

Guanosine 5'-monophosphate 킬레이트 칼슘 및 철 사료 첨가제 급이 산란계의 *Salmonella Gallinarum* 인공감염에 대한 면역 반응

허수정 · 고흥범*

전남대학교 수의과대학

Immune response to *Salmonella Gallinarum* experimentally infected layers fed with Guanosine 5'-monophosphate-chelated calcium and iron feed additives

SuJeong Heo, HongBum Koh*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

Received July 22, 2021
Revised September 14, 2021
Accepted September 14, 2021

Corresponding author:
HongBum Koh
E-mail: hbkoh@jnu.ac.kr
https://orcid.org/0000-0001-7737-9512

The objective of this research was to evaluate the immune response to *Salmonella Gallinarum* experimentally infected layers fed with Guanosine 5'-monophosphate-chelated calcium and iron feed additives. Hy-Line brown, 34 week-olds layers were assigned to 3 groups; Group 1: basal diet feed, Group 2 (CaFe-GMP): basal diet feed mixed with chelated calcium and iron, and Group 3 (Fe-OCHT): basal diet feed mixed with chitosan for 4 weeks. There were challenged with 1.0×10^8 CFU/mL of the cultured *Salmonella Gallinarum* (SG) by oral administration on 28th feeding days. After SG challenge, Flow cytometric profiles showed that the CD4+/CD8+ T lymphocyte activation of Group 2 was much higher than Group 1 and Group 3 ($P < 0.05$). In addition, the levels of interleukin-2 (13.37 mg/dl) and interferon- γ (2.35 mg/dl) in Group 2 were higher than Group 1 and Group 3. Populations of Lactic acid bacteria (3.5×10^{10} CFU/g) from cecum was highest observed in group 2. Re-isolation of SG from cecum in group 2 (8×10^5 CFU/g) was lower than group 1 (1.83×10^{10} CFU/g). The result of this study demonstrated that CaFe-GMP feed additive may be one of the potential candidates to control salmonellosis and functional feeds in layers.

Key Words: *Salmonella Gallinarum*, Feed supplement, Immunological response, Layers

서론

사료는 가금류 생산성에 미치는 주요 요인으로서 양계산업에서 총 생산 비용의 70%를 차지한다(Omole 등, 2005). 따라서 사료비용 부담의 절감과 적절한 영양소 요구량을 설정하고 그에 따른 최적의 사료를 배합하기 위한 다양한 연구가 요구되고 있으며, 여러 기능성 물질의 첨가에 대한 연구가 수행되고 있다(Lim과 Paik, 2006). 이러한 축산 사료에 대한 연구 중 킬레이

트 유기 미네랄의 상업적 이용이 보고되고 있으며 가금류 사료에서도 유기태화 미네랄의 기능 및 응용에 대한 연구가 진행되고 있다(Ammerman 등, 1998).

킬레이트 유기 미네랄은 철, 구리, 아연 및 망간 등 2가 양이온 광물질이 한 개 또는 그 이상의 아미노산 등 유기물과 공유결합 및 이온결합을 통하여 고리를 형성한다. 이러한 구조는 동물의 체내에서 분자 크기가 세포막을 투과하기에 적당하고 안정적으로 생체 내 흡수, 소화 및 생리적 이용률이 탁월하다(Pal과



Gowda, 2015). 축산분야에서 유기태화 미네랄은 동물의 면역력을 증가시키고, 생리기능을 활성화시켜 안전하고 질 좋은 축산물의 생산에 기여한다고 보고되고 있다(Lim과 Paik, 2006; Seo 등, 2008). 따라서 다양한 킬레이트 유기 미네랄은 산란계에 있어서도 난 생산성 및 면역 활성의 증가시키는 사료첨가제로서의 가능성에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있다.

산란계의 대표적인 세균성 질병인 가금티푸스는 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum* (*Salmonella* Gallinarum)이 원인체이며 닭의 급성 및 만성 전염병으로서 어린 병아리에서부터 성계에 이르기까지 모든 일령의 닭에서 패혈증을 유발하며 높은 폐사율이 특징이다. 이번 연구에서는 유기태화 미네랄인 CaFe-GMP 첨가제를 급이한 산란계에서 *Salmonella* Gallinarum을 인공감염 시킨 후 장기, 장관 내 미생물의 변화와 숙주의 면역학적 반응을 평가하였다.

재료 및 방법

시험 사료 제조

기본 급이량은 NRC (National Research Council, 1994) 요구량에 따라 제조되었다. 대조구 사료의 배합비와 영양소 함량은 Table 1과 같다. 유기태화 미네랄로서 Guanosine 5'-monophosphate (GMP)-chelated calcium and iron (CaFe-GMP, (주) 메디뉴트럴, 한국)을 사용하였다. CaFe-GMP는 유기 형태로서 칼슘과 철을 GMP에 킬레이트 하여 일반 산란계 사료로 제조되었다. CaFe-GMP 처리군은 기초사료에 칼슘 83 ppm과 철 55 ppm이 포함되어 만들어진 CaFe-GMP를 기초 사료량 중 0.16% 혼합하여 제조하였다(CaFe-GMP). 키토산 올리고당(DAC 90% 이상, 분자량 10,000이하, 금호화성, 한국)을 기질로 하는 킬레이트 철(Fe-OCH, (주) 메디뉴트럴, 한국)을 사료제조에 사용하였다.

실험동물 및 시험 설계

이번 실험에는 가금티푸스 백신을 접종하지 않은 실용계 농장의 34주령 Hy-Line 갈색계를 6수씩 3반복하여 18수를 공시하였다. 대상 산란계는 실험전 분변의 미생물 배양 검사를 통해 *Salmonella* 음성 조건을 확인하였다. 실험에 사용된 모든 개체는 입추 당일 무작위 추출법을 이용하여 기본사료에 무처리 SG 접종군(제1군), 기본사료에 CaFe-GMP 처리 SG 접종군(제2군),

Table 1. Composition of the basal diet

Ingredients, %	Layer feed (30~39 weeks of age)
Yellow corn	48.3
Wheat	4.39
Soybean meal	13
Distiller's dried grains with solubles	13.2
Canola meal	5
Sesame oil meal	2
Corn gluten	1.5
Oil	1
Salt	0.25
CaCO ₃	10.5
Mono-dicalcium phosphate	0.5
Dicalcium phosphate	0.1
Choline chloride	0.06
Vitamin premix*	0.1
Trace mineral premix [†]	0.1
Calculated chemical composition	
ME (kcal/kg)	2,800
Crude protein (%)	17
Crude ash (%)	15.5
Ca (%)	3.9
Methionine (%)	0.67
Available phosphorus (%)	0.35
Methionine+Cysteine (%)	
Calcium (ppm)	83 (CaFe-GMP group)
Iron (ppm)	55 (CaFe-GMP group)

*Supplied per kg of diet: vitamin A 13,000,000IU, vitamin D₃ 4,000,000IU, vitamin B₁ 3,000 mg, vitamin B₂ 7,000 mg, vitamin B₆ 5,000mg, vitamin B₁₂ 20 mg, lysine 3,000 mg, methionine 1,000 mg, tryptophan 700 mg, pantothenic acid 12,000 mg, niacin 50,000 mg, biotin 150 mg, folic acid 1,500 mg.

[†]Supplied per kg of diet: Iron 46 mg, Zinc 78 mg, copper 7 mg, Selenium 0.1 mg, Manganese 87 mg, iodine 1.3 mg chromium 0.12 mg.

기본사료에 Fe-OCHT 처리 SG 접종군(제3군)으로 편성하였다(Table 2). 사육 조건은 34주령 산란계를 3단 철제 cage (가로: 35 cm, 세로: 55 cm)에 3수씩 수용하여 3일간의 적응기간을 거친 후 사료 급이를 실시하였다. 전 시험 기간 동안 사료는 1수당 120 g 섭취기준으로 매일 3회 자유 급이 하였고, 급수용 니플의 숫자는 반복구별로 동일하게 배치하여 자유 음수 시켰다. 점등은 시험 개시 후 하루 12시간씩 일조량을 유지하였으며, 기타 사양관리는 국내 산란계 사양관리법에 준하여 산란계 시설에서 실시하였다. 모든 실험군은 전남대학교 수의과대학에서 수행하였으며, 전남대학교의 실험동물윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 동물 실험윤리지

Table 2. Experimental groups

Group	Feed Treatment	<i>Salmonella</i> Gallinarum inoculation
1	Basal diet	1.0×10^8 CFU/mL
2	Basal diet with CaFe-GMP supplementation	1.0×10^8 CFU/mL
3	Basal diet with Fe-OCHT supplementaion	1.0×10^8 CFU/mL

침을 준수하였다(승인번호: CNUACUC-YB-2015-59).

살모넬라균 배양 및 인공감염

Salmonella Gallinarum (SG)의 인공 감염을 위해 SG (strain SG3001)는 농림축산검역본부에서 분양 받았다. SG는 MacConkey agar (Difco Laboratories)에서 1일 배양한 후, 단독 집락을 선택하여 BHI (Difco Laboratories) 액체 배지에 접종하고 37°C에서 250 rpm으로 6시간 배양하였다. 배양된 SG는 평판 배지 접종 방법을 이용하여 1×10^8 CFU/mL 농도로 조정하여 각 실험군의 산란계에 사료 급이 28일째 되는 날 구강 접종 방법으로 인공감염에 사용하였다.

면역학적 평가

T 림프구 활성 평가

SG 인공감염 5일 후 실험군 닭의 익하정맥에서 3 mL씩 채혈하여 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 튜브를 이용하여 수집하였다. 채혈한 혈액을 Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS Oslo)과 동량으로 섞어 3,000 rpm로 30분간 원심 분리시켜 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)을 분리한 후, PBS로 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 2회 세척하였다. RBC lysis buffer (Biolegend, Korea)로 실온에서 10분간 적혈구를 용해한 후 PBS로 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 2회 세척하였다. 가라앉은 세포에 PBS 1 mL를 혼합하여 세포 수를 1×10^8 cell/mL로 조정하였다. 림프구의 증식 유형을 평가하기 위해서 PE mouse anti-chicken CD3 (Southern biotech, USA), FITC mouse anti-chicken CD4 (Bio-rad, USA) 및 R-PE mouse anti-chicken CD8 (Bio-rad, USA)를 이용하여 암실에서 30분간 반응시켜 염색하였다. 유세포분석기(BDbiosciences, USA)를 이용하여 CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 및 CD3⁺CD4⁻CD8⁺ T 림프구의 활성을 측정하여 CD4⁺/CD8⁺ 비율을 평가하였다.

Cytokine 활성 평가

SG 인공감염 후 각 실험군의 개체에서 혈액을 채취하여 실온에서 약 2시간 응고 시킨 후 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 닭의 cytokine 활성을 측정은 Chicken IL-2 ELISA kit (Cusabio, China)와 chicken IFN- γ ELISA kit를 사용하였다.

Salmonella Gallinarum 인공 감염 계군의 폐사율과 장기 및 장관내의 세균 분리

SG 인공감염 후 5일 동안 감염계군의 폐사율을 확인하였다. 인공 감염 계군에서 균의 재분리를 위하여 부검을 실시하였다. 모든 실험군에서 간, 비장, 그리고 맹장을 무균적으로 채취하였고, 멸균 종이를 케이지 아래 바닥에 배치하여 분변을 채취하였다. 세균 분리를 위해서 분변과 조직(간, 비장 및 맹장 내 분변) 0.1 g을 BPW (Buffered Peptone Water; Sigma Aldrich, USA) 9 mL에 넣어 균질화하고 37°C에서 24시간 배양 후, 배양액 1 mL을 Tetrathionate broth (TTB, Difco Laboratories) 10 mL에 넣어 37°C에서 24시간 배양하였다. 장 내용물 0.1 g은 BHI 액체 배지 9 mL에 넣어 현탁 시킨 후 10배수로 계단희석 ($10^{-1} \sim 10^{-8}$) 희석하였다. 선택 배지에 희석된 샘플을 100 μ L씩 접종시키고 37°C에서 1일 배양하였다. 배양을 위한 선택 배지 및 배양 조건은 *Lactobacillus*는 BCP agar (Difco Laboratories)에서 호기성 조건으로 48시간 배양하였고, *E. coli*와 Coliform은 MacConkey 배지(Difco Laboratories)에서 *Salmonella* spp.는 Salmonella Shigella agar (Difco Laboratories)를 이용하여 호기성 조건으로 24시간 배양하였다.

통계분석

모든 결과에 대한 통계자료분석은 Statistical Analysis System (SAS Institute, 2002)을 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 각 처리구 평균 간의 차이에 대한 유의성 검정은 Duncan's new multiple range test를 이용하여 실시하였다.

결 과

Salmonella Gallinarum 인공 감염 산란계군의 면역학적 평가

T 림프구의 활성 평가

SG 인공감염이 T 림프구 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해서 면역 신호 전달 표시자인 CD3⁺ T 림프구에 대한 CD4⁺ T 림프구의 발현(CD3⁺CD4⁺CD8⁻) 및 CD8⁺ T 림프구의 발현(CD3⁺CD4⁻CD8⁺)을 측정하고 CD4⁺와 CD8⁺의 비율을 평가하였다. 총 세포 중 CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T 림프구 활성은 1군에서는 SG 인공 감염 전 3.62%에서 접종 후 1.19%로 약 2.43% 감소되었고, 2군은 인공 감염 전 2.81%에서 접종 후 3.11%로 약 0.3% 증가되었으며, 3군은 인공감염 전 3.72%에서 접종 후 1.48%로 약 2.24% 감소되었다. 2군의 CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 활성은 SG 인공 감염 이후 대조군인 1군에 비해 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$, Fig. 1A). CD3⁺CD4⁻CD8⁺ T 림프구 활성은 SG 인공 감염 전 1군에서 2.89%에서 접종 후 0.44%로 약 2.45% 감소되었고, 2군에서 인공 감염 전 2.05%에서 접종 후 0.74%로 약 1.31% 감소되었으며, 3군은 2.84%에서 접종 후 0.26%로 감소되었다(Fig. 1B).

SG 공격접종 전 CD4⁺/CD8⁺ T 림프구 활성 비율은 1군에서 1.25%, 2군은 1.37% 그리고 3군은 1.30%이었다. 그러나 SG 인공감염 후 1군의 CD4⁺/CD8⁺ T 림프구 활성 비율은 2.70%로 약 1.45% 증가되었고, 2군은 4.20%로 약 2.83% 증가하였으며, 3군은 2.11%로 약 0.81% 증가가 나타났다. CD4⁺/CD8⁺ T 림프구 활성 비율은 2군이 1군과 3군에 비해 유의적인 증가를 보였다($P < 0.05$, Fig. 1C).

Cytokine의 활성 평가

실험 군들의 SG 인공감염 후 cytokine 활성화에 미치는 영향을 평가하였다(Fig. 2). IL-2의 활성은, SG 공격접종 후 1군에서는 공격접종 전의 33.38 mg/dL에서 감염 이후 38.95 mg/dL로 약 5.57 mg/dL가 증가되었고, 3군에서는 공격접종 전 33.17 mg/dL에서 감염 이후 34.66 mg/dL로 증가되었다. 2군에서도 살모넬라 공격 접종 전의 40.47 mg/dL에서 감염 이후 54.84 mg/dL로 약 14.37 mg/dL로 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$, Fig. 2A).

IFN- γ 활성의 경우 SG 인공감염 후 1군은 공격접종 전 29.45 mg/dL에서 감염 이후 31.49 mg/dL로 약 2.04 mg/dL 증가율을 보였고, 2군은 공격접종 전 32.54 mg/dL에서 감염 이후 34.89 mg/dL로 약 2.35 mg/dL 증가율을 보였고, 3군은 공격

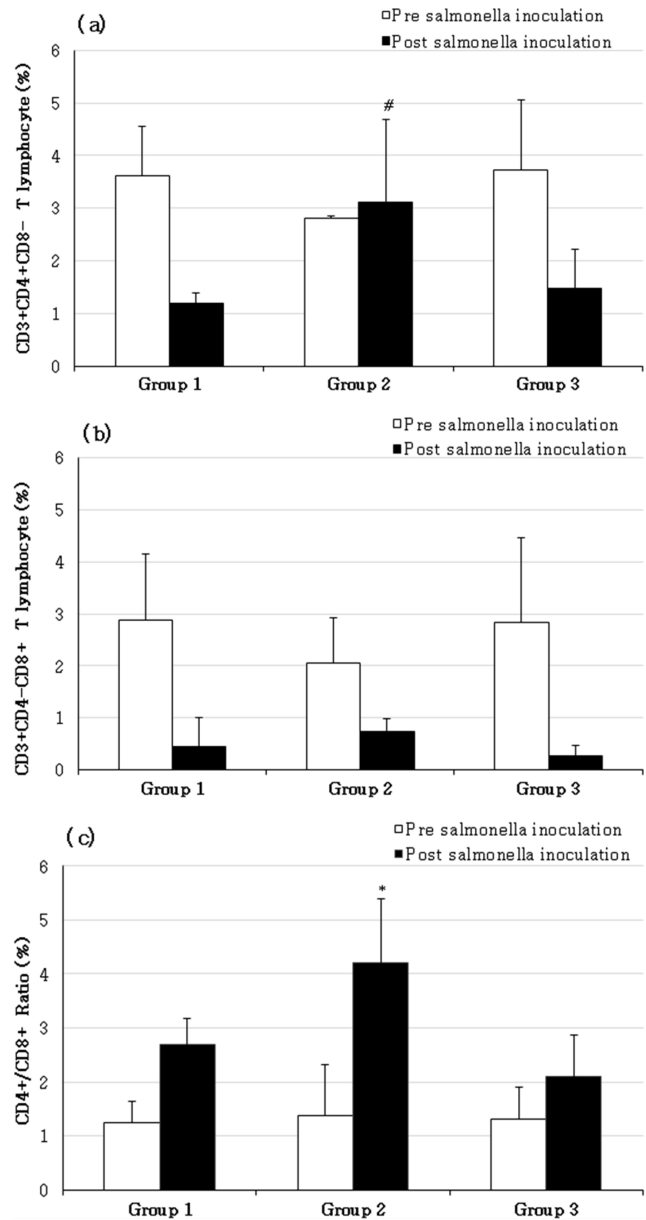


Fig. 1. Effect of dietary supplementation of chelated organic minerals on the T lymphocyte populations in layer groups with Salmonella Gallinarum postchallenge. (A) CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T lymphocyte, (B) CD3⁺CD4⁻CD8⁺ T lymphocyte, (C) CD4⁺/CD8⁺ ratio. # $P < 0.05$ in post Salmonella inoculation at group 2, * $P < 0.05$ in post Salmonella inoculation at group 2.

접종 전의 29.8 mg/dL에서 감염 이후 29.81 mg/dL 으로 약 0.01 mg/dL 증가율을 보였다(Fig. 2B). CaFe-GMP 처리군은 모든 처리군 중에서 가장 높은 IL-2와 IFN- γ 활성을 나타내었다.

Salmonella Gallinarum 인공 감염 계군의 폐사율과 장기 및 장관내의 세균 분리

Salmonella Gallinarum 인공 감염 계군의 폐사율과 살모넬라 재분리

SG 공격접종 후 2군과 3군에서는 폐사율이 발생하지 않았으나, 1군에서는 인공감염 4일 후 폐사가 발생하였고 살처분시까지 총 20%의 폐사율이 발생하였다(Fig. 3).

SG 인공감염 후 장내 살모넬라 균 재분리 결과를 Table 3에 나타내었다. SG 인공 감염 후 간에서 살모넬라 재분리 수는 1

군에서 9.7×10^{10} CFU/g이었고, 2군에서는 5.7×10^{10} CFU/g이었으며, 3군에서는 8.7×10^{10} CFU/g로 계수되었다. 비장에서 살모넬라 재분리 수는 1군에서 7.9×10^9 CFU/g이었고, 2군에서 3.3×10^9 CFU/g이었으며, 3군에서 3.2×10^9 CFU/g로 계수되었다. 간과 비장의 살모넬라 재분리 수는 무처리 접종군인 1군에서 가장 많이 분리되었으나, 군 간의 유의적인 차이는 없었다. 맹장 내 분변의 살모넬라 재분리 수는 1군에서 1.8×10^{10} CFU/g이었고, 2군에서 8×10^5 CFU/g이었으며, 3군에서 2.0×10^8 CFU/g로 계수되었다. 바닥 분변에서의 살모넬라 재분리 수는 1군에서 1.5×10^9 CFU/g이었고, 2군에서 2×10^7 CFU/g이었으며, 3군에서 2.8×10^{10} CFU/g로 계수되었다. 맹장 내 분변과 바닥 분변에서의 살모넬라 재분리 수는 CaFe-GMP 처리 접종군인 2군에서 유의적인 감소가 확인되었다($P < 0.05$).

장내 세균총의 변화

유기태화 미네랄 급이가 실험 군에서 SG 인공감염으로 이후 장내 세균총에 미치는 영향을 평가하였다(Table 4). SG 인공 감염 후 분변 내 유산균 수는 무처리 접종군인 1군에서는 1.4×10^{10} CFU/g이었고, 2군에서는 3.5×10^{10} CFU/g이었으며, 3군

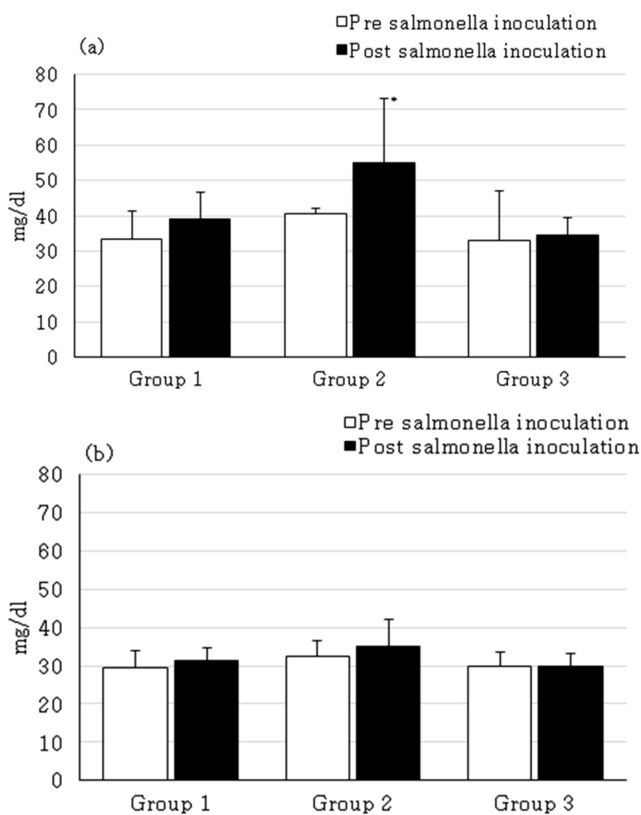


Fig. 2. Effect of dietary supplementation of chelated organic minerals on the serum cytokines in layer groups with *Salmonella* Gallinarum post challenge. (A) IL-2, (B) IFN-γ. * $P < 0.05$ in post *Salmonella* inoculation at group 2.

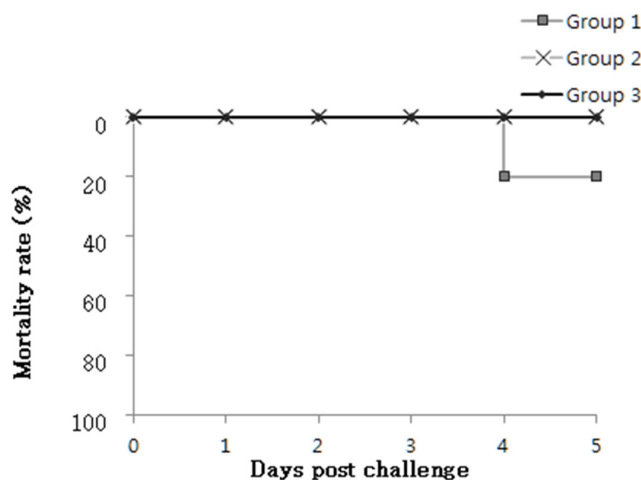


Fig. 3. Effect of dietary supplementation of chelated organic minerals on the mortality rate in layer groups with *Salmonella* Gallinarum post challenge.

Table 3. Effect of dietary supplementation of organic minerals on the re-isolation number of *Salmonella* in layer groups with *Salmonella* Gallinarum post challenge

Group	Liver (CFU/g)	Spleen (CFU/g)	Feces in cecum (CFU/g)	Paper litter from housing (CFU/g)
1	$9.7 \times 10^{10} \pm 3.8 \times 10^{10}$	$7.9 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$	$1.8 \times 10^{10} \pm 4.4 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^9 \pm 3.5 \times 10^9$
2	$5.7 \times 10^{10} \pm 3.3 \times 10^{10}$	$3.3 \times 10^9 \pm 2.3 \times 10^9$	$8.0 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^6$ *	$2.0 \times 10^7 \pm 2.0 \times 10^6$ *
3	$8.7 \times 10^{10} \pm 4.2 \times 10^{10}$	$3.2 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^9$	$2.0 \times 10^8 \pm 2.1 \times 10^8$	$2.8 \times 10^{10} \pm 2.7 \times 10^{10}$

* $P < 0.05$ compared with group 1.

Table 4. Effect of dietary supplementation of chelated organic minerals on the microflora form cecum in layer groups with *Salmonella Gallinarum* post challenge

Group	Lactic acid bacteria (CFU/g)	Fecal coliforms (CFU/g)	<i>E. coli</i> (CFU/g)
1	$1.4 \times 10^{10} \pm 2.8 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^9 \pm 0.87 \times 10^9$	$2.9 \times 10^9 \pm 5.9 \times 10^9$
2	$3.5 \times 10^{10} \pm 1.8 \times 10^9^*$	$9.3 \times 10^8 \pm 1.5^* \times 10^8$	$1.5 \times 10^8 \pm 2.0 \times 10^7^*$
3	$1.0 \times 10^9 \pm 1.0 \times 10^{10}$	$9.0 \times 10^7 \pm 9.0 \times 10^7^*$	$7.0 \times 10^7 \pm 9.0 \times 10^7^*$

* $P < 0.05$ compared with group 1.

의 유산균 수는 1.0×10^9 CFU/g로 계수되었다. 분변 내 유산균 수는 2군에서 1군과 3군에 비해 가장 많이 분리되었다. 분변 내 Coliform의 수는 1군에서는 4.7×10^9 CFU/g이었고, 2군에서는 9.3×10^8 CFU/g이었으며, 3군에서는 9.0×10^7 CFU/g로 계수되었다. 분변 내 Coliforms의 수는 2군이 1군에 비해 유의적으로 적게 분리되었다($P < 0.05$). 분변 내 *E. coli* 수는 1군에서는 2.9×10^9 CFU/g이었고, 2군에서는 1.5×10^8 CFU/g이었으며, 3군에서는 7.0×10^7 CFU/g로 계수되었다. 분변 내 *E. coli* 수는 2군에서 1군보다 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$).

고찰

산란계의 대표적인 세균성 질병인 가금티푸스는 닭의 급성 및 만성 전염병으로 어린 병아리에서부터 산란중인 성계에 이르기까지 모든 일령의 닭에서 패혈증을 유발하며 높은 폐사율이 특징이다. 이 연구에서는 CaFe-CMP 사료를 급여한 산란계군에 *Salmonella Gallinarum* 인공감염을 유발시킨 후 장기, 장관내 용 그리고 분변의 세균총의 변화와 면역반응을 확인하였다.

숙주의 면역반응에 관여하는 $CD4^+$ T 림프구는 대식세포, B 림프구, 그리고 수지상 세포와 같은 antigen-presenting cells (APCs)에 의한 MHC class II와 결합된 항원을 인식한다(Bovee-Oudenhoven 등, 2003). 항원과 결합된 $CD4^+$ T 림프구는 IL-2를 분비하고 이는 $CD8^+$ T 림프구와 자연살해세포 (NK cell)의 활성화와 B 림프구의 항체 생산을 유도한다. 살모넬라 감염에 의한 산란계의 염증반응은 $CD4^+$ T 림프구와 $CD8^+$ T 림프구의 활성화와 더불어 감염부위로의 면역세포 침윤이 관찰된다 (Berbdt와 Methner, 2001; 2004). 닭에서 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구 비율은 면역 증가와 관련이 있다고 알려져 있어 면역 반응과 기능을 측정하는데 사용된다(Abdukalykova 등 2008).

이번 실험에서, CaFe-GMP 급여 2군에서 $CD3^+CD4^+CD8^-$ T 림프구 활성은 SG 인공 감염 이후 대조군인 1군에 비해 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$, Fig. 1A). 또한, $CD3^+CD4^-CD8^+$ T 림프구 활성은 SG 인공 감염 전 1군에서 2.89%에서 접종 후 0.44%로 약 2.45% 감소되었고, 2군에서 인공 감염 전 2.05%에

서 접종 후 0.74%로 약 1.31% 감소되었으며, 3군에서 2.84%에서 접종 후 0.26%로 감소되었다(Fig. 1B) 이러한 결과는 *Salmonella* Enteritidis 구강 면역 접종 후 $CD3^+CD4^+$ 의 활성은 증가하였으나 $CD3^+CD8^+$ 활성이 감소한 결과와 유사하였다(Lalsiamathra와 Lee, 2017). 결과적으로 SG 공격접종 전 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구 활성 비율은 1군에서 1.25%, 2군은 1.37% 그리고 3군은 1.30%이었다. 그러나 SG 인공감염 후 1군의 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구의 활성 비율은 약 1.45% 증가되었고, 2군은 약 2.83% 증가하였으며, 3군은 약 0.81% 증가가 나타났다. 종합적으로 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구 활성 비율은 2군이 1군과 3군에 비해 유의적인 증가를 보였다($P < 0.05$, Fig. 1C).

본 실험에서 확인된 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구의 활성 비율은 산란계에 프리바이오틱(mannan oligosaccharide)의 급여가 살모넬라 감염 이후에 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구의 비율을 증가시켰다는 결과(Lourenço 등, 2015)와 유사하였다.

Lourenço 등(2015)은 숙주의 대식 세포에 저항하며 세포 내 증식이 가능한 살모넬라를 제거하기 위해서는 T 림프구 유래의 세포 매개성 면역반응이 매우 중요한 역할을 한다는 보고하였다. 따라서 본 실험에서 확인된 $CD4^+/CD8^+$ T 림프구의 활성화도 유사한 세포성 면역반응으로 살모넬라의 제거를 유도할 수 있으리라 생각된다.

Ravindran과 McSorely (2005)는 IFN- γ 세포 매개 면역의 중요한 인자이며 살모넬라 감염 시 T 세포 활성화와 더불어 IFN- γ 의 분비가 증가한다고 보고하였다. Zhu 등(2017)은 *Salmonella* Cholerasuis 생균 백신 접종시 Th1의 면역 반응과 관련되는 pro-inflammatory cytokines인 IL-2와 TNF- α 의 증가를 보고하였다. Goel 등(2010)은 *Salmonella* Typhimurium에 감염된 흰쥐에서 바질(Ocimum sanctum) 추출물 투여시 IFN- γ , IL-2 그리고 TNF- α 의 분비가 증가된다고 보고하였다.

이번 실험에서도 CaFe-GMP의 급여가 살모넬라 인공 감염에 대한 혈중 IL-2와 IFN- γ 의 분비가 유의적으로 증가되어 상기 보고와 유사한 면역반응이 확인되었다. 따라서 CaFe-GMP의 급여는 살모넬라 감염에 의한 MHC class II 항원을 인지하

는 CD4⁺ T 림프구 활성의 증가로 인한 IL-2와 IFN- γ 의 분비를 증가시켜 산란계에서 세포 매개성 면역을 활성화 시켜서 숙주의 대식 세포내에 증식하는 살모넬라를 제거하는 기전에 중요한 역할을 제공할 수 있으리라 생각된다.

가금류의 살모넬라증은 임상증상 발현 유무와 간, 비장 및 분변의 살모넬라 재분리와 같은 세균학적 동정으로 확인된다 (Desmidt 등, 1998). Wang 등(2012)은 살모넬라 감염 이후에 닭에 유기미네랄(zinc-bearing clinoptilolite)을 급이한 군의 살모넬라 수는 감소하고 유산균의 수는 증가하였다고 보고 하였으며, Upadhaya 등(2016)은 킬레이트 복합 미네랄을 음수 공급한 산란계의 분변 내 살모넬라와 *E. coli*의 분리 수가 감소했다고 보고 하였다. 본 실험에서도 SG 인공감염 후의 분변 및 장기(간, 비장)의 살모넬라 재분리 성적을 정량 평가한 결과, CaFe-GMP를 급이한 실험 2군에서는 lactobacillus의 세균수가 다른 1, 2군보다 높았으며, 계사 바닥분변과 맹장 내용 분변의 살모넬라 재분리 수는 대조군인 1군에 비해 유의적으로 낮게 관찰되었다. 이러한 결과는 Wang 등(2012)과 Upadhaya 등(2016)의 결과와 유사하였으며 산란계의 살모넬라 감염증에 대한 예방방법으로 많이 사용하는 경쟁적 배제 방법에는 많이 사용되고 있는 Lactobacillus의 효과(Zhang 등, 2007)와도 유사하였다.

결 론

산란계의 살모넬라증은 오염된 사료와 물, 사양 환경 조건을 통해 발생하고 있다. 질병의 효과적인 근절을 위해서는 종계장의 관리와 농장의 HACCP의 적용이 필요하다. 본 연구에서는 이와 관련하여 대안적인 살모넬라 예방방법으로써 CaFe-GMP를 급이한 산란계의 살모넬라에 대한 면역반응을 평가하였다.

CaFe-GMP의 사료 급이는 산란계 장관내의 *Lactobacillus* spp의 증식을 유도하고 살모넬라증에 필요한 세포성 면역 반응에 관여하는 CD4⁺/CD8⁺ T 림프구를 활성화 시켰다. 그리고 살모넬라 감염에 의한 MHC class II 항원을 인지하는 CD4⁺ T 림프구 활성의 증가로 IL-2와 IFN- γ 의 분비를 증가시켰다. 결론적으로 CaFe-GMP 급이 산란계에서 CD4⁺/CD8⁺ T 림프구의 활성화는 세포 매개성 면역 기전을 통해 대식 세포내에서 증식하는 살모넬라를 제거할 수 면역반응을 유도하였다. 따라서 CaFe-GMP는 기능성 사료 첨가제로서 사료내의 항생제 오염용 첨가 문제를 개선하고, 개체의 면역을 증가시키는 방법으로서 양계산업 현장의 살모넬라증 예방에 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

This research was supported by the High Value-added Food Technology Development Program (113024-3), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

SuJeong Heo, <https://orcid.org/0000-0003-0720-2046>

HongBum Koh, <https://orcid.org/0000-0001-7737-9512>

REFERENCES

- Abdukalykova ST, Zhao X, Ruiz-Feria CA. 2008. Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broiler chickens. *Poult Sci* 87(1): 50-55.
- Ammerman CB, Baker DH, Lewis AJ. 1998. Supplemental organically bound mineral compounds. pp. 24: 156-178. In: Garnsworthy PC, Wiseman J(ed.). *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham University Press.
- Berbdit A, Methner U. 2001. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Vet Immunol Immunopathol* 78(2): 143-161.
- Berbdit A, Methner U. 2004. B cell and macrophage response in chicks after oral administration of *Salmonella typhimurium* strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27(4): 235-246.
- Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van Doesburg W, Witteman BJ, Van Der Meer R. 2003. Diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* infection of humans is inhibited by dietary cal-

- cium. *Gastroenterology* 125(2): 469-476.
- Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F. 1998. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella hadar* in chickens. *Vet Microbiol* 60(2-4): 259-269.
- Goel A, Kumar S, Bhatia AK. 2010. Effect of *Ocimum sanctum* on the development of protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection through cytokines. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(9): 682-686.
- Lalsiamthara Jonathan, JohnHwa Lee. 2017. Immunization with *Salmonella* Enteritidis secreting mucosal adjuvant labile toxin confers protection against wild type challenge via augmentation of CD3⁺CD4⁺ T-cell proliferation and enhancement of IFN- γ , IL-6 and IL-10 expressions in chicken. *Vaccine* 35(5): 767-773.
- Lim HS, Paik IK. 2006. Effects of dietary supplementation of copper chelates in the form of methionine, chitosan and yeast in laying hens. *Asian-Aust J Anim Sci* 19(8): 1174-1178.
- Lourenço MC, Kuritza LN, Hayashi RM, Miglino LB, Durau JF, Pickler L, Santin E. 2015. Effect of a mannanoligosaccharide-supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. *J Appl Poultry Res* 24(1): 15-22.
- NRC (National Research Council of the National Academies) 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. The National Academy Press, Washington, D.C. USA.
- Omole AJ, Ogbosuka GE, Salako RA, Ajayi OO. 2005. Effect of replacing oyster shell with gypsum in broiler finisher Diet. *J Appl Sci Res* 1(2): 245-248.
- Pal DT, Gowda NKS. 2015. Organic trace minerals for improving live stock production. <https://www.feedipedia.org/content/organic-trace-minerals-improving-livestock-production>.
- Ravindran R, McSorley SJ. 2005. Tracking the dynamics of T-cell activation in response to *Salmonella* infection. *Immunology* 114(4): 450-458.
- Seo SH, Lee HK, Ahn HJ, Paik IK. 2008. The effect of dietary supplementation of Fe-methionine chelate and FeSO₄ on the iron content of broiler Mmat. *Asian-Aust J Anim Sci* 21(1): 103-106.
- Upadhaya SD, Lee BR, Park JW, Kim IH. 2016. Effects of supplementation of ionized or chelated water-soluble mineral mixture on the live performance, nutrient digestibility, blood profile, egg quality, and excreta microbiota of laying hens. *Braz J Poult Sci* 18(2): 239-246.
- Wang LC, Zhang TT, Wen C, Jiang ZY, Wang T, Zhou YM. 2012. Protective effects of zinc-bearing clinoptilolite on broilers challenged with *Salmonella pullorum*. *Poult Sci* 91(8): 1838-1845.
- Zhang G, Ma L, Doyle MP. 2007. Salmonellae reduction in poultry by competitive exclusion bacteria *Lactobacillus salivarius* and *Streptococcus cristatus*. *J Food Prot* 70(4): 874-878.
- Zhu L, Zhao X, Yin Q, Liu X, Chen X, Huang C, Suo X. 2017. Mucosal IgA and IFN- γ ⁺ CD8 T cell immunity are important in the efficacy of live *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis vaccines. *Sci Rep* 13(7): 464-408.