

산란계에서 Chlorhexidine-inactivated *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신의 효능평가

유영주 · 유정희 · 허 진*

전북대학교 수의과대학 수의공중보건학실

Evaluation of the protective efficacy of trivalent *Salmonella* inactivated vaccine including Chlorhexidine-inactivated *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* and *S. Gallinarum* in poultry

Yeong Ju Yu, Jeong Hee Yu, Jin Hur*

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

Protective efficacy of trivalent *Salmonella* inactivated vaccine containing Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), and *S. Gallinarum* (SG) strains, was evaluated in this study. A total of 70 brown nick layers were divided into 7 groups, A to G, containing 10 hens per group. All hens in groups B to D were intramuscularly immunized with approximately 7×10^8 cells (3×10^8 cells of SE + 1×10^8 cells of ST + 3×10^8 cells of SG) of the trivalent vaccine in 0.5 mL of PBS. All chickens in groups E to G were injected with sterile PBS. All hens of groups B and E, groups C and F, and groups D and G were orally challenged with approximately 2×10^9 CFU of wild-type SE, ST, and SG, respectively. Serum IgG titers and CD3⁺CD4⁺ T-cells, and CD3⁺CD8⁺ T-cells levels of groups B to D significantly higher than those of group A. In addition, all animals in groups A to C, E and F showed no clinical symptoms and survived after the virulent challenges, whereas one chicken in group D died and all chickens in group G died following the challenge. The protection against wild-type SE and ST in liver, spleen, cecum, and cloaca of groups B and C chickens was significant effective as compared with those in groups E and F. These indicate that the trivalent inactivated vaccine can be an effective tool for prevention of *Salmonella* infections by inducing robustly protective immune responses and cellular immune response in chickens.

Received November 28, 2023

Revised December 5, 2023

Accepted December 7, 2023

Corresponding author:

Jin Hur

E-mail: hurjin@jbnu.ac.kr

https://orcid.org/0000-0003-2658-0747

Key Words: Salmonellosis, Zoonosis, Foultry, Fowl typhoid, Trivalent vaccine

서론

살모넬라 식중독 감염의 가장 흔한 매개체로는 가금류와 계란으로 알려져 있으며, 살모넬라균에 감염된 닭의 난소 및 난관에 서 난각이 형성되기 이전에 살모넬라균이 계란 내부에 오염되거나 산란 과정에서 난각에 오염될 수도 있다(Yang 등, 2010). 국내 식중독 발생 양상은 5년간(2017~2021년) 평균 259회 발생

하였으며, 평균 환자 수는 5,276명으로 매년 꾸준히 보고되고 있다. 이중 식중독 발생 환자수는 살모넬라 식중독이 가장 많은 것으로 나타나고 있으며 더욱이 집단 발생하는 식중독에서 살모넬라균으로 인한 경우가 높은 비율을 차지하고 있음이 보고되고 있다(Ministry of Food and Drug Safety, 2022; Jang 등, 2023).

국내에서 유행하는 살모넬라 혈청형은 *Salmonella* (*S.*) En-

teritidis가 49%로 가장 높은 빈도로 보고되고 있으며, *S. Typhimurium*과 *S. Typhi*가 각각 15.8%와 7.9%를 차지하고 있다. 더욱이 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*이 차지하는 식중독 발생 비율은 64.8%에 달하는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2006). *S. Enteritidis* 혈청형은 아시아에서 38%의 빈도로 분리 보고되고 있으며, 전 세계적으로도 가장 빈도가 높은 혈청형으로 알려져 있다(Galanis 등, 2006). *S. Typhimurium*은 1997년 이후 *S. Enteritidis* 다음으로 가장 높은 비율로 검출되는 혈청형으로 알려져 있으며, 세계적으로도 높은 빈도로 분리 보고되고 있어 그 중요도가 높아지고 있다(Kim 등, 2004; Helms 등, 2005).

*Salmonella Gallinarum*의 경우 가금티푸스의 원인균으로 산란계에서 심한 설사와 폐사가 특징이며 높은 폐사율을 보이는 세균성 전염병으로 한국에서는 1992년 처음 발병이 보고된 이후 전국으로 발생하고 있는바, 이는 가금티푸스에 취약한 갈색란을 생산하는 품종이 국내에서 주로 사육되고 있기 때문으로 보고되고 있다(Woo와 kim, 1998).

국내에서 가금티푸스 예방을 위해 SG9R과 같은 약독화 생균 백신이 사용되고 있는데 생균 백신은 장기간 방어 효과를 나타내고, 국소면역 및 세포 매개성 면역반응을 유도할 수 있다는 점에서 우수하다는 평가를 받고 있다(Lillehoj 등, 2000; Won 등, 2016). 하지만 살모넬라 약독화 생균 백신의 안전성 문제가 지속적으로 제기되고 있다. 그 이유로는 불완전한 백신주가 접종된 숙주에서 증식하는 과정에서 약독화된 병원성 유전자가 복귀되어 병원성을 회복할 가능성 때문이다(Barbezange 등, 2000). 반면 살모넬라 불활화 백신의 경우 살모넬라에 감염된 닭의 분변을 통한 균 배출이 감소됨과 더불어 계란 내 오염을 감소시키는 것으로 보고되었다(Gast 등, 1993; Jawale 등, 2014; Jawale과 Lee, 2016). 또한 불활화 백신은 높은 안전성을 가지고 있으며, 다른 살모넬라 혈청형과 혼합하여 다가백신으로 사용할 수 있는 응용성을 가지고 있다는 점에서 개발 및 상용화되어 판매되고 있다(Clifton-Hadley 등, 2002). 그렇지만 불활화 사균체 백신의 경우 백신을 접종한 대상 동물체 내의 면역반응에 의해 쉽게 제거될 수 있어 항원 발현이 제한적이라는 단점으로 인해 면역보강제(adjuvant)를 필요로 하며(Desin 등,

2013), 주로 체액성 면역을 유도하고 세포 매개성 면역반응 유도 능력은 약독화 생균 백신에 비해 현저히 떨어지는 단점을 지니고 있어 세포 매개성 면역 반응 유도가 반드시 필요한 세포 내 기생 세균 예방에 있어서는 예방 효과에 한계가 있다(Desin 등, 2013).

최근 불활화 사균체 백신임에도 신개념 사균체 백신인 고스트 백신은 세포 내 기생세균 예방에 필수적인 세포 매개성 면역반응을 유도하여 실험동물에서 살모넬라 감염을 효과적으로 예방하였다는 연구 결과 보고가 있으며, 살모넬라 사균체에 오일보조제(oil-adjuvant)를 혼합한 불활화 백신을 접종한 산란계에서 내부장기 내 살모넬라 분리율의 감소, 분변 내 살모넬라 배출 빈도 및 균량의 감소 등이 연구되었고(Gast 등, 1992; Barbezange 등, 2000, Jawale 등, 2014), 모계에서 생성된 면역 항체는 계란을 통해 병아리로 이행되어 부화 후 일정 기간 동안 살모넬라 야외 감염에 대한 방어력을 제공하는 것으로 보고되었다(Nicholas 등, 1991; Mailson 등, 2022).

따라서 본 연구에서는 국내에서 유행하고 있는 *S. Enteritidis*와 최근 그 중요성이 증가하고 있는 *S. Typhimurium* 및 닭의 폐사를 유발하는 가금 티푸스 원인균인 *S. Gallinarum*을 Chlorhexidine digluconate solution으로 불활화를 유도하여 3가 살모넬라 불활화 백신을 제조하여 산란계에서 체액성 및 세포 매개성 면역반응 유도 여부와 예방 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주, 배양조건 및 프라이머

불활화 백신 제작 및 공격 접종 균주 그리고 백신 접종 후 항체역가를 측정하기 위한 ELISA coating을 위한 Outer membrane proteins (OMPs) 추출을 위한 균주는 국내 갈색 산란계에서 분리한 *S. Enteritidis*의 야생형 독성 분리주인 HJL345, *S. Typhimurium*의 야생형 독성 분리주인 HJL812, *S. Gallinarum*의 야생형 독성 분리주인 HJL465를 사용하였다(Table 1). 각 균주는 Luria-Bertani Broth (LB; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 및 Brilliant green agar (BGA; BD Difco,

Table 1. Bacterial strains used for this study

Strain	Description	Source of reference
<i>S. Enteritidis</i> HJL345	Isolates from Korean chicken in 2009	Lab stock
<i>S. Typhimurium</i> HJL812	Isolates from Korean chicken in 2019	Lab stock
<i>S. Gallinarum</i> HJL465	Isolates from Korean chicken in 2016	Lab stock

USA)에 접종되어 37°C에서 배양되었다. 공격 접종 후 부검 시 비장과 간 등으로부터 분리된 균주의 혈청형을 확인하기 위해 사용된 *Salmonella* 특이 프라이머 및 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 확인을 위한 특이 프라이머 염기서열은 아래 Table 2에 서술하였다.

실험 동물

살모넬라에 음성인 농장의 갈색 산란계 초생추 70수를 구입하여 실험에 사용하였다. 연구용 병아리는 실험에 사용된 백신 외에 어떠한 백신도 접종하지 않았으며, 시판 상업용 사료와 음료를 자유롭게 섭취할 수 있는 환경에서 사육되었다. 본 실험에서 보고된 동물실험은 Korean Council on Animal Care의 인가를 받은 전북대학교 동물윤리 위원회의 승인(JBNU2022-066)을 받아 진행하였다.

3가 살모넬라 불활화 백신 제조

3가 살모넬라 불활화 백신의 제작을 위해 Moon 등(2020)의 방법을 약간 변형하여 HJL345 (*S. Enteritidis*), HJL812 (*S.*

Typhimurium), HJL465 (*S. Gallinarum*)를 Chlorhexidine digluconate solution (CHX; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 불활화를 유도하여 3가 살모넬라 불활화 백신을 제조하였다. 즉, 완전 불활화가 확인된 침전물을 ISA78 adjuvant (Seppic, Seoul, South Korea)와 3:7 비율로 혼합하여, 불활화 전 생균수 기준으로 *S. Enteritidis* 3×10^8 + *S. Typhimurium* 1×10^8 + *S. Gallinarum* 3×10^8 의 균수로 총 7×10^8 cells/0.5 mL 농도로 혼합된 3가 살모넬라 불활화 백신으로 제조하여 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

백신 접종 및 가검물 채취

사육된 갈색 산란계가 5주령이 되었을 때 무작위로 선별하여 7그룹(각 그룹 당 10수)으로 나누어 새로운 환경에 적응하도록 일주일간의 안정화 기간을 거친 후 6주령이 되었을 때 음성 대조군 그룹 A는 아무 것도 접종하지 않았으며, 백신군인 B, C, D 그룹의 모든 닭은 살모넬라 3가 불활화 백신을 0.5 mL씩 6주령에 1차, 9주령에 2차로 근육 접종하였고, 각 군주별 양성대조군인 E, F, G 그룹의 경우 같은 시기에 각각 멸균 Phosphate-buffered saline (PBS) 0.5 mL씩 접종하였다(Table 3).

Table 2. Primer sequences and sizes of PCR-amplified targets

Primer	Sequence (5'-3')	Amplification target	Amplification length (bp)	Reference
OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	<i>Salmonella</i> genus	204	Alvarez et al. (2004)
OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG			
ENTF	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG	<i>Salmonella</i> Enteritidis	304	Alvarez et al. (2004)
ENTR	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G			
TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	<i>Salmonella</i> Typhimurium	401	Alvarez et al. (2004)
TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT			
SG-L	GAT CTG CTG CCA GCT CAA	<i>Salmonella</i> Gallinarum	252	Kang et al. (2011)
SG-R	GCG CCC TTT TCA AAA CAT A			
SGP-L	CGG TGT ACT GCC CGC TAT		172	
SGP-R	CTG GGC ATT GAC GCA AA			

Table 3. Animal experimental group design for trivalent vaccine experiment

Group	n	Types of vaccines	Challenge strain
A	10	Negative control	-
B	10	Vaccination	<i>S. Enteritidis</i>
C	10	Vaccination	<i>S. Typhimurium</i>
D	10	Vaccination	<i>S. Gallinarum</i>
E	10	SE positive cont.	<i>S. Enteritidis</i>
F	10	ST positive cont.	<i>S. Typhimurium</i>
G	10	SG positive cont.	<i>S. Gallinarum</i>
Total	70		

혈청은 0 weeks post prime immunization (1차 접종 전, 0 WPPI), 3 WPPI (2차 접종 전), 6 WPPI (공격접종 전)에 각각 채혈하여 준비하였다. 즉, 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 분리된 혈청은 -20°C 에 보관하여 실험에 사용하였다.

안전성 확인을 위한 체중 측정 및 상태 관찰

실험에 사용한 백신의 안전성을 평가하기 위하여 백신군과 대조군 모두 백신 접종 전, 1차 접종 3주 후, 2차 접종 3주 후에 닭 체중 측정 개체관리기(GI-1000, G-Tech International, Uijeongbu, Korea)를 사용하여 모든 개체의 체중을 측정하였고, 모든 개체는 하루에 두 번씩 발열, 설사, 식욕부진, 운동성 저하 및 폐사 여부를 확인하였다.

면역반응 평가를 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3가 살모넬라 불활화 백신 접종 후 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*에 대한 혈청 immunoglobulin G (IgG) 항체 역가는 각 균주의 OMPs를 추출하여, 간접 효소면역 흡착 측정법(Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 각 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*의 OMPs를 멸균 PBS로 0.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이 되도록 희석하여 4°C 에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 1%의 Skim milk (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)로 30분간 실온에서 blocking 한 후 WPPI 0, 3, 6에 분리한 혈청을 1:200으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-chicken IgG (Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA)로 1시간 반응시킨 후 *o*-phenyldiamine dihydrochloride substrate (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA)으로 15분간 발색시킨 다음 stop solution (Sulfuric Acid, DUKSAN, Seoul, South Korea)으로 발색을 정지시켜 ELISA 분광도기계 (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 492 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정하였다.

세포 매개성 면역반응 측정

세포 매개성 면역 반응 유도 여부를 확인하기 위해 Senevirathne 등(2021)의 방법을 약간 변형하여 Flow Cytometry

Analysis에 의해 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ T-cells이 측정되었다. 즉, 살모넬라 불활화 3가 백신 접종 후 닭의 말초 혈액 내 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ T-cells 수치를 측정하기 위해 2차 백신 접종 후 2주째에 대조군인 A그룹에서 10수, 백신군인 B, C, D 그룹에서 무작위로 10수를 선별하여 채혈하였다. $1 \times 10^6/\text{well}$ 이 되도록 희석된 말초혈액 내 림프구는 각 300 ng/mL의 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* OMPs으로 42°C , 5% CO_2 조건에서 12시간 각각 재 자극 되었다. 재 자극된 세포는 anti-chicken CD3 Monoclonal Antibody (APC), anti-chicken CD4 Monoclonal Antibody (FITC), anti-chicken CD8 alpha Monoclonal Antibody (PE); (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 4°C 에서 30분 동안 형광 염색한 후 BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ 및 $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ T-cells 세포군의 분화 정도를 측정하였다. $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ 및 $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ T-cells 세포군의 분화 정도는 FlowJo™ Software (BD Difco, USA)를 이용하여 분석되었다.

공격접종 및 생존률과 각 조직에서의 공격접종 균주 분리

국내 갈색 산란계에서 분리한 HJL345, HJL812, HJL465를 LB Broth 10 mL에 각각 접종하여 37°C 배양기에서 16시간 배양하였다. 배양액을 신선한 LB Broth에서 재접종하여 OD₆₀₀의 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 4,000 rpm으로 50분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 PBS로 2회 세척하였다. 침전물을 10% sucrose (JUNSEI, Chuno-ku, Tokyo, Japan) 함유 PBS로 각 1×10^{10} CFU/mL이 되도록 재부유하여, 그룹 B, E의 닭 1수 당 *S. Enteritidis*를 200 μL 씩, 그룹 C, F의 닭 1수 당 *S. Typhimurium*을 200 μL 씩, 그룹 D, G의 닭 1수 당 *S. Gallinarum*를 200 μL 씩 각각 경구접종하였다. 공격접종 후 14일 동안 하루에 두 번씩 설사, 식욕부진, 운동성 저하 및 폐사 여부를 관찰하고, 14일째 모든 생존개체를 희생시켜 간, 비장, 맹장, 총배설강 등으로부터 가검물을 채취하여 Nandre 등(2011)이 기술한 방법에 따라 각 살모넬라 균주를 분리하였으며, 분리된 균주는 Table 2에 기술된 특이 살모넬라 혈청형별 감별 프라이머를 사용하여 공격접종 균주 여부를 확인하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 5.02 GraphPad software (San Diego, CA, USA)을 이용하여 Tukey's multiple comparison test에

기반한 one-way analysis of variance (ANOVA)에 의해 평균 비교되었다. *P*의 값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 평가되었으며, 모든 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시되었다.

결 과

백신접종 후 안전성

1차 접종 후 3주 동안 체중 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다.

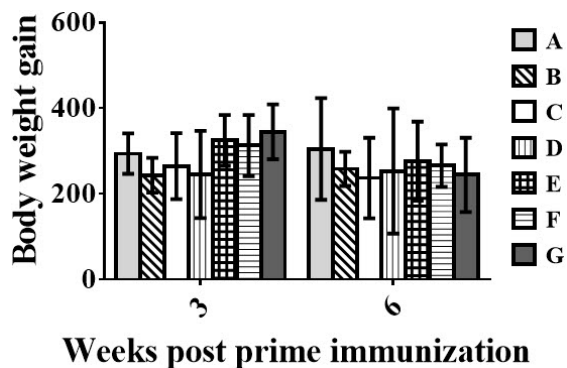


Fig. 1. Body weight gain post prime and boost immunization with the trivalent *Salmonella* inactivated vaccine or sterile PBS in chicken. Group A hens were non-immunized; groups B~D hens were immunized with 7×10^8 cells/0.5 mL (*S.* Enteritidis 3×10^8 +*S.* Typhimurium 1×10^8 +*S.* Gallinarum 3×10^8) of the trivalent *Salmonella* inactivated vaccine, respectively; and groups E~G hens were immunized with sterile PBS, respectively. Data shown are the means for all hens in each group, and error bars show the standard deviations (SD).

즉, 대조군은 1차 접종 후 3주 동안 평균 293.5 ± 47.2 g 증가 하였으며, 백신 접종군인 B~D 산란계는 각각 243.5 ± 40.7 g, 264.5 ± 77.0 g, 245.0 ± 101.8 g씩 증가하였다. 그리고 2차 접종 후 3주 동안 대조군이 304.5 ± 118.5 g 증가하는 동안 백신 접종군인 B~D 산란계는 각각 258.0 ± 39.9 g, 236.5 ± 94.0 g, 253.0 ± 146.1 g씩 증가하였다. 하지만 PBS 접종 군인 E~G 산란계는 대조군과 별반 차이가 없었다. 백신 접종군인 B~D 및 PBS 접종군인 E~G의 산란계 모두 1차 백신 접종 후 3주간 및 2차 백신 접종 후 3주간 발열, 설사, 식욕부진, 운동성 저하 및 폐사가 관찰되지 않았다.

항체 역가

백신 접종 전, 백신 1차 접종 후, 2차 접종 후에 각각 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs를 이용한 ELISA로 혈청 IgG 항체 역가를 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. *S.* Enteritidis OMPs로 ELISA를 측정된 결과, 음성대조군인 A 그룹의 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 항체 역가는 각 0.425 ± 0.11 , 0.509 ± 0.18 , 0.490 ± 0.09 로 측정되었고, 백신 접종군인 B~D 그룹의 경우 접종 전은 각 0.491 ± 0.11 , 0.368 ± 0.09 , 0.480 ± 0.10 로 음성대조군인 A 그룹과 비슷한 정도의 역가가 측정되었으나 1차 접종 후에는 1.227 ± 0.07 , 1.249 ± 0.05 , 1.269 ± 0.11 으로, 2차 접종 후에는 2.446 ± 0.09 , 2.450 ± 0.11 , 2.544 ± 0.17 로 점차 증가하였다. *S.* Typhimurium OMPs로 ELISA를 측정된 결과, 음성대조군인 A 그룹의 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 항체역가는 각각 0.377 ± 0.09 , 0.462 ± 0.16 , 0.599 ± 0.17 인 반면 백신군인 B~D 그룹에서 접종 전보다 1차 접종 후

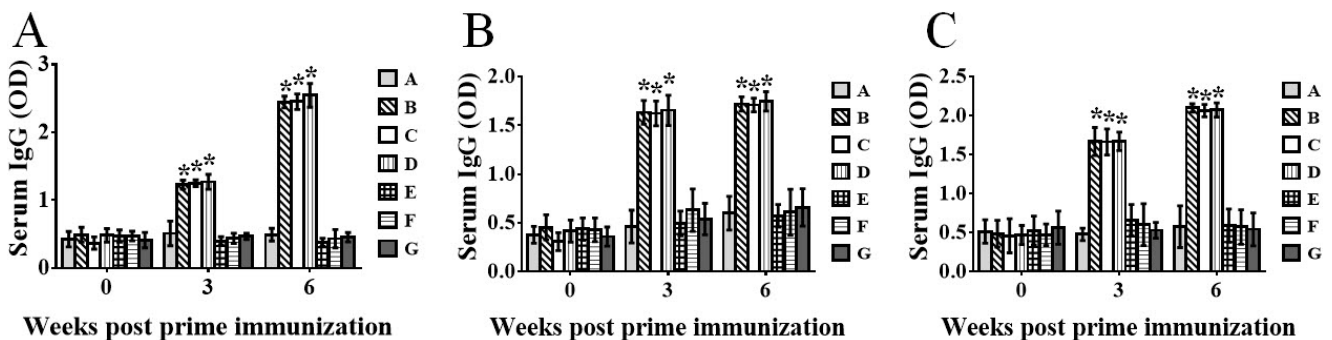


Fig. 2. Serum IgG titers against *Salmonella* Enteritidis OMPs (A), *S.* Typhimurium OMPs (B), and *S.* Gallinarum OMPs (C), respectively, in hens intramuscularly immunized with the trivalent *Salmonella* inactivated vaccine or sterile PBS. Group A hens were non-immunized; groups B~D hens were immunized with 7×10^8 cells/0.5 mL (*S.* Enteritidis 3×10^8 +*S.* Typhimurium 1×10^8 +*S.* Gallinarum 3×10^8) of the trivalent *Salmonella* inactivated vaccine, respectively; and groups E~G hens were immunized with sterile PBS, respectively. Data shown are the means for all hens in each group, and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P < 0.05$) and those of the control group.

각 1.634 ± 0.12 , 1.623 ± 0.13 , 1.654 ± 0.15 , 2차 접종 후 각 1.720 ± 0.07 , 1.709 ± 0.07 , 1.746 ± 0.10 으로 항체 역가가 상승하였다. 또한 *S. Gallinarum* OMPs로 ELISA를 측정한 결과, 음성대조군인 A그룹의 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 항체 역가는 각각 0.514, 15, 0.477, 08, 0.576, 27이었으며, 백신 접종군인 B~D 그룹에서 항체 역가는 1차 접종 후 1.668, 18, 1.662, 17, 1.671, 12으로, 2차 접종 후 2.098, 05, 2.063, 08, 2.072, 09으로 증가하였다. PBS 접종군인 E~G 그룹은 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*의 OMPs에 대해 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 음성대조군과 비슷한 항체 역가 관찰되었다.

CD3⁺CD4⁺ T-cells, CD3⁺CD8⁺ T-cells

음성대조군인 A그룹과 백신 접종 그룹인 B~D 그룹의 혈액에서 분리된 림프구를 각 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* OMPs로 재 자극하고 CD3⁺CD4⁺ T-cells, CD3⁺CD8⁺ T-cells의 수치를 측정한 결과, 대조군에서의 CD3⁺CD4⁺ T-cells 백분율이 각각 $16.28\% \pm 1.78$, $17.22\% \pm 1.32$, $18.4\% \pm 0.68$ 인 반면, 백신 접종군에서의 CD3⁺CD4⁺ T-cells 백분율은 $22.02\% \pm 2.01$, $26.16\% \pm 1.3$, 25.42 ± 13.79 로 측정되었다. 각 살모넬라 OMPs로 자극된 CD3⁺CD8⁺ T-cells 백분율은 음성대조군의 경우에는 각각 $7.8\% \pm 1.45$, $7.02\% \pm 1.03$, $8.67\% \pm 0.77$ 인 반면, 백신 접종군에서의 CD3⁺CD8⁺ T-cells 백분율은 $11.24\% \pm 1.06$, $9.86\% \pm 1.11$, $12.56\% \pm 0.53$ 로 측정되었다(Fig. 3).

공격접종 후 생존율 및 부검 결과

2차 백신 접종 후 3주째에 음성대조군인 A 그룹을 제외한 모든 그룹에 병원성 살모넬라 균주를 각 200 μL씩 경구접종 하였다. 즉, B, E 그룹에 *S. Enteritidis*, C, F 그룹에 *S. Typhimurium*, D, G 그룹에 *S. Gallinarum*을 마리 당 최종 공격접종 농도가 각 2×10^9 CFU/0.2 mL이 되게 하였고, 이후 14일간 폐사율을 확인하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 음성대

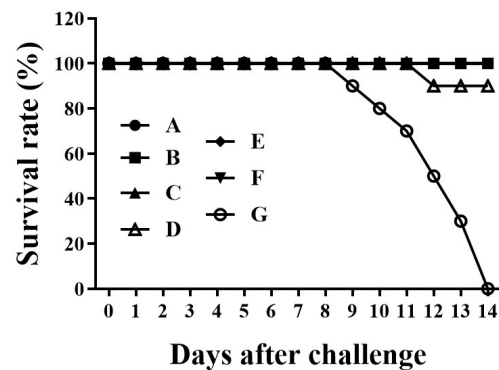


Fig. 4. Survival rates after challenge with wild-type virulent *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, or *S. Gallinarum* in all chickens of group B~G at 6 WPPI. Group A hens were non-immunized; groups B~D hens were immunized with 7×10^8 cells/0.5 mL (*S. Enteritidis* 3×10^8 +*S. Typhimurium* 1×10^8 +*S. Gallinarum* 3×10^8) of the trivalent *Salmonella* inactivated vaccine, respectively; and groups E~G hens were immunized with sterile PBS, respectively. All hens in groups B and E, C and F, and D and G were challenged with *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and *S. Gallinarum*, respectively.

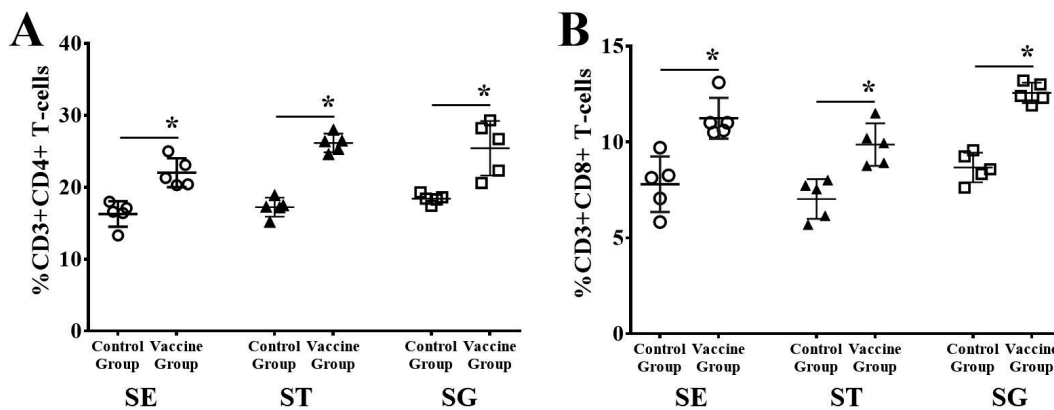


Fig. 3. T-cell immune responses. T-cell responses were evaluated by flow cytometry analysis of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cell populations using PBMC collected two weeks post the boost immunization. Cells were stimulated with *S. Enteritidis* (SE) OMPs, *S. Typhimurium* (ST) OMPs, and *S. Gallinarum* (SG) OMPs, respectively. (A) CD3⁺CD4⁺ T-lymphocytes population in immunized and nonimmunized chickens. (B) CD3⁺CD8⁺ T-lymphocytes population in immunized and non-immunized chickens. Values are shown as mean±standard deviation of 10 chickens per group.

Table 4. Recovery of challenge strain from internal organs of the survived chickens

Group/ Organs	Challenge strain	n**	Direct culture (%)				Enrichment culture (%)			
			Liver	Spleen	Cecum	Cloaca	Liver	Spleen	Cecum	Cloaca
A	-*	10	0	0	0	0	0	0	0	0
B	<i>S. Enteritidis</i>	10	0	5 (50)	1 (10)	2 (20)	0	50 (50)	2 (20)	2 (20)
C	<i>S. Typhimurium</i>	10	0	3 (30)	2 (20)	0	0	40 (4)	30 (3)	3 (30)
D	<i>S. Gallinarum</i>	9	5 (55.6)	5 (55.6)	2 (22.2)	1 (11.1)	6 (66.7)	5 (55.6)	3 (33.3)	1 (11.1)
E	<i>S. Enteritidis</i>	10	0	9 (90)	6 (60)	4 (40)	0	10 (100)	8 (80)	8 (80)
F	<i>S. Typhimurium</i>	10	1 (10)	4 (40)	6 (60)	7 (70)	3 (30)	8 (80)	7 (70)	8 (80)
G	<i>S. Gallinarum</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-

All chickens in groups B and E, C and F, and D and G were orally challenged with 2×10^9 CFU/0.2 mL of *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and *S. Gallinarum*, respectively, at 6 WPPI. All the chickens were euthanized at 14 days after-challenge. Statistical analysis carried out with Mann-Whitney U test. Group A hens were non-immunized; groups B~D hens were immunized with 7×10^8 cells/0.5 mL (*S. Enteritidis* 3×10^8 +*S. Typhimurium* 1×10^8 +*S. Gallinarum* 3×10^8) of the trivalent *Salmonella* inactivated vaccine, respectively; and groups E~G hens were immunized with sterile PBS, respectively.

*Non-challenged.

**This represents the number of chickens that survived to 14 days after challenge and were necropsied.

조균인 A 그룹 및 B, D, E, F 그룹은 10마리 중 10마리 모두 생존하였고, 백신 접종 후 *S. Gallinarum*을 공격접종한 D 그룹의 경우 공격접종 12일 차에 1수 폐사하여 부검일인 14일차까지 9수 모두 생존하였다. 하지만 *S. Gallinarum*을 공격접종 한 G 그룹의 경우 공격접종 9일차에 1마리, 10일차에 1마리, 11일차에 1마리, 12일차에 2마리, 13일차에 2마리, 14일차에 3마리가 각각 폐사하여 10마리 모두 폐사하였다(Fig. 4).

균분리 결과

부검 후 균분리 결과 음성대조균인 A 그룹에서는 직접도말했을 때와 증균배양 했을 때 모두 균분리를 시도한 모든 조직에서 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*이 검출되지 않았다. *S. Enteritidis*를 접종한 그룹인 B, E 그룹의 비장, 맹장, 총배설장에서 *S. Enteritidis*가 분리되었으나 직접도말 했을 때와 증균배양 했을 때 모두 백신접종균인 B 그룹은 PBS 접종균인 E 그룹에 비해 적은 개체에서 *S. Enteritidis*가 분리되었고, 두 경우 모두 간에서는 분리되지 않았다. *S. Typhimurium*을 공격접종한 그룹인 C와 F 그룹의 각 조직에서도 *S. Typhimurium*이 검출되었으나 백신 접종균인 C 그룹에서의 검출 두수가 PBS 접종균인 F그룹에 비해 더 적은 개체에서 균이 분리되었다. *S. Gallinarum*을 공격접종한 PBS 접종균인 G 그룹에서 모든 개체가 폐사하여 균분리가 시도되지 못했고, 백신 접종 그룹인 D 그룹에서는 1마리가 폐사하여 총 9수를 부검하여 균분리를 진행한 결과 간, 비장, 맹장, 총배설장에서 *S. Gallinarum*이 각각 분리되었다(Table 4).

고찰

닭에서 살모넬라균 배출 감소는 계란과 계육에서 살모넬라균 오염을 감소시킬 뿐만 아니라, 이는 살모넬라로 인한 사람 식중독 발생의 감소로 이어질 수 있다(Garmory 등, 2002). 따라서 닭에서 살모넬라 예방을 하기 위해 약독화 생균 백신과 불활화 사균백신이 상용화되어 사용되고 있지만, 일반적으로 살모넬라균은 세포 내 기생세균으로 세포성 면역을 유도할 수 있는 약독화 생균백신이 불활화 백신에 비해 방어 효과가 더 우수하다고 알려져 있다(Desin 등, 2013). 그러나 약독화 생균백신의 안전성에 대한 문제가 주기적으로 제기되고 있어(Kang 등, 2009), 약독화 생균백신을 대체할 불활화 백신에 대한 요구가 증가하고 있는 추세이다. 불활화 백신에 의해 생성되는 항체는 주로 IgG이며, 주로 체액성 면역을 유도한다(Muotiala 등 1989; Gast 등, 1993). 최근 신개념 불활화 사균체가 마우스 및 가금에서 세포성 면역을 유도하여 살모넬라를 효과적으로 예방하였다는 연구 결과 보고(Won 등, 2018; Moon 등, 2020; Senevirathne 등, 2021; Senevirathne 등, 2022)를 접할 수 있었다. 더욱이 불활화 백신은 여러 살모넬라 혈청형을 혼합하여 동시에 여러 혈청형을 동시에 예방할 수 있는 다가백신으로 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다(Clifton-Hadley 등, 2002).

이에 본 연구에서 Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 함유 3가 불활화 사균체 백신으로서의 가능성을 평가하기 위해, Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 불활화 사균체를 오일보조제와 혼합하여 갈색 산란계를 대

상으로 근육 접종하여 면역반응 유도 및 방어효과를 평가하였다. 우선 살모넬라 3가 불활화 사균체 혼합백신을 근육 접종한 후 발열, 설사, 식욕부진, 운동성 저하 및 체중 감소와 폐사 등과 같은 임상 증상을 관찰한 결과, 백신 접종된 산란계에서 통계학적으로 유의미한 체중 저하가 관찰되지 않았고, 다른 임상 증상 또한 관찰되지 않아 살모넬라 3가 불활화 백신의 안전성이 확인되었다. 이 결과는 Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신이 산란계에서 근육으로 접종하는 백신 후보물질로서 안전하게 사용할 수 있음을 보여주는 결과였다.

혈액 내 높은 수준의 체액성 면역반응 유도는 감염된 동물이 세포 내 기생세균의 전신 감염을 방어하는데 매우 중요하다(Mastroeni 등, 2001; Alvarez 등, 2004; Kim 등, 2019; Moon 등, 2020). 이들 혈액 IgG 항체는 옴소닌 작용을 통해 감염된 동물에서 식세포의 작용을 극대화함으로써 혈액으로부터 병원성 세균을 제거하는데 있어 중요한 역할을 수행한다(Mittrücker 등, 2000; Mastroeni 등, 2001; Kim 등, 2019). 따라서 본 연구에서 살모넬라 불활화 3가 백신을 갈색 산란계에 근육접종한 후 채취한 혈청에서 각 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*의 OMPs에 대한 특이 혈청 IgG 항체 역가를 측정하였다. 그 결과 각 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*의 OMPs에 대한 항체 역가는 백신 접종 후 대조군 그룹 A는 접종 전과 비슷한데 반해, 그룹 B~D의 항체 역가는 3WPPI 째에 점차적으로 증가되기 시작하여 6WPPI에는 대조군 그룹 A에 비해 모두 유의성 있는 항체 역가 증가가 관찰되었다($P < 0.05$). 하지만 PBS를 접종한 그룹 E~G의 항체역가는 대조군과 별반 차이가 없었다. 이상의 결과는 Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신을 갈색 산란계에 근육 접종하였을 경우 각 항원의 간섭작용 없이 각 항원별로 면역 항체를 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

세포 내 기생세균인 살모넬라의 완벽한 제거를 위해서는 높은 체액성 면역반응 유도뿐 아니라 세포 매개 면역반응 유도는 반드시 필요하다(Norimatsu 등, 2004; Feng 등, 2005; Roesler 등, 2006; Brumme 등, 2007; Pascual 등, 2002; Hur 등, 2011; Moon 등, 2020). $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-cells는 살모넬라 제거를 위한 획득면역 형성에 특히 중요한 것으로 보고되고 있다(Nauciel 등, 1990; Mittrucker 등, 2000). $CD4^+$ T-cells는 $IFN-\gamma$ 와 $TNF-\alpha$ 와 같은 대식세포 활성화 사이토카인 생산 또는 유도를 통해 살모넬라 감염을 제어하는 것으로 알려져 있다

(McSorley 등, 2000). 또한 $CD4^+$ T-cells는 항체를 생산하는 B-cell을 지원하고 살모넬라 특이 $CD8^+$ T-cells의 생성에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Mittrucker 등, 2000). $CD8^+$ T-cells는 감염된 세포의 용해를 유도함으로써 살모넬라가 식세포나 다른 자연살해세포 등에 노출될 수 있도록 하고, 식세포를 불러 모으고 활성화에 필요한 사이토카인을 생성한다(Stenger 등, 1998; Mittrücker 등, 2002). Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신을 근육 접종한 후 측정된 말초혈액 내 $CD3^+CD4^+$ T-cells과 $CD3^+CD8^+$ T-cells는 대조군에 비해 유의성 있는 유도가 확인되었다. 이상의 결과로 Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 백신을 근육 접종할 경우 불활화 사균체 백신임에도 불구하고 체액성 면역 반응 뿐만 아니라 세포 매개 면역 반응을 유도할 수 있음이 확인되었다.

Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신을 접종한 그룹에서는 병원성 *S. Enteritidis*를 공격접종 했을 때 증균 배양을 통한 균 분리 시 맹장과 총배설장에서 각 20%, 비장에서 50%의 비율로 공격접종 균주인 *S. Enteritidis*가 각각 분리된 반면, PBS를 접종하고 병원성 *S. Enteritidis*로 공격접종 한 경우에는 최소 80%의 비율로 분리되었다. 더불어 병원성 *S. Typhimurium*을 경구로 공격접종 한 경우, 면역화된 그룹에서는 맹장과 총배설장에서 각 30%, 비장에서 40%의 비율로 공격접종 균주가 분리된 반면, PBS를 접종하고 공격접종 한 경우에는 최소 70%의 비율로 분리되었고, 더불어 백신 접종군에서는 분리되지 않았던 간에서도 30%의 개체에서 공격접종 균주가 분리되었다. 또한 병원성 *S. Gallinarum*을 경구로 공격접종 하였을 경우, 면역화된 그룹에서는 공격접종 후 12일째에 1수에서 폐사가 관찰되어 90%의 생존율이 관찰되었지만, PBS를 접종한 그룹에서는 공격접종 7일째부터 식욕 부진 및 운동 실조 등이 관찰되었고, 9일째부터 폐사가 시작되어 14일째 모두 폐사하여 폐사율이 100%로 관찰되었다. 이를 통해 Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신이 각 병원성 살모넬라에 대해 높은 면역 반응을 유도를 통해 높은 방어 효과가 있음을 확인하였다. 하지만 보다 완벽한 방어를 위해서는 각 살모넬라 불활화 사균체의 혼합 비율 및 접종량 변경 그리고 기존 판매되고 있는 SG9R과 연계된 접종 프로그램 최적화 실험 등 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

결론

본 연구는 사람에게서 식중독을 일으키는 주요 원인균인 살모넬라를 예방하기 위해서 살모넬라 3가 불활화 백신을 제조하여 체액성 및 세포성 면역 반응 유도과 공격접종 균주에 대한 방어효과를 평가하였다. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 혈청형을 Chlorhexidine을 이용하여 불활화 시키고 오일보조제와 혼합하여, Chlorhexidine-inactivated *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 3가 백신을 제작하여 산란계에 2회 근육으로 예방 백신을 접종 시킨 결과, 각 항원이 서로 간섭 작용을 하지 않고 체액성 및 세포성 면역반응을 효과적으로 유도함을 확인하였다. 더불어 살모넬라 3가 불활화 백신을 2회 접종 후 각 병원성 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum* 균주로 공격접종 하여 각 균주에 대한 방어 여부를 확인해 본 결과, 각 병원성 균주를 효과적으로 방어하는 것이 확인되었다. 이상의 결과를 종합해 보면, 살모넬라 3가 불활화 백신을 근육접종을 통해 백신접종할 경우 갈색 산란계에서 살모넬라 감염을 효과적으로 방어할 수 있음이 확인되었다. 하지만 공격접종 후 보다 완벽한 예방 효과를 위해서는 각 살모넬라 불활화 사균체의 백신 제조 시 혼합 비율 및 접종량의 조절 그리고 약독화 생균 백신인 SG9R과 연계한 백신 접종 프로그램 최적화 등 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 정부의 재원으로 농림식품기술기획평가원(Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry, IPET)의 지원을 받아 연구되었습니다(No. 122007-2).

CONFLICT OF INTEREST

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

ORCID

Yeong Ju Yu, <https://orcid.org/0000-0002-2860-5023>

Jeong Hee Yu, <https://orcid.org/0000-0003-3232-132X>

Jin Hur, <https://orcid.org/0000-0003-2658-0747>

REFERENCES

- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 42: 1734-1738.
- Barbezange C, Ermel G, Ragimbeau C, Humbert F, Salvat G. 2000. Some safety aspects of *Salmonella* vaccines for poultry: in vivo study of the genetic stability of three *Salmonella* Typhimurium live vaccines. *FEMS Microbiol Lett* 192: 101-106.
- Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Kabbai FZ, Newman JA, Pomeroy BS. 1989. Feasibility of using proteins from *Salmonella* Gallinarum vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens. *Avian Dis* 33: 385-391.
- Brumme S, Arnold T, Sigmarsson H, Lehmann J, Scholz HC, Hardt WD, Roesler U. 2007. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors invC and sseD on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. *Vet Microbiol* 124: 274-285.
- Clifton-Hadley FA, Breslin M, Venables LM, Sprigings KA, Cooles SW, Houghton S, Woodward MJ. 2002. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet Microbiol* 89: 167-179.
- Desin TS, Köster W, Potter AA. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 12: 87-96.
- Feng P, Wilson QM, Meissler Jr, JJ, Adler MW, Eisenstein TK. 2005. Increased sensitivity to *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection in mice undergoing withdrawal from morphine is associated with suppression of interleukin-12. *Infect Immun* 73: 7953-7959.
- Galanis E, Wong DMLF, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit, T, Wegener HC. 2006. Web-

- based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis* 12: 381–388.
- Garmory HS, Brown KA, Titball RW. 2002. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26: 339–353.
- Gast RK, Stone HD, Holt PS. 1993. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. *Avian Dis* 37: 1085–1091.
- Gast RK, Stone, HD, Holt PS, Beard CW. 1992. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 36: 992–9.
- Helms M, Ethelberg S, Mølbak K, DT104 Study Group. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992–2001. *Emerg Infect Dis* 11: 859–67.
- Hur J, Kim MY, Lee JH. 2011. Evaluation of efficacy of a new live *Salmonella* Typhimurium vaccine candidate in a murine model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34: 171–177.
- Jang HJ, Ha YK, YU SN, Kim SY, Um JY, Ha GJ, Kim DS, Lee SY, Ahn SC. 2023. Molecular Epidemiological Analysis of Food Poisoning Caused by *Salmonella* enterica serotype Enteritidis in Gyeongnam Province of Korea. *J Life Sci* 33: 56–63.
- Jawale CV, Lee JH. 2014. A novel approach for the generation of *Salmonella* Gallinarum ghosts and evaluation of their vaccine potential using a prime-booster immunization strategy. *Vaccine* 32: 6776–6782.
- Jawale CV, Lee JH. 2014. An immunogenic *Salmonella* ghost confers protection against internal organ colonization and egg contamination. *Vet Immunol Immunopathol* 15:162(1-2): 41–50.
- Jawale CV, Lee JH. 2014. Comparative evaluation of *Salmonella* Enteritidis ghost vaccines with a commercial vaccine for protection against internal egg contamination with *Salmonella*. *Vaccine* 32: 5925–5930.
- Jawale CV, Lee JH. 2016. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of adjuvanted *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine against salmonellosis in chickens. *Vet Q* 36: 130–136.
- Kang MS, Kwon YK, Jung BY, Kim A, Lee KM, An BK, Chung GS. 2011. Differential identification of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes. *Vet microbiol* 147: 181–185.
- Kang ZW, Jung JH, Kim SH, Lee BK, Lee DY, Kim YJ, Hahn TW. 2009. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. *J Vet Med Sci* 71: 1433–1438.
- Kim S, Chun SG, Lim OY, Park MS, Kang YH, Park YH, Lee BK. 2004. Genomic relationship of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 isolates from Korea and the United States. *J Microbiol* 42: 14–19.
- Kim SH, Kim SH, Chun SG, Choi ES, Lee BK. 2006. Prevalence of *Salmonella* Serovars Isolated from Domestic Residents and Overseas Travelers in Korea, 2004~2005. *J Bacteriol Virol* 36: 69–72.
- Kim SJ, Kim JH, Jun SY, Paik HR, Han JH. 2014. Protective effect of bacteriophages against *Salmonella* Typhimurium infection in weaned piglets. *Korean J Vet Serv* 37: 35–43.
- Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR., Park BY, Hur J. 2019. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. *Can J Vet Res* 83: 68–74.
- Lillehoj EP, Yun CH, Lillehoj HS. 2000. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Anim Health Res Rev* 1: 47–65.
- Mailson ST, Lages DH., Alves VV, Martins NR, Freitas OC. 2022. Assessment of maternal immunity against *Salmonella* enterica serovar Heidelberg in progeny of broiler breeders vaccinated with different formulations of bacterins. *Avian Pathol* 51: 197–205.
- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ,

- Dougan G. 2001. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 161: 132-164.
- McSorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK. 2000. Characterization of CD4⁺ T cell responses during natural infection with *Salmonella* typhimurium. *J Immunol* 164: 986-993.
- Ministry of Food and Drug Safety, Korea. Food safety Korea, Food poisoning statistics. October, 2022.
- Mittrücker HW, Kaufmann SH. 2000. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. *J Leukoc Biol* 67: 457-463.
- Mittrücker HW, Köhler A, Kaufmann SH. 2002. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 70: 199-203.
- Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SH. 2000. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella* Typhimurium infection. *J Immunol* 164: 1648-1652.
- Moon JY, Ochirkhuyag E, Kim WK, Lee JW, Jo YG, Kwak KH, Hur J. 2020. Comparative evaluation to select optimal adjuvant of novel type *Salmonella* Typhimurium inactivated bacteria for protecting *Salmonella* infections in a murine model. *Korean J Vet Serv* 43: 89-97.
- Muotiala A, Hovi, M, Mäkelä PH. 1989. Protective immunity in mouse salmonellosis: comparison of smooth and rough live and killed vaccines. *Microb Pathog* 6: 51-60.
- Nandre RM1, ChaudhariAA, Matsuda K, Lee JH. 2011. Immunogenicity of a *Salmonella* Enteritidis mutant as vaccinecandidate and its protective efficacy against salmonellosis in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 144: 299-311.
- Nauciel C. 1990. Role of CD4⁺ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella* Typhimurium infection. *J Immunol* 145: 1265-1269.
- Nicholas RA, Andrew SJ. 1991. Detection of antibody to *Salmonella* Enteritidis and *S.* Typhimurium in the yolk of hens' eggs. *Vet Rec* 128: 98-100.
- Norimatsu M, Chance V, Dougan G, Howard CJ, Villarreal-Ramos B. 2004. Live *Salmonella* enterica serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) elicit dendritic cell responses that differ from those induced by killed *S.* Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 98: 193-201.
- Pascual DW, Trunkle T, Sura J. 2002. Fimbriated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium abates initial inflammatory responses by macrophages. *Infect Immun* 70: 4273-4281.
- Roesler U, Heller P, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A. 2006. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in the offspring. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53: 224-228.
- Senevirathne A, Hewawaduge C, Lee JH. 2021. Immunization of chicken with flagellin adjuvanted *Salmonella* Enteritidis bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis. *Poult Sci* 100: 101205.
- Senevirathne A, Hewawaduge C, Lee JH. 2022. Immunization of chickens with *Salmonella* Gallinarum ghosts expressing *Salmonella* Enteritidis ^NFliC-FimA^C and CD40L^C fusion antigen enhances cell-mediated immune responses and protects against wild-type challenges with both species. *Dev Comp Immunol* 126: 104265.
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Modlin RL. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-125.
- Won GY, Chaudhari AA, Lee JH. 2016. Protective efficacy and immune responses by homologous prime-booster immunizations of a novel inactivated *Salmonella* Gallinarum vaccine candidate. *Clin Exp Vaccine Res* 5: 148-158.
- Won GY, Eo SK, Park SY, Hur J, Lee JH. 2018. A *Salmonella* Typhi ghost induced by the E gene of phage ϕ X174 stimulates dendritic cells and efficiently ac-

- tivates the adaptive immune response. J Vet Sci 19: 536-542.
- Woo YK, Kim BH. 1998. Comparison of diseases resistance between white and brown layer lines to experimental infection of *Salmonella* Gallinarum. Korean J Vet Res 38: 784-792.
- Yang SY, Hong YH, Lee HJ, Song CS. 2010. Hygienic management for Salmonella-free chicken meat production. Korean J Poul Sci 37: 289-295.