에서 배양한 후 28°C에서 접락을 형성하나 37°C에서는 접락을 형성하지 않는 온도변이주를 일차로 선발하였다. 일차로 선발된 온도변이주를 28°C 및 37°C에서의 CFU의 차이를 비교하여 최종 온도변이주를 선발하였다. 선발한 결과는 Table 2-3에 나타냈다. SE369의 경우 wild type의 경우 28°C 및 37°C에서 균수는 10^{10} cfu로 비슷한 결과 나타났고, ts mutant는 28°C에서 $10^9 \sim 10^{11}$ cfu로 나타났지만 37°C에서는 10주의 온도변이주가 모두 자라지 않았다. 닭에서 분리된 SE277주의 경우 wild type은 28°C 및 37°C에서 균수는 10^{10} cfu로 나타났으나 온도 변이주중 한주만이 28°C에 10^8 cfu로 나타났고 37°C에서는 전혀 증식이 되지 않는 온도 변이주를 선발하였다 (Table 4-22). 37°C에서는 wild type과 ts mutant 균주들을 비교했을 때, ts mutant 균주들이 성장이 급격히 줄어드는 상황을 볼 수 있다(Figure 4-29).

Table 4-22. The recovery rate of *S. Enteritidis* wild type and temperature sensitive mutant

Strain		CFU(cfu/ml)	
		28°C	37°C
SE 369 (human)	369wt	2.7×10^{10}	3.6×10^{10}
	369ts-1	1.3×10^{11}	0
	369ts-2	1.2×10^9	0
	369ts-3	3.3×10^{10}	0
	369ts-4	1.4×10^9	0
	369ts-5	2.02×10^9	0
	369ts-6	1.6×10^9	0
	369ts-7	1.26×10^9	0
	369ts-8	1.9×10^{11}	0
	369ts-9	4.8×10^{10}	0
SE 277 (chicken)	369ts-10	8.0×10^{10}	0
	wt	1.1×10^{10}	2.4×10^{10}
	277ts-1	6.0×10^8	0

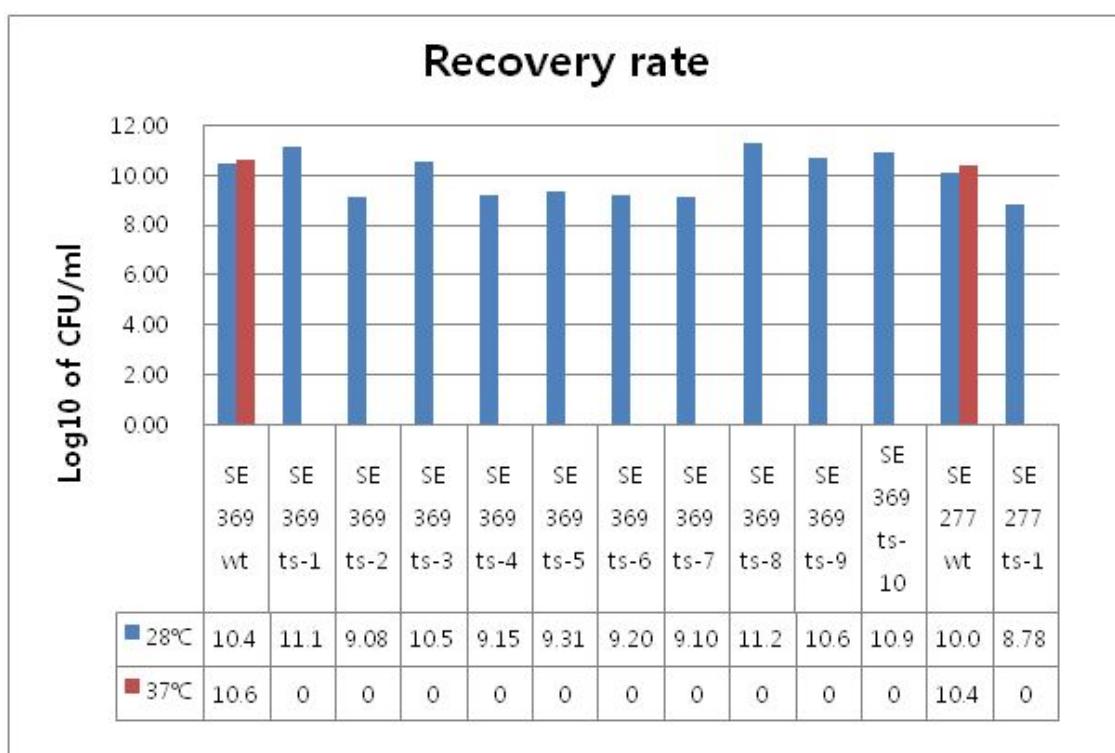


Figure 4-29. Recovery rate of *S. Enteritidis* wild type and ts mutant strains at 28°C and 37°C.

(3) 온도변이주의 마우스에서의 병원성 시험

S. Enteritidis 온도변이주의 병원성 시험을 마우스를 대상으로 실시하였다. wild type의 경우 SE369의 경우 10^9 cfu 접종시 모두 폐사하였고 10^8 과 10^7 cfu 접종시 각각 20% 및 40%의 생존율을 보였으나 온도변이주는 모두 접종량에 관계없이 100% 생존율을 나타냈다. SE277 wild type 경우 접종량에 관계없이 모두 폐사하였으나 277-ts 온도변이주는 모두 생존하는 것으로 나타나 온도변이주의 병원성은 거의 없는 것으로 나타났다 (Table 4-23).

Table 4-23. Safety of the temperature sensitive mutants and the parental WT strains of *Salmonella Enteritidis* in mice

Strains	type	Survivors/Total(%)		
		10^9 cfu	10^8 cfu	10^7 cfu
SE 369 (human)	WT	0/5 (0)	1/5 (20)	2/5 (40)
	ts-1	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-2	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-3	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-4	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-5	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-6	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-7	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-8	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ts-9	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
SE 277 (chicken)	WT	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	ts-1	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)

마. *S. Enteritidis*의 ppk변이주에서 온도변이주 (ppk변이주+ts주)

(1) *S. Enteritidis*의 ppk변이주에서 온도변이주의 제작

이미 제작된 ppk변이주(SEppk-1, SEppk-2, IVK B01341)를 대상으로 온도변이주를 만들었다. 상기에서 기술한 방법으로 만들었고 28°C 및 37°C에서 증식성을 관찰한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다(Table 4-24, figure4-30).

S. Enteritidis PPK 균주는 28°C 및 37°C에서 균수는 10^9 cfu 이상으로 나타났다. PPK의 ts mutant는 ts-4, 5에서 28°C에 균수는 10^{10} cfu로 나타났고 37°C에서 자라지 않았다. TS-1, 3, 6, 7은 37°C에서 $10^{3\sim 4}$ cfu로 나타났다.

37°C에서는 자라지 않는 것이 확인된 DTS SE PPK TS3-2-2가 변이주로써 가장 적합한 균주라 생각이 되어 최종 생균백신주로 DTS SE PPK TS3-2-2를 선발하였다.

Table 4-24. The recovery rate of *S. Enteritidis* PPK and temperature sensitive mutant

Strain	CFU(cfu/ml)	
	28°C	37°C
SE 227	wt	7.5×10^9
	ppk	6.2×10^9
	ppk ts-1	6.0×10^9
	ppk ts-2	1.4×10^9
	ppk ts-3	5.2×10^9
	ppk ts-4	6.6×10^{10}
	ppk ts-5	3.94×10^{10}
	ppk ts-6	3.1×10^9
IVK	ppk ts-7	1.0×10^{10}
	DTS SE PPK TS3-2-1	4.4×10^9
	DTS SE PPK TS3-2-2	5.2×10^9
	DTS SE PPK TS3-3-1	5.5×10^9
B01341	DTS SE PPK TS3-3-2	6.2×10^9
	DTS SE PPK TS3-6-1	6.8×10^9
	DTS SE PPK TS3-6-2	5.6×10^9

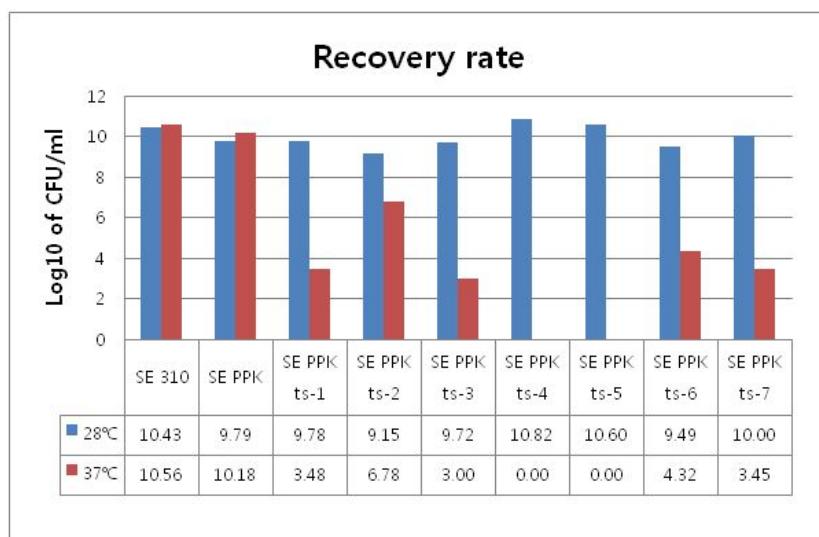
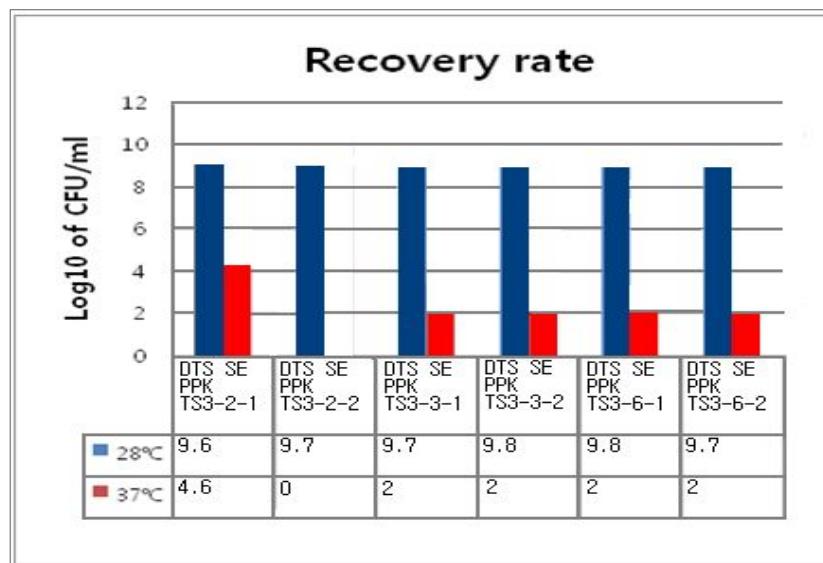


Figure 4-30. Recovery rate of *S. Enteritidis* PPK, wild type and ts mutant strains at 28°C and 37°C.

(2) *S. Enteritidis* 의 ppk변이주에서 온도변이주(ppk+ ts)의 마우스에서의 병원성

S. Enteritidis wild type과 ppk변이주+ 온도변이주를 마우스에서의 병원성을 측정하였다. 표 4-25에서 나타난 농도로 마우스의 복강내로 접종한 후 2주에 걸쳐 마우스의 생존성을 비교하여 병원성을 측정하였다. *S. Enteritidis* wild type에서는 전용량에 걸쳐 생존한 마우스가 없기 때문에 매우 높은 병원성을 지니는 것으로 나타났다. 그러나 ppk변이주에서는 10^9 cfu를 접종한 마우스에서는 모두 생존하였고 10^8 cfu를 접종한 마우스에는 40~60%가 생존하였으며 10^7 cfu를 접종한 군에서는 100%생존율을 보여 wild type에 비해 병원성이 많이 소실된 것으로 나타났다. 그러나 ppk변이주+ 온도변이주는 접종량에 관계없이 모두 생존한 것으로 나타나 ppk 변이주보다 병원성이 더 많이 소실된 것으로 나타났다.

Table 4-25. Safety of the ts mutant and the parental wt strains of

S. Enteritidis in mice

Strains	type	Survivors/Total(%)		
		10^9 cfu	10^8 cfu	10^7 cfu
	wt	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	ppk	0/5 (0)	3/5 (60)	5/5 (100)
	ppk ts-1	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ppk ts-2	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
SE 227	ppk ts-3	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ppk ts-4	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ppk ts-5	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ppk ts-6	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
	ppk ts-7	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)

바. *S. Enteritidis* 의 aroA변이주를 사용한 온도변이주 (aroA주+ ts주)

(1) *S. Enteritidis* 의 aroA 변이주에서 온도변이주의 제작

2협동과제에서 만든 SE aroA변이주 두 주를 대상으로 온도변이주를 제작하였다. 총 1주의 온도변이주가 만들어졌다. AroA변이주 및 wild type 균주는 28°C 및 37°C에서 균수는 10^9 cfu로 나타났고 aroA변이주 + ts mutant는 37°C에서 10^5 로 나타났다(Table 4-26).

Table 4-26. The recovery rate of *S. Enteritidis* aroA and temperature sensitive mutant

Strain	CFU(cfu/ml)		
	28°C	37°C	
SE	wt	6.3×10^9	8.1×10^9
	B 46 (aroA mutant)	4.6×10^9	6.5×10^9
	W1 (aroA mutant)	7.4×10^9	8.4×10^9
	W1 (ts-1)	6.7×10^9	2.7×10^5

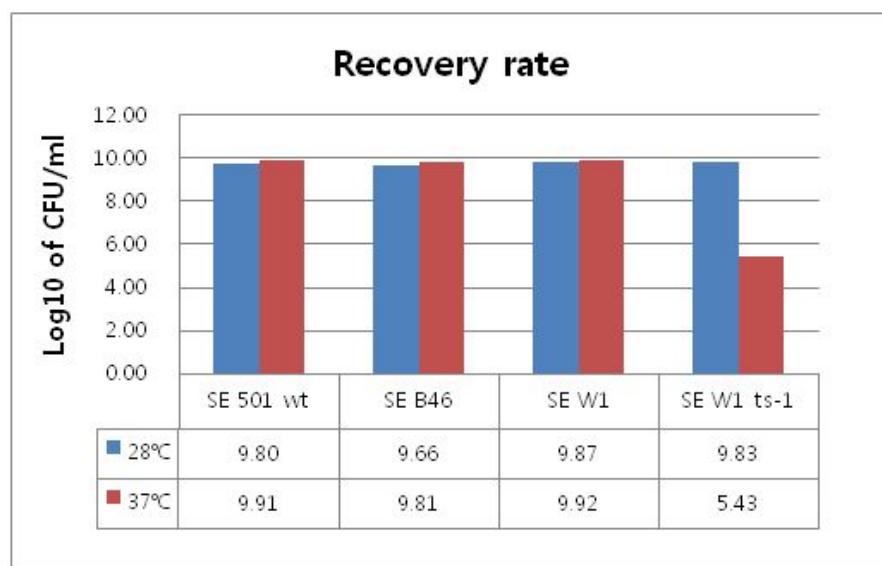


Figure 4-31. Recovery rate of *S. Enteritidis* nucleic acid and ts mutant strains at 28°C and 37°C.

(2) *S. Enteritidis* 의 aroA변이주를 사용한 온도변이주의 마우스에서의 병원성 시험

S. Enteritidis wild type 균주는 생존율 모두 0%였다. *S. Enteritidis* aroA변이주의 경우 10^9 cfu에서 생존율 0%였고 10^8 cfu 및 10^7 cfu에서 모두 100%로 나타났다. 그러나 aroA변이주+온도변이주는 접종량에 관계없이 100%로 나타나 병원성이 많이 소실된 것으로 나타났다 (Table 4-27).

Table 4-27. Safety of the aroA and aroA+ ts mutants of *Salmonella* Enteritidis inoculated to mice

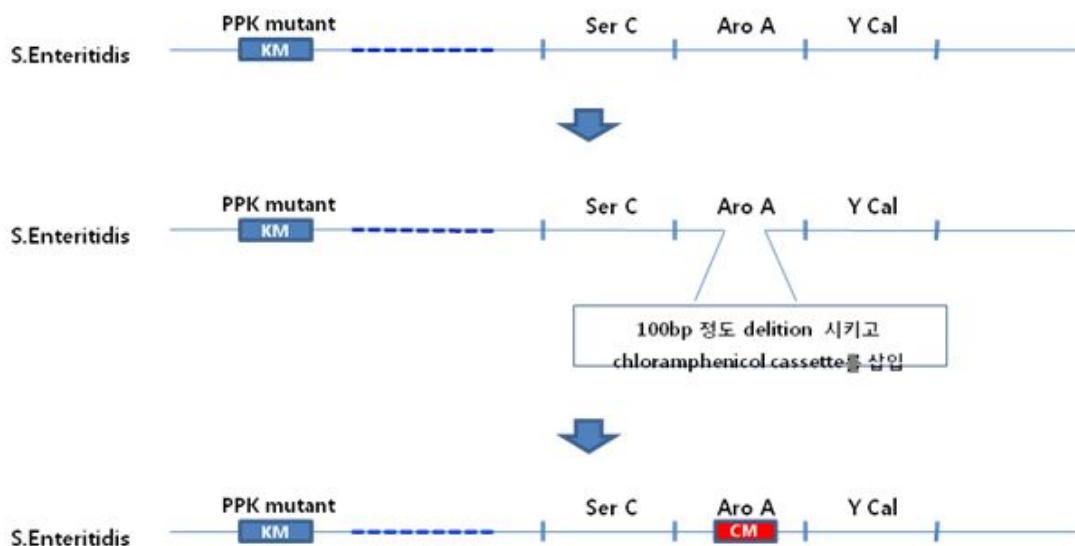
Strains	type	Survivors/Total(%)		
		10^9 cfu	10^8 cfu	10^7 cfu
SE 227	wt	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	B46	0/5 (0)	5/5 (100)	5/5 (100)
	W1	0/5 (0)	5/5 (100)	5/5 (100)
	W1 ts-1	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)

사. *S. Enteritidis* 의 *ppk*변이주를 사용한 *aroA* 변이주 (*ppk*변이주+*aroA*변이주)

(1) *S. Enteritidis* 의 *ppk*변이주에서 *aroA*변이주의 제작

mutant *ppk* gene을 가진 *S. Enteritidis* strain에서 전염성을 간직한 *Aro A* gene의 기능을 살피시켜 double mutant를 만들었을 때 그 영향을 알아보고자 한다.

(가) 실험의 개요



(나) *Aro A* gene의 일부를 deletion 시키기 위한 cloning

Conjugation 유, 무를 확인하기 위해 selection marker인 chloramphenicol cassette를 넣고 enzyme site를 첨가하는 *aro A* 100bp deletion primer 제작.

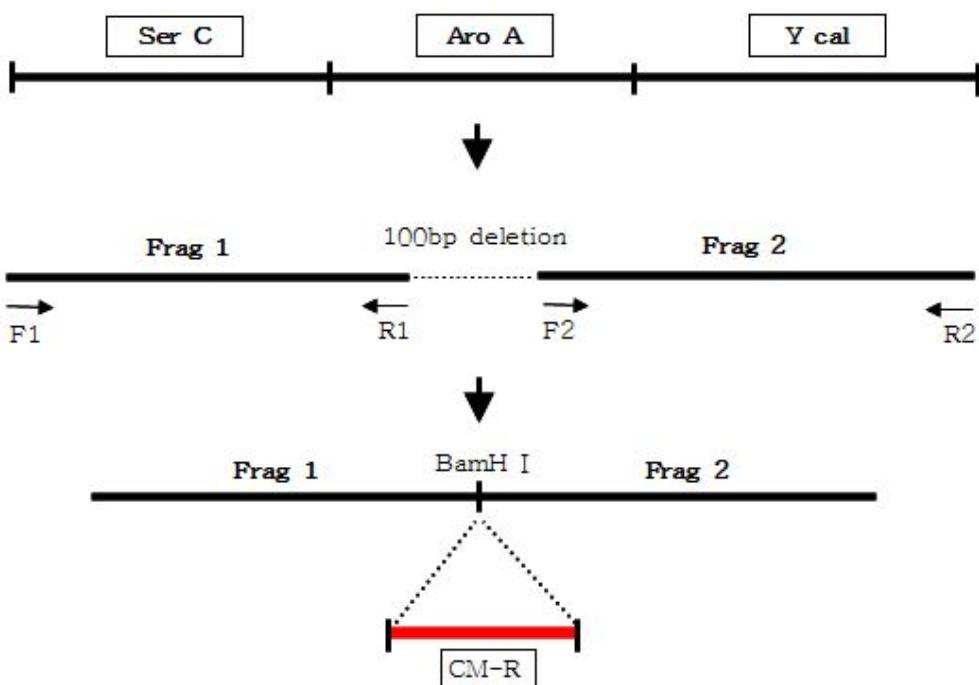
① primer sequence

F1 : ATG GCT CAG GTC TTT AAT TTT AG

R1 : AAA GGA TCC ACC AGT TCG CCT TTA ACG

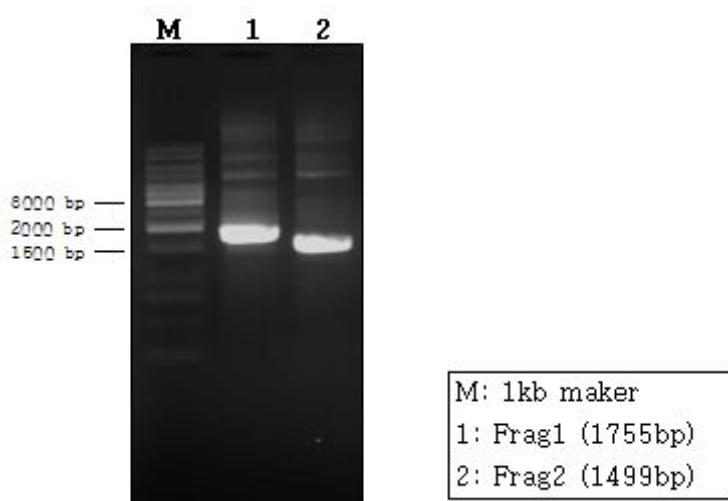
F2 : AAA GGA TCC ACA GTA TCA CTC TCC AGG

R2 : TTA CTT TTT ATC TTC GGC AAT TC

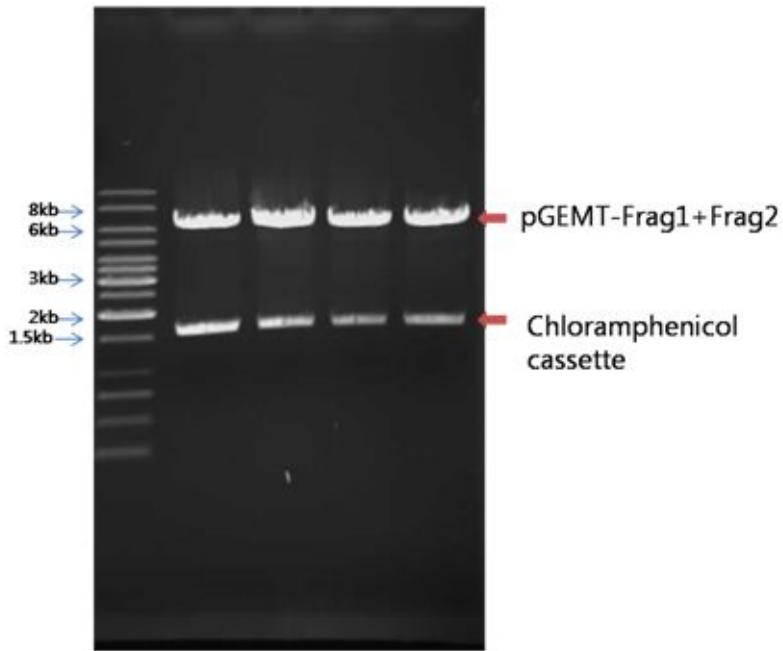


② PCR 조건

94°C	5min	
94°C	1min	
60°C	1min	30 cycle
72°C	1min	
72°C	10min	



- ③ Cloning each PCR products into pGEM-T easy vector
- ④ Sequencing
- ⑤ Ligation each fragments
- ⑥ Insert chloramphenicol resistant cassette(pS34-Cm)



(d) Electroporation into *S. Enteritidis*

Chloramphenicol plate에 키워 자란 colony만 선별하여 minimal medium plate와 minimal medium에 aromatic compound가 포함된 plate에서 선별 작업을 거친다. 그 결과 Chloramphenicol plate에 키워 자란 colony는 36 plate 총 1872 colony였으며 이 colony 모두 minimal medium plate와 minimal medium에 aromatic compound가 포함된 plate에서 선별 하였으나 모든 colony가 minimal medium plate와 minimal medium에 aromatic compound가 포함된 plate에서 모두 자라 deletion 된 aroA gene을 가진 mutant strain을 얻을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 *S. Enteritidis* aroA와 ppk유전자 이중 결손변이주를 확보하지 못했다.

아. *S. Enteritidis*의 단일 변이주들과 더블 변이주들의 비교 실험

상기 제작한 단일 변이주들 (ppk변이주, 온도변이주, aroA 변이주)과 더블 변이주(ppk + 온도변이주, aroA+온도변이주, aroA+ppk변이주)들에 대한 안정성 및 면역원성 확인 시험

(1) *S. Enteritidis* 온도변이주들(ts, ppk+ ts, aro+ ts)의 안정성 조사

(가) 목적

제조한 *S. Enteritidis* 온도변이주들(ts, ppk+ ts, aro+ ts)이 지속적으로 안정성이 있는지를 파악하기 위함

(나) 방법

실험실내에서 LB배지에서 28°C에서 5회 계대배양 (blind passage)을 실시한 후 37°C와 28°C에서 cfu를 측정하여 reversion rate를 산출하였다.

(다) 결과

Table 4-28. 5회 계대배양 후 *S. Enteritidis* 온도변이주의 reversion rate

Strain	37°C	28°C
SE277-ts	1X10 ²	7.9×10 ⁹
SEppk-ts	0	6.5×10 ⁹
SEaro-ts	10 ⁻² 회석단계에서 TNTC	1.2×10 ¹⁰

① 최종 선발한 세 가지 SE온도변이주를 5회 계대배양한 후 37°C와 28°C에서 증식성을 비교한 결과, SEppk-ts의 경우 37°C에서는 여전히 증식하지 않은 온도감수성을 유지한 반면, SE277-ts는 37°C에서 약 100개의 cfu가 SEaro-ts의 경우 37°C에서 상당히 많은 수의 균증식이 되어 복원되었다.

(2) 마우스에서 생균백신의 방어율 시험

(가) 목적

닭에 적용하기 전에 마우스에서 온도변이주 및 기타 변이주에 대한 방어력을 시험하고자 실시하였으며 이를 통해 닭에 사용할 수 있는 최종적인 생균백신후보균주를 선발하고자 함.

(나) 방법

① 생균백신후보균주 : SE 369 ts-8, 277 ts-1, ppk, ppk:ts-3, ppk:ts-4, aroA(B46), aroA(W1), aroA(W1):ts-1.

② 공격접종 균주: SE B271 (LD_{50} : 6.8×10^6 cfu/ml)

③ 선택된 균주를 TSB에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한다. (온도 변이주는 28°C에서 배양한다)

④ 배양된 균주를 아래 표 대조하여 균수를(cfu) 맞춘 후 6-8주령 마우스에 0.1ml씩 복강으로 접종한다. 접종 3주 후 선발된 공격 균주 사용하여 100 LD_{50} 로 복강으로 접종한다.

⑤ 접종 후 3주에 폐사유무를 관찰한다.

⑥ 3주 후 부검하여 간 및 비장 채취하여 균수를 측정한다.

⑦ 폐사 전 채혈하여 혈청검사 실시한다.

(다) 시험결과

방어력 시험결과 ppk::ts-3와 277ts-1이 가장 우수한 방어효과를 나타냈고 백신접종에 대한 부작용도 없는 것으로 나타났다. 또한 ppk::ts-4도 비록 90%의 생존율을 보였지만 비교적 방어효과가 좋은 것으로 나타났음.

Table 4-29. 생균백신의 SE공격접종에 대한 방어효과

Mutant	Dose (cfu)	survivor/tested (%)	Remark
ppk	10^7	0/10 (0)	백신접종 후 모두 폐사
ppk:ts-3	10^9	10/10 (100)	공격접종 후 약간 거칠
ppk:ts-4	10^9	9/10 (90)	아주 건강히 생존
277ts-1	10^9	10/10 (100)	아주 건강히 생존
369ts-8	10^9	2/10 (20)	
aroA(B6)	10^8	5/10 (50)	백신접종후 거칠
aroA(W1)	10^8	6/10(60)	백신접종후 거칠
aroA(W1):ts-1	10^9	5/10 (50)	
무접종대조군	-	0/10 (0)	4일째 모두 폐사

(3) 임상적용 가능한 폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주(ppk+ts)와 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주(ts) 대한 닭에서의 면역원성 확인시험

(가) 실험의 개요

Mouse를 이용한 방어율 시험을 통하여 가장 우수한 방어효과를 나타내고 백신접종에 대한 부작용도 없는 것으로 확인된 백신 균주 ppk:ts-3와 277ts-1를 사용하여 닭에서의 면역원성 확인시험을 진행하였다.

(나) 시험방법

① 백신후보균주

균주명	설명	mouse 생존율
PPK:ts-3	폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 <i>S. Enteritidis</i> 변이주	100%
277ts-1	온도 감수성 <i>S. Enteritidis</i> 변이주	100%

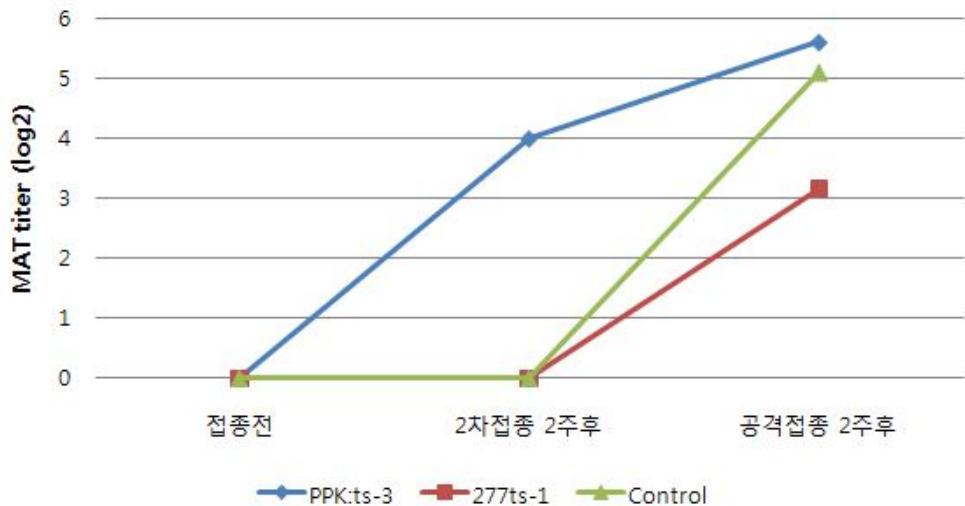
② 시험방법

2가지 백신 후보균주에 대하여 각 그룹별로 2주령의 SPF닭 10수에 3주 간격으로 2회 백신접종(1×10^9 cfu/dose/0.5mL)을 경구를 통해 실시하였고, 무접종 대조군 10수를 두어 함께 시험하였다. 2차 백신접종 2주 후, 모든 닭에서 2ml씩 채혈한 뒤, Nalidixic acid에 내성이 있고 병원성이 높은 균주로 선발된 공격접종 균주를 사용하여 공격 접종 (1×10^8 cfu / dose/0.5mL) 하였다. 공격접종 2주 뒤, 채혈하여 항체역가의 변화를 확인하기 위해 microplate agglutination test (MAT)를 실시하였다. 그 방법은 다음과 같다.

MAT용 항원을 tryptose phosphate broth (Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 6-8시간 진탕 배양한 후 배양액을 농도 0.3% 되도록 포르말린을 첨가한 후 2-3일간 불활화한 후 7,000rpm, 10분간 원심한 뒤 PBS로 재부유한 후 MAT용 항원으로 사용하였다. PBS로 재부유시킨 항원 stock액을 96 well microplate에서 PBS로 2진 희석하여 4°C에서 pellet의 크기가 약 1.0-1.5mm 정도의 희석단계를 MAT 항원의 최종 희석배수로 결정하며 실험에 사용하였다. 96 well microplate 모든 well에 50μl PBS를 넣고 피검혈청을 50μl 넣고 2진 희석한 후 MAT용 항원을 모든 well에 50μl씩 넣고 4°C에서 24시간 반응시킨 후 응집반응이 일어나는 최대희석배수를 혈청응집가로 인정하였다.

(d) 시험결과

폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주(PPK:ts-3)와 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주(277-ts1) 대한 닭에서의 면역원성 확인시험에서 확인된 MAT 항체역가는 아래와 같다.



MAT 시험결과 폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주의 닭에서의 면역원성이 확인되었다. 이 결과에 따라 폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주의 항원함량에 따른 닭에서의 면역원성의 차이를 확인 및 공격접종 후 비장, 간장 및 맹장에서의 공격균주 재분리를 통한 효능평가를 최종 확인하고자 한다.

(4) 폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주에 대한 닭에서의 방어능조사

(가) 실험의 개요

Mouse를 사용하여 안전성 및 방어율 시험을 통하여 가장 우수한 방어효과를 나타내고 백신접종에 대한 부작용도 없는 것으로 확인된 백신 균주인 PPK:ts-3를 사용하여 닭에서의 방어능 조사를 진행하였다.

(나) 시험방법

① 실험균주

백신균주를 TSA에 streaking하고 28°C에서 overnight 배양한 뒤 단일콜로니를 TSB에 접종하여 28°C에서 18시간 배양한다. 배양된 균주를 PBS로 3회 washing하고 난 뒤, 균수 측정을 위한 sampling을 하여 균수를 확인 한 뒤 2×10^9 cfu/ml이 되도록 균수 함량을 조절하여 백신접종에 사용하였으며, 공격접종 균주는 동일한 방법으로 진행하되 배양온도를 37°C로 변경하여 배양하고, 균수는 2×10^8 cfu/ml이 되도록 균수 함량을 조절하여 공격접종균주로 사용하였다.

구분	균주명	설명	접종량
백신균주	ppk:ts-3	폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 <i>S. Enteritidis</i> 변이주	1×10^9 cfu/dose
공격접종균주	B271	<i>S. Enteritidis</i> 야외분리주	1×10^8 cfu/dose

② 동물시험

3-4주령의 SPF 닭 24수를 준비하여 무작위로 8수씩 3 그룹으로 나눈다. 첫 번째 그룹은 PPK:ts-3을 피하접종(1×10^9 cfu/dose/0.5mL), 두 번째 그룹은 PPK:ts-3을 경구접종(1×10^9 cfu/dose/0.5mL)하고 마지막 그룹은 무접종 대조군으로 두고 2주 뒤, 대조군을 포함한 모든 닭에 Nalidixic acid에 내성이 있고 병원성이 높은 공격접종 균주를 사용하여 공격 접종(1×10^8 cfu/dose/0.5mL)을 하였다. 공격접종 7일과 14일 뒤 각 그룹마다 4수씩 부검하여 간, 비장 및 맹장내용물에서 공격접종균주의 재분리를 시도하였다.

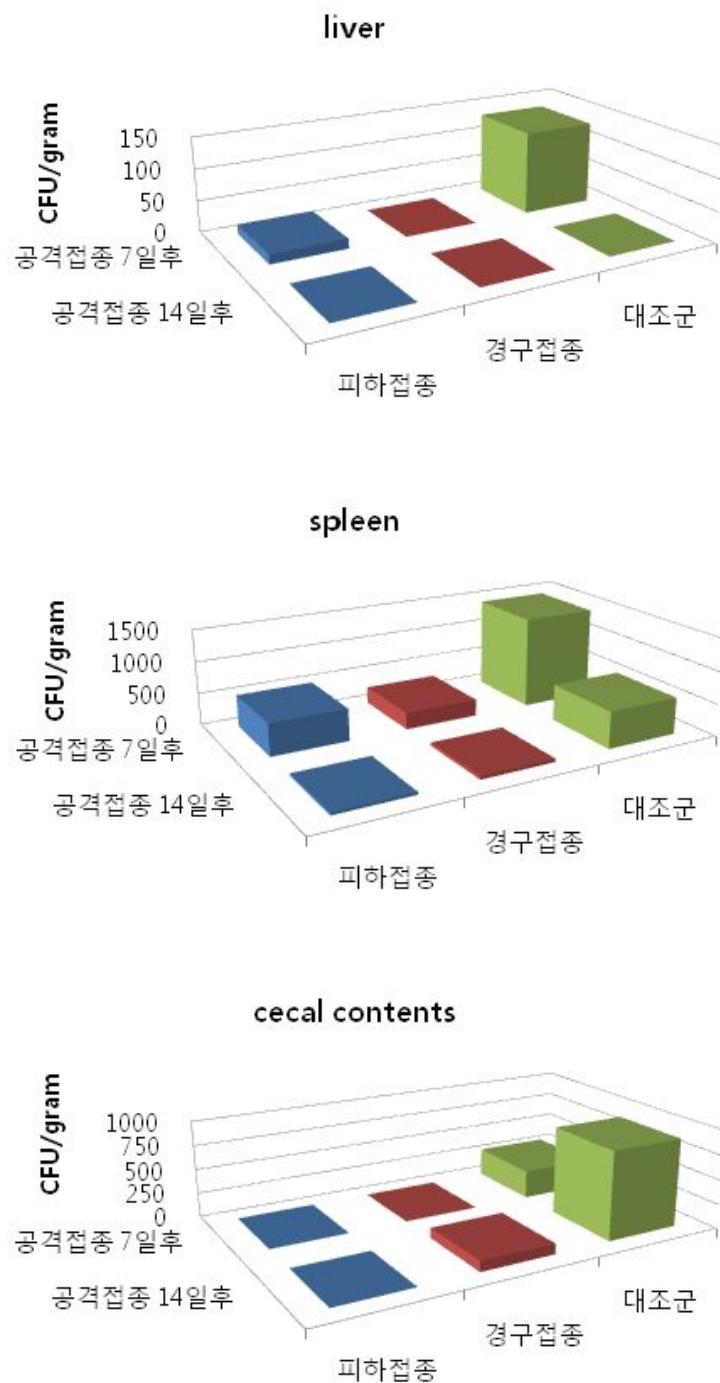
③ 공격접종균주의 분리

부검하여 얻어진 간, 비장 및 맹장내용물을 냉장상태를 유지하면서 실험실로 옮겨와 각각의 sample을 무균적인 작업을 통해 무게를 측정한다. 간과 비장은 Tissuelyzer를 사용하여 조직을 잘게 분해한 뒤에는 1ml의 BPW를 넣어 잘 혼합하고, 맹장내용물에는 5ml

의 BPW를 넣어 잘 혼합한다. 각각의 sample 100ul를 Nalidixic acid가 포함되어 있는 SS agar(Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 24시간 배양하여 검은 색을 띠는 집락의 수를 확인한다.

(d) 시험결과

폴리인산키나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주(PPK:ts-3) 대한 닭에서 간, 비장 및 맹장내용물에서의 공격접종균주의 재분리 결과는 아래 그림과 같다.



(5) 폴리인산기나아제결손 및 온도 감수성 *S. Enteritidis* 변이주(PPK:ts-3) 대한 닭에서의 방어능 재시험

(가) 실험의 개요

SE 생균백신의 공격접종 후 재분리 시험에 대한 재현성을 확인하기 위하여 재시험을 실시하였다.

(나) 시험방법 및 결과

백신 접종군과 대조군만으로 상기와 동일한 방법으로 재시험을 실시한 결과, 맹장내용물과 간에서의 백신접종군에서는 공격접종군주가 전혀 분리되지 않았고 대조군에서만 공격접종군주가 분리되었으며, 비장에서는 백신접종군의 재분리 정도가 대조군에 비해 월등히 낮아 생균백신에 의한 닭에서의 방어능에 대한 효과가 있음을 다시 한 번 확인하였다.

Group	공격접종3일후 재분리균수 (CFU/gram)		
	Cecal contents	liver	spleen
백신접종군	0	0	1433
대 조 군	41	1.5	6642

(6) 개발된 백신에 대한 *S. Gallinarum*의 공격접종에 대한 교차 방어효과 시험

(가) 실험의 개요

이번에 개발된 SE 생균 백신과 불활화 백신에 대하여 *S. Gallinarum* (SG)에 대한 교차 방어효과를 확인하기 위하여 백신접종 후, 병원성이 확인된 SG 야외주를 이용하여 공격접종을 실시하였다.

(나) 공격접종 균주의 LD₅₀ 확인 시험

개발된 백신의 SG 교차 방어시험에 앞서 공격접종에 사용될 SG 야외균주의 공격접종 농도 결정시험을 실시하였다. 3-4주령의 갈색 산란계 20수를 준비한 뒤, 무작위로 5수씩 4개의 그룹으로 나누어 $1.07 \times 10^6 \sim 1.07 \times 10^9$ CFU/ml을 각각 경구와 피하에 동시에 0.5ml씩 접종한 뒤 2주 동안 폐사여부를 관찰한 결과 아래와 같이 공격균주의 농도에 따른 폐사율을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 백신의 교차방어시험의 공격접종 농도를 1.07×10^8 CFU/dose로 결정하였다.

그룹	접종농도 (CFU/dose)	폐사수/접종수 (폐사율)	비고
1	1.07×10^6	3/5 (60%)	
2	1.07×10^7	5/5 (100%)	
3	1.07×10^8	5/5 (100%)	공격접종농도로 결정
4	1.07×10^9	5/5 (100%)	

(다) 교차방어시험

3-4주령의 갈색 산란계 32수에 대하여 아래와 같이 그룹을 나누어 SE 생균백신과 불활화백신을 접종하고 양성대조군으로 SG 생균백신(9R주)을 접종한 뒤 3주 뒤 무접종 대조군과 함께 공격접종을 실시하고 2주간 관찰하였다.

그룹	백신	No. of chicken	Inoculation route
1	SE 생균백신	10	피하
2	SE 불활화백신	10	근육
3	SG 생균백신 (9R주)	6	피하
4	무접종 대조군	6	-

(라) 시험결과

SE 생균 및 불활화백신은 SG에 대하여 70%의 방어율을 보여 교차 방어능이 있는 것으로 확인되었으며, SG에 대한 교차 방어율은 SG(9R주) 생균백신 비하여 약 83.3%의 높은 교차방어율을 확인하였다.



(7) 개발된 생균변이주의 점막면역 유도에 대한 조사

본 연구과제를 통해 개발된 변이주를 대상으로 점막면역유도에 대한 조사를 아래와 같은 방법으로 실시할 예정이다. 점막면역유도 실험은 생균백신의 허가에 반드시 필요한 항목이다.

- (가) 마우스에 접종한 후 일정기간마다 채취한 분변내에 IgA를 ELISA를 이용하여 측정
- (나) 혈청내 살모넬라 특이적인 IgG, IgG1, IgA를 ELISA로 측정
- (다) Peyer's pathch 또는 장간막 림프절에서 분리한 B cell을 사용하여 특이 IgA를 ELISPOT를 이용하여 측정
- (라) 상호 역가비교를 통해 장점막 면역을 가장 잘 유도하는 살모넬라 약독화균주의 선발

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 계란, 계육 및 닭에서의 <i>S. Enteritidis</i>의 분리 동정 및 불활화 백신용 백신균주 선발 - 국내에서 분리된 <i>S. Enteritidis</i>의 특성 규명 - 계란 및 계육에서 분리된 <i>S. Enteritidis</i>와 식중독을 일으킨 사람에게서 분리된 <i>S. Enteritidis</i>와의 연관성 분석 - 계란 및 계육 유래 식중독 원인 <i>S. Enteritidis</i>의 선발 - <i>S. Enteritidis</i>의 목표 유전자 aroA유전자의 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - 계란, 계육 및 사람에서 <i>S. Enteritidis</i>의 분리주를 목표한 수량에 근접하게 분리 동정하였고 이에대한 항생제 내성, PFGE유전형 분석 및 phage형 분석을 실시하였음. - 분석된 자료를 통해 국내에서 사람분리주와 닭 분리주간의 연관성을 분석 하였음. - 이러한 자료를 통해 <i>S. Enteritidis</i> 국내 분리주 중에 불활화 백신 및 생균백신후보주를 선발하였음. - 대사성변이주의 일환으로 <i>S. Enteritidis</i>의 AroA 변이주를 제작하였음. 따라서 당초목표대로 100% 달성도를 보였음. 	<ul style="list-style-type: none"> - 닭과 사람에서 분리된 <i>S. Enteritidis</i> 분리주의 특성 및 유전형, 파아지형 비교는 국내 최초임. - 이러한 결과는 <i>S. Enteritidis</i>의 닭과 사람과의 역학적 특성을 규명하는데 중요한 자료로 활용할 것이라 판단됨. - 또한, 국내분리주를 사용하여 <i>S. Enteritidis</i> 대사변이주인 aroA 변이주 개발은 국내에서 최초임.

년도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. Enteritidis</i> 불활화 시험백신의 효과분석, 임상적용 및 생산공정 연구 - 폴리인산키나아제결손 <i>S. Enteritidis</i> 변이주 의 개발 및 안전성 연구 - <i>S. Enteritidis</i> aro유전자 영양요구성 변이주 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내분리주를 사용하여 보조제의 종류 설정, 적용량 설정, 임상시험, 공격접종에 대한 효과분석, 안전성 분석, 면역원성 분석을 통해 <i>S. Enteritidis</i> 불활화백신을 개발하였음. - 폴리인산키나아제 결손 <i>S. Enteritidis</i> 변이주를 개발하여 이들 변이주에 대한 열 안전성, 시험, 중식성 시험, 단핵구에 대한 생존시험 및, 마우스와 닭에서의 결손변이주의 병원성 소실시험을 실시하였음. - <i>S. Enteritidis</i> aro유전자 영양요구성변이주 확립을 하였고 이에 대한 특성을 규명하여 100%의 달성도를 보임 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. Enteritidis</i> 국내분리주를 사용하여 불활화 백신을 개발한 것은 국내에서 처음이고 이에 대한 안전성 및 방어효과, <i>S. Gallinarum</i>의 교차방어효과를 상세하게 규명하였음. 이를 진행하는 과정중에 가장 시행착오가 많았던 것이 adjuvant의 선정과 이에 따른 면역원성의 지속력이었는데 이러한 과정을 통해 노하우가 어느정도 축적되었음. - <i>S. Enteritidis</i>의 폴리인산키나아제결손변이주의 제작은 아직까지 외국논문에 보고된 바 없는 것을 판단할 때 세계최초인 것으로 사료됨.
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 폴리인산키나아제결손 <i>S. Enteritidis</i> 변이주의 임상적용연구 - <i>S. Enteritidis</i> 온도감수성변이주의 개발 및 병원성 연구 - 추가적인 Aro유전자 결손을 통한 영양요구주의 선발 	<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도까지의 결과를 볼 때 <i>S. Enteritidis</i>의 단일변이주는 약독화정도가 매우 낮음. 따라서 이중결손변이주의 개발로 연구방향을 선회하였음. 특히 <i>S. Enteritidis</i>의 폴리인산키나아제 변이주+온도감수성변이주, AroA유전자결손변이주+온도감수성변이주, 온도감수성 변이주등을 대상으로 광범위한 병원성 소실 시험을 마우스를 사용하여 수행하였고 닭에서의 병원성 소실 시험을 통해 최종 생균백신주를 선발하였음. 생균백신에 대한 실험의 계획이 다소 변경되었으므로 90%의 달성도를 보였다고 판단됨. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. Enteritidis</i> 폴리인산키나아제 결손변이주는 기준에 논문으로 발표된 <i>S. Typhimurium</i>과는 다르게 단일변이주에 있어서는 병원성이 크게 소실되지 않는 것으로 나타났음. 따라서 본 연구과제는 <i>S. Enteritidis</i> 폴리인산키나아제결손변이주+온도감수성변이주와 <i>S. Enteritidis</i> AroA결손변이주+온도감수성변이주를 제작하였음. - 이들 이중변이주는 세계 최초로 개발되었고 특히 온도감수성 변이주의 경우 2회 실시하여 이중 온도감수성변이주를 제작하였음. 온도감수성 변이주의 경우 reversion rate를 확인하여 비교적 안전성이 높다고 판단됨.

년도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
4차년도	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. Enteritidis</i>영양요구 성변이주에 대한 임상 적용 연구 및 변이주에 대한 생산공정개발 - <i>S. Enteritidis</i>온도감수 성 변이주의 방어효과 분석 및 최적의 예방프로그램 개발 - 복합결손변이주의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 폴리인산키나아제결손변이주 + 영양요구주의 복합결손 변이주 개발은 성공하지 못했음. 그러나 3차년도에 개발한 이중변이주에 대한 임상시험, 안전성 시험, 공격접종시험에 대한 방어효과 분석, 백신접종횟수에 따른 방어효과 분석, 접종경로에 따른 방어효과의 분석, 면역력 분석등을 집중적으로 수행하였음. - 아울러 불활화백신 및 생균백신의 가금티푸스 원인체인 <i>S. Gallinarum</i>에 대한 교차방어시험을 실시했기 때문에 달성도는 90%라고 사료됨. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. Enteritidis</i>의 생균백신주의 개발을 위해 다양한 이중변이주를 대상으로 가장 안전하고 방어효과가 높고, 면역력 지속기간이 긴 생균백신 후보를 발굴하였음. 비록 완벽한 방어효과를 보이지는 않았으나 최소 50% 이상의 방어효과를 보였음. (일반적으로 기존에 보고된 살모넬라 백신의 방어효과는 50~60%정도임). - 따라서, 추가적인 연구 진행을 통해 지금까지 확보된 변이주를 추가적인 탐색을 통해 최적의 방어효과를 나타내는 후보균주를 생균백신주로 사용할 계획임.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획

1) S. Enteritidis 불활화백신

- 본 과제에서 대표균주를 선발, 항원량 결정, Adjuvant 결정, 시험백신의 생산, 백신의 안전성 및 효능시험, 야외농장시험을 완료하였으며, 현재 농림수산검역검사본부에서 허가서류 심사과정에 있음.
- 따라서 7개월후(2012년 7월)에 품목허가증을 받을 것으로 예상됨.
- 산업화의 일정은 백신제조 후 자가검정과 국가검정을 거쳐서 시장에 출시됨으로 2012년 11월에 축산농가에 공급할 수 있으리라 예상됨.

2) S. Enteritidis 의 생균백신

- 본 과제에서 여러 가지의 변이주 선발, 항원량 결정, 백신생산, 안전성 및 효능시험을 완료하였으며, 추가적으로 야외농장시험을 진행하여야 한다.
- 본 백신은 유전자재조합백신으로써 야외임상시험을 위하여 GMO (Genetically Modified Organism) 및 LMO (Living Modified Organism)의 관리규정에 따라서 환경 및 균주변이에 대한 부분을 조금 더 명확히 하는 것이 필요하여 농림수산검역검사본부와 긴밀한 상의 하에 시험 중에 있다.
- 산업화 일정을 예상하면, 2012년에는 야외임상시험을 마치고 2013년에 허가서류심사를 받아서 2014년에는 축산농가에 백신을 공급 할 수 있으리라 예상됨.

2. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

- 국내 농장에서 HACCP인증에 관련되어 살모넬라검사를 실시하여 살모넬라가 농장에 없음을 보고하는 형식으로 실시하고 있음. 따라서 이에 대한 검사는 형식적인 절차에 그치고 있는 것이 현 실정임.
- 최근 유럽과 미국에서는 살모넬라나 대장균이 채소나 과일을 통해 사람에게 전파되어 심한 식중독을 유발하고 있음. 이러한 발생의 역학적 경로는 유기농 채소생산에 제공되는 동물의 분변이고 따라서 이러한 분변에는 살모넬라의 배출이 적거나 없어야 함. 분변내 살모넬라를 억제하기 위해서는 백신접종이 반드시 필요함. 따라서, 소비자 보호단체나 축산농가, 축산관련단체의 강연 및 기술지도에 적극적으로 참여하고 살모넬라의 식중독 예방의 중요성과 이를 위해서는 백신접종이 필요함을 강조

할 계획임.

- 아울러 추가적인 연구결과나 개발된 기술을 논문이나 학회에서 발표를 통해 지속적으로 홍보하거나 전시할 예정임.

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

		등록특허 10-1031376	
		(19) 대한민국특허청(KR)	(45) 공고일자 2011년04월29일
		(12) 등록특허공보(B1)	(11) 등록번호 10-1031376
			(24) 등록일자 2011년04월19일
(61) Int. Cl.:		(73) 특허권자	
C12N 7/01 (2006.01) A61K 39/112 (2006.01)		주식회사 총영백신연구소	
(21) 출원번호 10-2009-0097157		대전광역시 유성구 희망동 69-3	
(22) 출원일자 2009년10월13일		강원대학교산학협력단	
실사청구일자 2009년10월13일		강원도 춘천시 효자동 102-1 (강원대학교 42)	
(65) 출원번호 10-2011-0040033		(72) 발명자	
(43) 출재일자 2011년04월20일		한태숙	
(66) 선행기술조사문서		서울특별시 강진구 구의3동	
KR100501660 B1		(74) 대리인	
KR100555221 B1		김순중	
KR1020020065567 A			
KR1020050110634 A		실사관 : 김승범	
전체 청구항 수 : 총 6 항			
(54) 살모넬라 엔데리티디스 감염 예방용 불활화 백신			
(67) 요약			
본 발명은 닭과 사람에서 분리한 살모넬라 엔데리티디스의 군주 및 이를 항원으로 활용하는 살모넬라 엔데리티디스 감염 예방용 백신에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 닭과 사람에서 분리한 강병원성의 살모넬라 엔데리티디스 군주 B277과 B369를 선별하여 이를 불활화 시킨 후 제조된 백신은 마우스와 닭에서 우수한 방어 효과를 나타내는 특징이 있다.			

- 현재 특허는 불활화백신 1종에 대한 특허가 등록되었음.
- 당초 각 생균백신에 대한 특허, (영양요구주, 대사변이주, 온도변이주에 대한 균주특허)를 각각 1건씩 확보할 예정이었으나 각각의 변이주에 대한 안전성과 방어력이 다소 문제가 있는 바, 생균백신의 경우 단일변이주 대신에 다중변이주중 가장 우수한 효과를 보이는 변이주를 생균백신주로 특허를 확보할 계획임. 따라서 최종 생균백신에 대한 최종 1건의 특허를 출원하고 등록할 예정임.
- 논문의 경우 현재까지 도출한 결과를 가지고 최종 2건의 논문을 발표할 예정이고 불활화 백신의 경우 제품허가 과정 중에서 도출되는 결과를 가지고 1건의 논문을 발표할 예정임.

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 본 과제에서 도출된 결과와 기술을 가지고 다른 살모넬라 혈청형에 적용하고자 함.
- 특히, *S. Typhimurium*에 대해 본 기술을 적용시킬 예정이고 일부는 현재 진행중에 있음. 또한 불활화 백신의 경우도 *S. Typhimurium*을 함유하는 이가백신을 개발하고 있는 중에 있음.
- 본 과제에서 도출한 약독화변이주로부터 추가적인 변이를 첨가하여 보다 안전하고 면역력이 높은 생균백신을 개발할 계획이며 아울러, 이종항원을 발현시킬 수 있는 운반체로 사용할 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 현재 생균백신으로 닭에서 상용화되고 있는 백신 중 국내에서 사용하고 있는 백신은 *S. Gallinarum* 9R백신임. SG9R백신은 닭에 있어 안전성면에서 약간 문제가 되고 있으나 가금티푸스가 발생하는 나라에서는 많이 사용되고 있으며 최근 연구결과로 *S. Enteritidis*를 교차방어 할 수 있다고 발표됨
- 미국에서 사용되고 있는 살모넬라 식중독 예방백신은 *S. Typhimurium*의 유전자중 adenylate cyclase (cya)와 cAMP receptor protein (crp)의 유전자 일부가 결손된 변이주가 *S. Typhimurium*의 예방에 닭에서 상용화되고 있으며 이 백신은 *S. Typhimurium*의 생식기계 집락화 및 계란내 이행을 우수하게 방어하는 효과가 있다고 입증되었으며 다른 살모넬라 혈청형의 감염을 부분적으로 교차방어 할 수 있다고 보고함. 또한 *S. Typhimurium*와 *S. Enteritidis*의 계란내 이행을 차단할 수 있다고도 함.
- *S. Typhimurium* AroA변이주는 *S. Enteritidis*의 감염에 대해 교차방어능이 없다고 보고함.
- 본 연구과제에서 사용한 chemical mutagen인 NTG를 사용하여 대사변이주 (metabolic drift mutant)가 EU에서 TAD Salmonella vac E로 상품화되어 닭에서 사용되고 있는데 실질장기의 집락화와 계란내 오염을 감소시키는 것으로 보고되고 있음. 또한 이를 백신은 *S. Typhimurium*의 감염을 부분적으로 교차방어 할 수 있다고 보고됨.
- 온도감수성 변이주의 경우 비장, 간, 맹장등 장기내 집락화를 감소시키는 효과가 있다고 발표함.
- 생균백신주의 경우 백신을 접종한 직후 장기내의 58%, 백신접종동물의 28%는 백신주가 존재한다고 보고함. 이러한 생균백신주의 존재는 비특이적인 선천면역의 증가를 유도하기 때문에 공격접종 시험시 고려해야 함.
- 과거에는 병원성의 한 요인인 침투성이 감소되어야 약독화가 되어 안전한 백신이라고 인정을 했으나 최근 보고에 의하면 방어면역을 오랫동안 유지시키기 위해서는 균주의 침투성을 보존되어야 한다는 논리를 제시함. 따라서 침투성을 유지하되 면역세포에서 탐식후에는 일

정시간이 경과된 후에는 제거되어야 하고 이 시점이 육계의 경우에는 도계전, 산란계의 경우에는 산란 직전이어야 된다고 보고함.

- 생균백신의 방어효과시험을 하는데 있어 마우스에서의 시험결과와 최종 목적동물인 닭에서의 시험결과와 일치하지 않는다는 결과가 보고됨.
- 최근 약독화 살모넬라 군주는 이종항원을 발현시키는 운반체(carrier)로서의 연구가 많이 되고 있고 DNA 백신의 운반체로도 역할연구가 많이 진행되고 있음. 특히 병원체의 이종항원을 발현시켜 예방백신으로 사용하거나, 세포성 매개면역에 관련되는 agonist나 cytokine 을 발현시켜 면역증진을 유도하거나 항암치료물질을 전달하는 운반체로 사용하는 연구가 많이 진척되고 있음.

11. Cheong HJ, Lee YJ, Hwang IS, Kee SY, Cheong HW, Song JY, Kim JM, Park Y H, Jung JH, Kim WJ. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human and broiler-chickens in Southwestern Seoul, Korea. *J.KoreanMed.Sci* 2007, 22, 773-778.
12. Clifton-Hadley FA, Breslin M, Venables LM, Sprigings KA, Cooles SW, Houghton S, Woodward MJ. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet Microbiol* 2002, 89, 167-179.
13. Cooper GL, Nicholas RA, Cullen GA. Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis* aroA live oral *Salmonella* vaccine. *Microb Pathogenesis* 1990, 9, 255-265.
14. Dhillon AS, Alisantosa B, Shivaprasad HL, Jack O, Schaberg D, Bandli D. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* phage types 4, 8, and 23 in broiler chicks. *Avian Dis* 1999, 43, 506-516.
15. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 2002, 26, 339-353.
16. Gast RK, Holt PS. Experimental horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* strains (phage types 4, 8, and 13a) in chicks. *Avian Dis* 1999, 43, 774-778.
17. Gast RK, Hilt PS. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Dis* 2000, 44, 706-710.
18. Gast RK, Stone HD, Holt PS. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. *Avian Dis* 1993, 37, 1085-91.
19. Kang ZW, Jung JH, Kim SH, Lee BK, Lee DY, Kim YJ, Lee JY, Won HK, Kim EH, Hahn TW. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella enteritidis* isolated from chickens and humans in Korea. *J Vet Med Sci* 2009, 71, 1433-1438.
20. Kim SH, Kim S, Chun SG, Park MS, Park JH, Lee BK. Phage types and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

- isolated from humans and chickens. *J.Microbiol* 2008, 46, 209–2
21. Lillehoj JS. Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. In: Sharma JM(ed.). Avian Cellular Immunology. pp. 155–181, CRC Press, Boca Raton. 1991.
 22. Linton AH. Guidelines on prevention and control of salmonellosis. Geneva, World Health Organization, 1983, 10–128.
 23. Lu SW, Manges AR, Xu YS. Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. *Infect Immun* 1999, 67, 5651–5657.
 24. McMeechan A, Lovell MA, Cogan TA, Marston KL, Jumphrey TJ, Barrow PA. Inactivation of ppk differentially affects virulence and disrupts ATP homeostasis in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Gallinarum. *Res Microbiol* 2007, 158, 79–85.
 25. 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.
 26. Muotiala A, Hovi M, Makela PH. Protective immunity in mouse salmonellosis: comparison of smooth and rough live and killed vaccine. *Microb Pathog* 1989, 6, 51–60
 27. Neto OCF, Mesquita AL, Paiva JB, Zottesso F, Junior AB. Control of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying hens by inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccines. *Braz J Microbiol* 2008, 39, 390–396.
 28. Nicholas RAJ, Andrews SJ. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* in the yolk of hen's eggs. *Vet Rec* 1991, 128, 98–100.
 29. Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J.Med.Microbiol* 1994, 40, 15–22.
 30. Olsen JE, Tiainen T, Brown DJ. Levels of virulence are not determined by genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains. *Epidemiol Infect* 1999, 123, 423–430.

31. Poppe C, Demczuk W, Mcfadden K, Johnson RP. Virulence of *Salmonella enteritidis* phage types 4, 8 and 13 and other *Salmonella* spp. for day-old chicks, hens and mice. *Can J Vet Res* 1993, 57, 281-287.
32. Suh DK, Song JC. Analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence-PCR fingerprinting, antibiotic resistance and plasmid profiles. *J.Vet.Sci* 2006, 7, 37-41.
33. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schnieder F, Wannet W, Machado J, Edwards G. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: Results of international multi-center surveillance. *Euro.Surveill*, 2003, 8, 41-45.
34. Tsen HY, Lin JS. Analysis of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profile and phage-typing. *J.Appl.Microbiol* 2001, 91, 72-79.
35. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet.Res* 2005, 36, 267-288.
36. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, Kim SH, Lee BK, Park HY. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet.Microbiol* 2002, 86, 295-301.
37. Young SD, Olusanya O, Jones KH, Liu T, Liljeblad KA, Hofacre CL. *Salmonella* incidence in broilers from breeders vaccinated with live and killed *Salmonella*. *J Appl Poult Res* 2007, 16, 521-528.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여 서는 아니됩니다.