

RS-2022-IP
122007

가
금
에
서
의
예
방
살
모
넬
라
3
가
화

최
종
보
고
서

2023

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004668-01

가금에서의 살모넬라 3가 불활화 예방 백신 고도화

2024년 6월 18일

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단
공동연구기관 / (주)코미팜

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가금에서의 살모넬라 3가 불활화 예방 백신 고도화”(개발기간 : 2022. 4. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

남본일자 2024.06.18.

주관연구기관명 : 전북대학교산학협력단 (대표자) 손정민
공동연구기관명 : ㈜코미팜 (대표자) 문성철
위탁연구기관명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 허 진
공동연구책임자 : 한장혁
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술고도화사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)		개발성과 현장보급 기술				연구개발과제번호	RS-2022-IP122007
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	45%	LB0702	40%	LB0701	15%
	농림식품 과학기술분류	RB21	45%	RB22	35%	RB23	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		가금에서의 살모넬라 3가 불활화 예방 백신 고도화 (Advance of trivalent vaccine to prevent salmonellosis in poultry)					
전체 연구개발기간		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1년 9개월)					
총 연구개발비		총 875,000천원 (정부지원연구개발비: 700,000천원, 기관부담연구개발비 : 175,000천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[<input checked="" type="checkbox"/>] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준(5) 종료시점 목표(8)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	주요 세균성 인수공통감염병의 원인인 기금에서의 살모넬라종을 근절하기 위한 신개념 살모넬라 3가(살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸) 불활화 사균체 백신 기술 고도화					
	전체 내용	<p>○ 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 제작 및 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 뉴노멀 불활화 <i>Salmonella Gallinarum</i>, <i>S. Enteritidis</i>, <i>S. Typhimurium</i> 사균체가 함유된 오일기반 면역보강제가 함유된 살모넬라 3가 불활화 사균체 오일 백신 시제품 제작 - 최적의 항원 함량을 결정하기 위해 다양한 항원 함량으로 제조된 시제품으로 산란계에 근육 접종 후 야외 병원성 살모넬라 갈리나룸, 엔터라이티디스, 타이피리움 혼합균주로 도전감염에 따른 방어 여부로 최적의 각 살모넬라 사균체 항원 함량 결정 - 대조군으로 포르말린 불활화 살모넬라 3가 사균체 시제품은 위에서 제조된 최고 함량 농도 시제품과 동일 함량으로 제작 후 위와 동일한 방법으로 비교 평가 수행 <p>○ 연속 3 Lot 시험 백신 제조 및 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최종 결정된 항원 함량이 함유된 임상 시험 신청을 위한 연속 3 lot 시험 백신 제조 - 연속 3 lot 시험 백신에 대한 일반적인 독성 평가 - 연속 3lot 시험 백신에 대한 닭을 대상으로 근육 접종 후 백신의 안전성 평가 - 연속 3 lot 시험 백신을 산란계를 대상으로 근육 접종 후 야외 독성 살모넬라 균주로 도전감염에 대한 방어 효능 평가 <p>○ 살모넬라 3가 불활화 백신의 검정법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 백신 완제품에 대한 각 batch 별 품질검사를 위한 마우스에서의 품질 검사법 가능성 평가 					
		- 마우스에서 백신 근육 접종 후 항체 역가 비교 내지는 도전감염 후 방어 여부에 따른 백신의 품질 검사법 가능성 평가					

		<p>및 확립</p> <p>○ 임상시험 신청 및 보완사항 대응</p> <ul style="list-style-type: none"> - 야외 임상시험 수행을 위한 임상시험계획서 작성 및 제출 - 농림축산검역본부의 기술검토 의견에 따른 보완사항 대응 <p>○ 3개 농장 야외 임상 시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험백신 품목 허가를 위한 야외 임상시험 허가 후 3개의 닭 농장을 대상으로 야외 임상시험 수행 - 백신 접종 군과 백신 미접종군에서의 살모넬라병 발생 양상 비교 <p>○ 백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제조된 시험 백신의 품목 허가 사항 중 유효기간 설정을 위해 제조된 시험 백신의 정기적인 안정성 평가 <p>○ 시판 백신과의 효능 비교 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 목적동물인 산란계를 대상으로 현재 판매되고 있는 약독화 생균 백신은 표하접종 그리고 제작된 시험백신은 근육접종 후 야외 독성 균주로 도전감염 후 도전감염 균주에 대한 방어 여부로 시판 백신과 시험 백신의 효능 비교 평가 <p>○ 품목 허가 신청</p> <ul style="list-style-type: none"> - 백신의 유효기간 자료, 3개 농장 야외 임상시험 결과 취합하여 제조품목허가 취득을 위한 허가서류 작성 및 제출 - 농림축산검역본부의 기술검토 의견에 따른 보완사항 대응 <p>○ 수출용 허가 취득 및 해외수출</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신개념 3가 살모넬라 불활화 백신의 수출을 위한 수출용 허가 취득 - 수출용 백신 허가 후 판매증진을 위한 현지 농장 확대 임상 시험 실시 <p>○ 백신 접종 프로그램 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 판매되고 있는 약독화 생균 백신과의 혼합 사용 여부 결정을 위한 백신 혼합 사용 결정 시험 - 시판 약독화 생균 백신만을 접종한 군, 시판 약독화 생균 백신 접종 후 추가 백신으로 시험 백신 접종군, 시험 백신 2회 접종 군을 각기 추천하는 방법에 따라 백신은 접종 한후 항체 지속 기간 및 치종 백신 접종 후 일정 기간이 지난 후에 야외 독성 균주에 대한 방어 여부로 백신 프로그램 결정
--	--	--

	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신제품	
	예상성과 (N/Y)	Y	N	Y	N	Y	N	N	생명 정보	생물 자원	정보	실물

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	(2) 연구개발 결과의 활용계획
	<ul style="list-style-type: none"> - 가금에서 주요 세균성 인수공통감염병 원인균인 살모넬라 엔터라이티디스, 타이피리움 및 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸에 의한 살모넬라병을 가금에서 미연에 차단할 수 있는 제품의 기술 고도화를 통해 해외 수출을 통해국내 사업화 촉진 - 뉴노멀 형식의 백신 개발로 인한 수출 효과 기대 - 새로운 형태의 백신 개발을 통한 인수공통감염병인 세포내 기생 세균인 살모넬라병을 가금에서 근절함으로써 인체로의 살모넬라병 미연의 차단 효과를 통한 안전한 먹거리 제공
	(3) 연구개발 결과의 기대효과
	<ul style="list-style-type: none"> • 기술적 기대성과

	<ul style="list-style-type: none"> - 뉴노멀 사균체 백신 제조 기술 확립을 통해 인수공통감염병인 살모넬라 엔테라이티디스, 살모넬라 타이피유리움 및 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸을 동시에 예방 가능한 3가 맞춤형 백신개발이 가능 - 세포 내 기생 세균 예방을 위한 약독화 생균백신과 비슷한 유효성을 갖춘 뉴노멀 사균체 백신 제조 기술 확보 - 세포내 기생 세균 예방이 탁월한 뉴노멀 사균체 백신 제조기술 구축을 통한 안전하면서 백신의 제조 생산 원가 절감효과 극대화 <ul style="list-style-type: none"> • 경제 산업적 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> - 제품의 산업화를 통한 살모넬라병 예방 3가 백신 수출 기대 - 뉴노멀 사균체 백신 제조 기술 확립을 통한 저렴하면서 안전한 생균백신 같은 세포 내 기생 세균에 유효한 사균 백신 제조 기술 구축에 따른 국가 경쟁력 향상 - 가금에서 백신 접종에 따른 세균성 인수공통감염병인 살모넬라병 근절에 따른 인체로의 감염 기회 축소로 인해 농가피해 및 국민 안전한 먹거리 제공 기여 효과 - 가금 티푸스 약독화 생균 백신 수입 대체 효과
--	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비		기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
				Y	N				생명 정보	생물 자원		정보	실물
	Y	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	3가 백신		살모넬라병		품목허가 신청		야외 임상시험		수출				
영문핵심어 (5개 이내)	Ttrivalent vaccine		Salmonellosis		Item license application		Clinical trial in chickens farms		Export				

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	9
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	61
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	108
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	109
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	110
별첨 자료 (참고 문헌 등)	111

최종보고서						보안등급		
						일반 <input checked="" type="checkbox"/> , 보안 <input type="checkbox"/>		
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명			
전문기관명 (해당 시 작성)	IPET			내역사업명 (해당 시 작성)	개발성과 향상보급기술			
공고번호	농축 제2022-17호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
				연구개발과제번호	RS-2022-IP122007			
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	45%	LB0702	40%	LB0701	15%	
	농림식품과학기술분류	RB21	45%	RB22	35%	RB23	20%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문							
		영문						
연구개발과제명	국문		기금에서의 실모넬라 3가 불활화 예방 백신 고도화					
		영문		Advance of trivalent vaccine to prevent salmonellosis in poultry				
주관연구개발기관	기관명	전북대학교 산학협력단		사업자등록번호	402-82-15272			
	주소	(54896) 전북 전주시 덕진구 덕진대로 567		법인등록번호	210171-0005625			
연구책임자	성명	허진		직위	교수			
	연락처	직장전화			휴대전화			
		전자우편		국가연구자번호				
연구개발기간	전체		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31. (21개월)					
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2022. 04. 01. - 2022. 12. 31. (9개월)					
			2023. 01. 01. - 2023. 12. 31. (12개월)					
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금	
	현금	현금	현물	현금	현물	현금		현물
총계	700,000	10,000	145,000			710,000	155,000	
1단계	1년차	300,000	0	75,000			300,000	75,000
	2년차	400,000	10,000	90,000			410,000	90,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		
공동연구개발기관	㈜코미팜	한장혁	상무		dr9924@komiopharm.com	수요	중소기업	
위탁연구개발기관								
연구개발기관 외 기관								
연구개발담당자 실무담당자	성명	유영주		직위	박사과정			
	연락처	직장전화			휴대전화			
		전자우편		국가연구자번호				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 6월 18일

연구책임자: 허진

주관연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단

공동연구개발기관의 장: ㈜코미팜

위탁연구개발기관의 장:



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

1. 연구개발과제의 개요

○ 사람의 주요 세균성 식중독의 원인체인 살모넬라균은 거의 모든 곳에 분포되어 있고, 현재까지 약 2,500여종 이상의 혈청형이 보고되고 있으며, 자연계에서 보고된 살모넬라균 중 절반 이상이 가금에서 분리되고 있음.

○ 따라서 살모넬라의 보균동물로서 가금의 역할이 매우 중요함. 특히 살모넬라균 증 사람에서 문제가 되는 혈청형은 나라마다 차이가 있으나 국내뿐 아니라 유럽 및 미국 등지에서는 주로 살모넬라 엔테라이티디스 및 살모넬라 타이피뮤리움의 문제가 되고 있음.

○ 주요 세균성 인수공통감염병 원인균인 살모넬라 엔테라이티디스 및 살모넬라 타이피뮤리움에 의한 살모넬라증은 정작 가금에서는 폐사와 같은 임상증상 없이 불현성 감염인 경우가 많아, 보균동물로서 사람으로의 감염 기회가 증가하고 있음

○ 특히, 최근 지구 온난화로 인해 고온 다습한 환경이 장기간 지속되어 가금에서 이들 살모넬라균주에 감염된 불현성 살란계로부터 계란 등을 오염시켜 사람에서 집단 식중독을 일으키는 일이 최근 증가하고 있는 추세임

○ 2018년 전국을 강타하여 2,207명을 감염시켰던 살모넬라 톰슨 (*Salmonella* Thompson), 2021년 김밥집 집단 식중독 원인균이었던 살모넬라 엔테라이티디스 (*S. Enteritidis*)처럼 가금에서는 가금 티푸스를 야기시켜 가금을 폐사에 이르게 하는 원인균인 살모넬라 갈리나룸 (*S. Gallinarum*)을 제외하고는 많은 살모넬라균들이 불현성 감염을 유지한 채 보균 동물로서 계란 등으로 배출하여 사람에게서 식중독을 일으키는 경우가 많음

○ 또한 가금에서는 많은 살모넬라균은 세포 내 기생세균으로 전통적인 불활화 백신 제조 기술로 제조된 사균체 백신으로는 살모넬라균 방어 효과가 현저히 떨어짐

○ 국내 양계산업에 있어서 가금티푸스에 의한 높은 폐사률로 인해 이를 예방하기 위해 1960년부터 사용되어 오고 있는 약독화 살모넬라 갈리나룸 약독화 생균 백신이 사용되어 오고 있을뿐 그 외 살모넬라균에 대한 백신을 접종하지 않고 있음

○ 현재 국내에서는 유전자 조작 기술을 활용한 살모넬라 갈리나룸 외 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 엔테라이티디스 약독화 생균 백신 그리고 방사선 기술을 이용한 약독화 살모넬라 타이피뮤리움 약독화 백신과 역시 유전자 조작기술에 바탕으로 한 살모넬라 타이피뮤리움 및 엔테라이티디스 고스트 백신이 연구 개발되어 있으나 현재 국내에서는 유전자 조작 백신에 대한 인허가 절차가 문제가 되고 있어 현재 상용화되지 못하고 있는 상황임

○ 더불어 살모넬라 타이피뮤리움이나 엔테라이티디스 고스트 백신 역시 해당 균주의 유전자를 조작하여 일단 영양 요구주로 제조 후 E-lysis 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환시켜 안에서 균을 윤균시키는 과정을 거쳐 고스트를 유도함. 하지만 구조적인 문제로 인해 완벽한 고스트를 유도하지 못하는 불완전 불활화가 유도 되고 있음.

○ 국내에서는 살모넬라 타이피뮤리움과 살모넬라 엔테라이티디스 및 살모넬라 갈리나룸을 동시에 예방할 수 있는 3가 백신이 시판되지 않아 계란 등으로 살모넬라균이 오염되는 경우가 많아 사람에게서 식중독을 야기하는 경우가 증가하고 있는바, 발병 후 항생제 투여로는 치료시기를 놓치는 경우가 많음. 또한 다제 내성 살모넬라균의 출현이 높아 유효한 예방법이나 치료법 개발이 절실히 요구되고 있음.

○ 본 연구에서는 가금을 대상으로 주요 인수공통전염병 원인균인 살모넬라 엔테라이티디스 및 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸을 동시에 예방하기 위한 뉴노멀 불활화 사균체 제조 기술을 활용한 3가 백신을 개발하여 산란계에 근육 접종함으로써 산란계에서 살모넬라병을 예방하여 사람으로의 감염을 미연에 차단하고자 함 더불어 수출용 백신 허가를 신청하여 허가 후 해외에 수출을 통한 외화 획득함과 동시에 국내에서의 산업화를 위한 야외 임상

시험을 신청하여 3개의 양계를 대상으로 임상 시험을 수행하고자 함.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

<1차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(전북대학교 산학협력단) : 살모넬라 3가 불활화 백신 평가 및 검정법 확립
- 협동연구기관((주) 코미팜) : 살모넬라 3가 불활화 시험 백신 제작 및 임상시험 신청

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(전북대학교 산학협력단) : 살모넬라 3가 불활화 백신 평가 및 검정법 확립

A. 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 안전성 및 유효성 평가

(1) (주) 코미팜에서 제조된 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸 함유 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 안전성 평가

가. 연구개발과제의 수행과정

a. 살모넬라 3가 오일 백신 갈색 산란계에 근육으로 2회 접종

- 1) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용함
- 2) 백신접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs나 LPS에 음성인 닭만을 실험에 사용. 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 1에 서술되어 있는 그룹별 불활화 사균체 수가 되도록 (주)코미팜에서 제조된 살모넬라 3가 불활화 오일 백신을 0.5ml 씩 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종함 (그림 1)

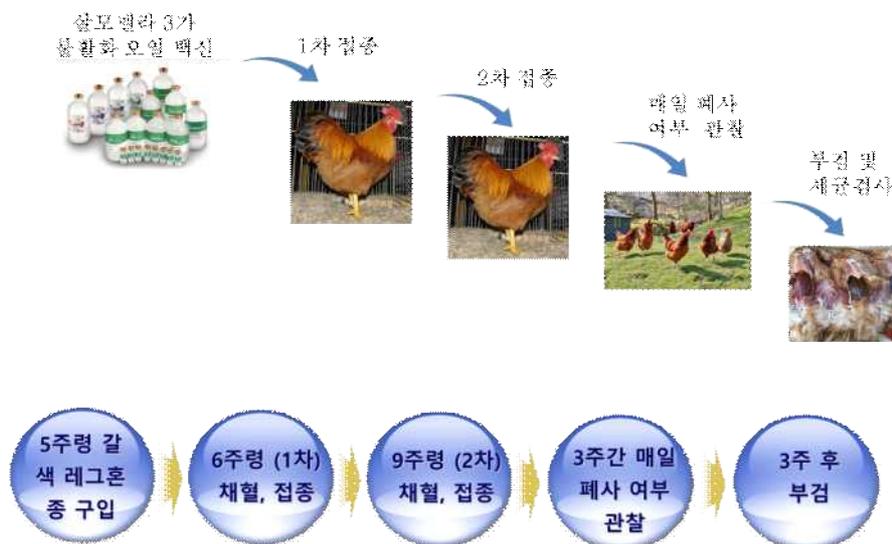


그림 1. 닭에서 살모넬라 3가 불활화 오일 백신의 안전성 평가의 실험 개요

표 1. 갈색레그혼종을 대상으로 한 살모넬라 3가 불활화 오일 백신의 안전성 평가 시험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	부검 (12주령)
A	PBS	PBS	백신 접종 후 3주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 2차 접종 3주 후에 모든 가금을 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 백신 접종 부위 관찰
B	3×10^{10} cells 포르말린 불활화 살모넬라 3가 백신	3×10^{10} cells 포르말린 불활화 살모넬라 3가 백신	
C	3×10^{10} cells 살모넬라 3가 백신	-	
D	3×10^8 cells 살모넬라 3가 백신	3×10^8 cells 살모넬라 3가 백신	
E	3×10^9 cells 살모넬라 3가 백신	3×10^9 cells 살모넬라 3가 백신	
F	3×10^{10} cells 살모넬라 3가 백신	3×10^{10} cells 살모넬라 3가 백신	

b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인

- 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전 (3 WPPI), 2차 접종 후 3주 (6 WPPI) 째에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리
- 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs 또는 LPS를 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정

c. 2차 예방접종 후 3주간 안전성 평가 및 3주째에 부검을 통해 백신 접종 부위 및 각 장기에서의 이상 증상 여부 확인

- 2차 예방접종 후 3주간 매일 하루에 두 번씩 닭의 이상 (체온 상승, 침울, 운동 실조, 사료 섭취를 저하, 설사, 폐사 등) 유무 확인
- 2차 예방접종 후 3주째에 생존 한 모든 갈색레그혼종의 체중을 측정하고 희생시켜 백신 접종 부위에서의 염증 반응 및 이상 증상 유무 육안적 소견 검사
- 육안적으로 이상이 발견되면 조직병리학적 소견 검사

나. 수행내용

a. 살모넬라 3가 오일 백신의 접종

5주령 갈색레그혼종을 구입하여 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs나 LPS에 음성인 닭만을 실험에 사용. 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 1에 서술되어 있는 그룹별 불활화 사균체 수가 되도록 (주)코미팜에서 제조된 살모넬라 3가 불활화 오일 백신을 0.5ml 씩 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종함 (그림 1)

b. 백신접종 후 정기적으로 채혈하여 면역항체 유도 여부 확인

- 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전 (3 WPPI), 2차 접종 후 3주 (6 WPPI) 째에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 분리한 혈청을 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정

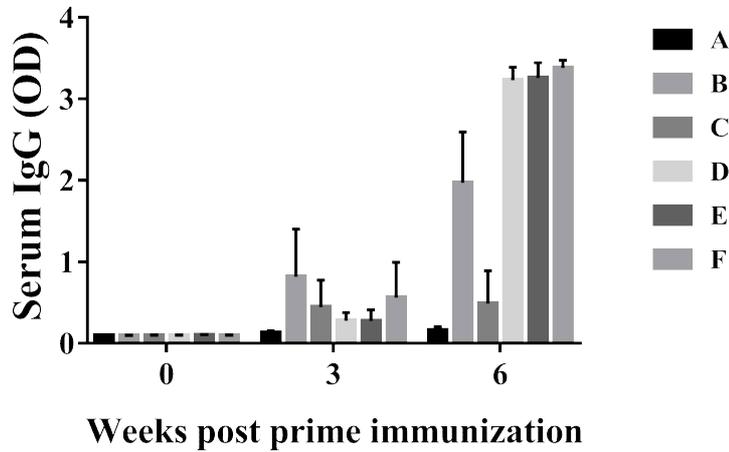


그림 6. ELISA kit를 이용한 면역항체 유도 여부 확인

2) ELISA kit를 이용하여 면역 항체 유도 여부를 확인한 결과 음성대조군인 A그룹에서는 항체역가의 변화가 일어나지 않았고, 포르말린 백신을 접종한 B그룹의 경우 1차 백신 접종했을 때보다 2차 접종 후의 항체 역가가 유의미하게 증가함. 시험백신인 살모넬라 3가 백신을 1회만 접종하는 C그룹의 경우 3 WPPI와 6 WPPI의 항체역가에 유의미한 변화가 관찰되지 않음. 살모넬라 3가백신을 10^8 , 10^9 , 10^{10} 의 농도로 접종한 D, E, F 그룹의 경우 0 WPPI에 비해 3 WPPI에 항체역가가 증가하였고, 6 WPPI에는 항체역가가 큰 폭으로 증가하였음을 확인할 수 있었음.

c. 안전성 평가 및 부검을 통한 이상증상 여부 확인

- 1) 2차 예방접종 후 3주간 매일 하루에 두 번씩 닭의 이상 (체온 상승, 침울, 운동 실조, 사료 섭취를 저하, 설사, 폐사 등) 유무를 확인한 결과 임상증상이 관찰되지 않았음.
- 2) 모든 개체의 체중을 측정된 결과 음성대조군인 A그룹에 비해 백신군인 B, C, D, E, F그룹의 체중이 약간 낮게 측정되었으나 유의미한 차이는 관찰되지 않음. 2차 예방접종 후 3주째에 생존한 모든 갈색레그혼종을 희생시켜 백신 접종 부위에서의 염증 반응 및 이상 증상 유무 육안적 소견 검사결과 음성대조군인 A그룹에 비해 고농도의 살모넬라 3가 백신을 접종한 C 그룹과 E, F 그룹의 일부개체에서 약한 염증반응이 관찰되었으나 시간이 지남에 따라 점차 회복되어 지고 있는 것으로 보임.

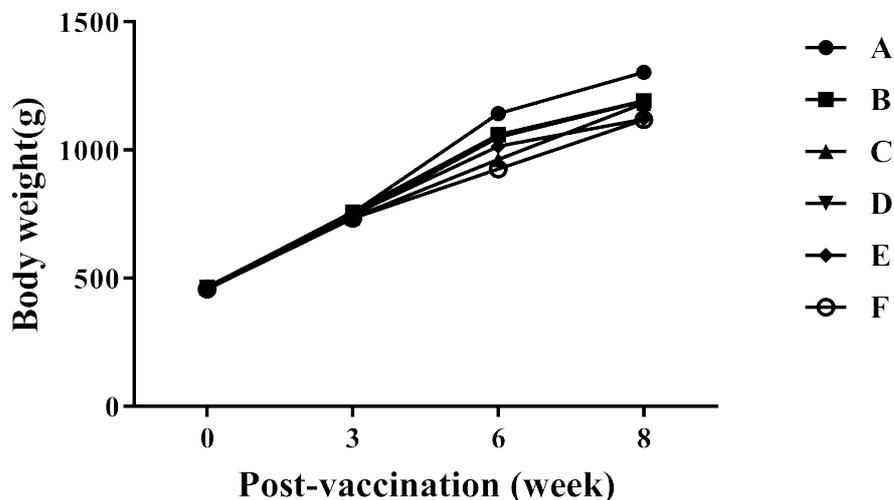


그림 7. 0, 3, 6, 8 WPPI에 측정된 각 그룹별 체중



그림 4. 백신 접종부위의 염증반응

3) 육안적으로 이상이 발견되지 않아 조직병리학적 소견 검사를 진행하지 않았음.

(2) ㈜코미팜에서 제조된 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 함유 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 유효성 평가

가. 연구개발과제의 수행과정

a. ㈜코미팜에서 제조한 살모넬라 3가 불활화 오일 백신을 닭에 근육으로 2회 접종 (그림 5, 표 2)

1) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용

2) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs나 LPS에 음성인 닭만을 실험에 사용 [또는 AccuPower® Bacterial Poultry 3-Plex PCR Kit (Bioneer, South Korea)에서 살모넬라 음성인 닭을 실험에 사용]. 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 2에 서술되어 있는 대로 근육 내로 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종

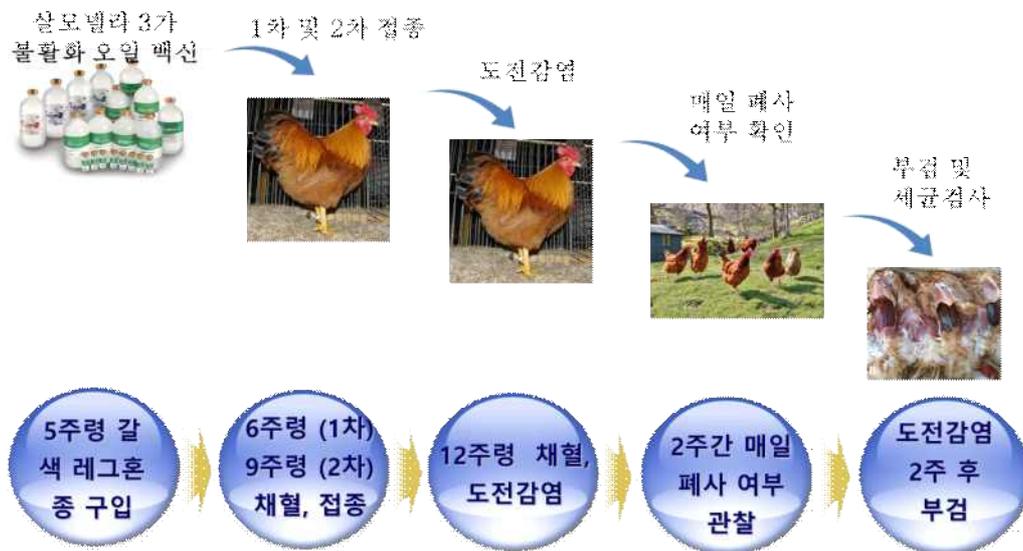


그림 5. 닭에서 살모넬라 3가 불활화 오일 백신의 효능 평가의 실험 개요

표 2. 갈색레그혼종을 대상으로 한 살모넬라 3가 불활화 오일 백신의 1회 및 2회 근육 접종 후 효능 평가 시험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	도전감염 (12주령)	부검 (14 주령)
A	-	-	-	도전감염 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 도전감염 2주 후에 생존한 모든 가금을 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 각 조직에서의 균 분리
B	PBS	PBS	야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주 경구 접종	
C	3 × 10 ¹⁰ cells 포르말린 불활화 살모넬라 3가 백신	3 × 10 ¹⁰ cells 포르말린 불활화 살모넬라 3가 백신		
D	3 × 10 ⁸ cells 살모넬라 3가 백신	-		
E	3 × 10 ⁹ cells 살모넬라 3가 백신	-		
F	3 × 10 ¹⁰ cells 살모넬라 3가 백신	-		
G	3 × 10 ⁸ cells 살모넬라 3가 백신	3 × 10 ⁸ cells 살모넬라 3가 백신		
H	3 × 10 ⁹ cells 살모넬라 3가 백신	3 × 10 ⁹ cells 살모넬라 3가 백신		
I	3 × 10 ¹⁰ cells 살모넬라 3가 백신	3 × 10 ¹⁰ cells 살모넬라 3가 백신		

b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인

1) 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(3 WPPI), 도전감염 전(6 WPPI) 그리고 부검 전(8 WPPI)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리

2) 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs 또는 LPS를 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정

c. 2차 접종 후 10일 째에 혈액 또는 비장 세포로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 등 측정

1) 2차 접종 후 10일째에 각 그룹에서 5마리씩 채혈하고 닭의 비장을 채취하기 위해 희생하고, 비장들은 무균적으로 채취

2) 혈액 및 비장은 이전의 연구 Hur 등 (Hur et al., 2016)에서 기술된 방법에 따라 준비.

① 즉, 각 그룹별로 5마리의 닭을 마지막 예방 접종 후 10일 째에 각각 무균적으로 spleen을 채취하여 RPMI 1640에 모음.

② 그다음 0.8% 염화 암모늄 (ammonium chloride) (w/v)를 이용하여 적혈구 용해, 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척.

③ 마지막 원심 후 complete medium (100IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin 및 10% FCS을 포함하는 RPMI 1640)으로 재 부유.

④ 배양을 위한 세포 수를 계산하여 각 살모넬라 OMPs로 12시간 반응

⑤ 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 상층액을 -80°C에 보관하며 ELISA로 사이토카인 농도 측

정. 또는 형광물질이 부착된 CD3, CD4, CD8 단클론 항체를 이용하여 FACs로 CD3⁺CD4⁺ T-cells과 CD3⁺CD4⁺ T-cells의 분포 비교 분석.

d. 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종

1) 2차 접종 후 3주 째에 야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 각각 동 균수로 혼합하여 경구 접종

e. 도전감염 후 2주간 폐사 여부 확인 및 생존 닭으로부터 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총 배설강)에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외 독성 균주분리 및 동정

1) 2차 접종 후 3주 째에 야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 혼합하여 도전감염한 경우

① 2주간 하루에 두 번 씩 폐사 여부 확인

② 2주 후 부검을 통해 육안적 소견 관찰, 육안적 소견에서 이상 증후가 관찰된 조직에 대해 조직학적 소견 관찰

③ 2주 후 생존한 모든 가금을 희생시켜 비장, 간, 맹장 등에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 균 분리 및 균주별 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 최종 확인 (표 3)

표 3. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 별 특이 프라이머 및 PCR 증폭 산물 크기

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ENTF	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG	304
	ENTR	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>ratA</i> ROD F	ATT GCT CTC GTC CTG GGT AC	571
	<i>ratA</i> ROD R	TAC CGA TAC GCC CAA CTA CC	

나. 수행내용

a. 살모넬라 3가 오일 백신의 접종

5주령 갈색레그혼종을 구입하여 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs나 LPS에 음성인 닭만을 실험에 사용 [또는 AccuPower® Bacterial Poultry 3-Plex PCR Kit (Bioneer, South Korea)에서 살모넬라 음성인 닭을 실험에 사용]. 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 2에 서술되어 있는 대로 근육 내로 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종하였음.

b. 백신접종 후 정기적으로 채혈하여 면역항체 유도 여부 확인

1) 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(3 WPPI), 도전감염 전

(6 WPP1) 그리고 부검 전(8 WPP1)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청을 분리하고 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정결과 음성대조군인 A그룹을 제외한 백신 접종군에서 접종전인 0 WPP1에 비해 1차 접종 후인 3 WPP1에 항체역가가 소폭 상승하였고, 그 중 포르말린 백신을 접종한 C 그룹에서 유의미한 항체역가의 상승이 관찰되었음. 2차 접종후인 6WPP1에는 포르말린 접종군인 C 그룹의 항체역가 상승 뿐만 아니라 살모넬라 3가백신을 2차 접종한 G, H, I 그룹에서 유의미한 항체역가의 증가가 관찰되었고, 포르말린 백신 접종군인 C 그룹과 약 1.6배 정도의 역가 차이를 확인 할 수 있었음. 그러나 1차 접종시에만 접종한 살모넬라 3가백신 1회 접종군인 D, E, F 그룹의 경우 3WPP1와 유의미한 항체역가의 차이가 관찰되지 않았음.

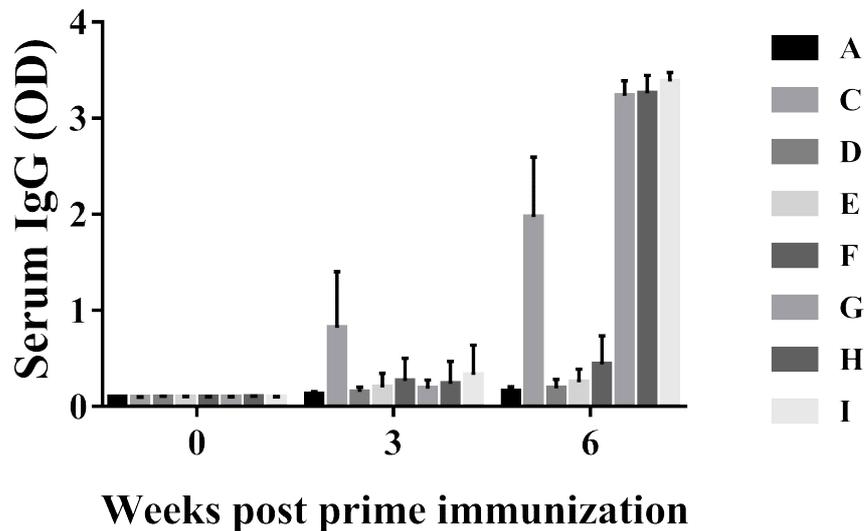


그림 6. ELISA를 이용한 각 그룹의 면역 항체 유도 여부 확인

c. 2차 접종 후 10일 째에 혈액 또는 비장 세포로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 등 측정

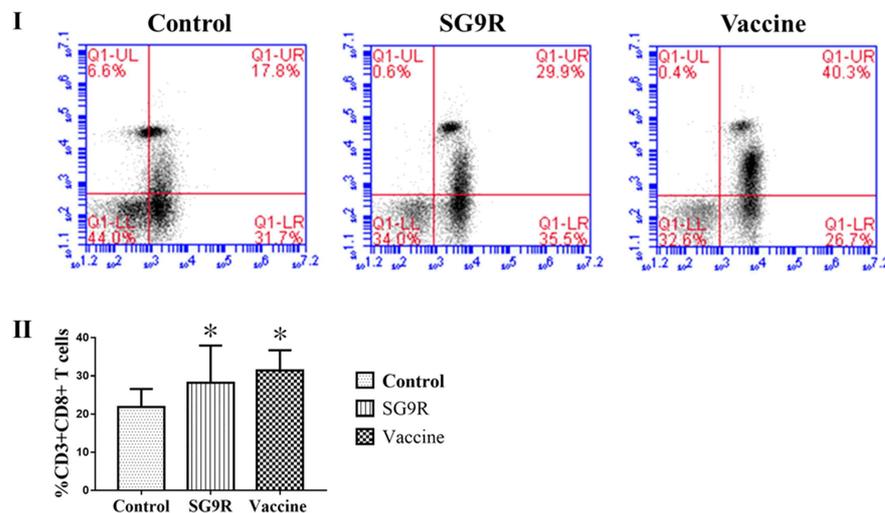


그림 7. 말초혈액에서의 CD3⁺CD8⁺ 측정 결과

1) 2차 접종 후 10일째에 각 그룹에서 5마리씩 무작위로 지정하여 말초혈액을 채혈하고 lymphocytes를 분리한 후 *Salmonella Gallinarum* OMPs로 반응 시킨 후 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺를 측정하여 본 결과 그림 5에서 보는 바와 같이 현재 시판되고 있는 약독화 생균 백신과 유사한

결과가 관찰되어 시험백신인 살모넬라 3가 백신을 접종하여도 약독화 생균 백신과 유사한 세 포성 면역 반응을 유도함을 확인할 수 있었음.

d. 야외 병원성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피유리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종 한 결과 공격 접종 후 3일차에 CHX 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^{10}/0.2\text{ml}$ 을 1번 접종한 F그룹에서 1수 폐사 발생하였으며, 4일차에 CHX 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^{10}/0.2\text{ml}$ 을 2번 접종한 I그룹에서 1수 폐사하였음. 공격접종 일주일 후인 8일차부터 Positive 그룹인 B그룹에서 1수 폐사하기 시작하였으며, 9일차에 같은 그룹에서 2수, 포르말린 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^{10}/0.2\text{ml}$ 을 접종한 C그룹에서 2수, CHX 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^9/0.2\text{ml}$ 을 1번 접종 E 그룹에서 1수, F그룹에서 1수 폐사하였고, 10일차에 B그룹에서 3수, 포르말린 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^{10}/0.2\text{ml}$ 을 접종한 C그룹에서 1수, CHX 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^9/0.2\text{ml}$ 을 1번 접종 D 그룹에서 2수, E그룹에서 2수 폐사하고, 11일차에 B그룹에서 2수, 포르말린 살모넬라 3가 백신 $3 \times 10^{10}/0.2\text{ml}$ 을 접종한 C그룹에서 1수, D그룹에서 3수, F그룹에서 1수, I그룹에서 1수 폐사하였 음. 12일차에는 C그룹에서 1수, E그룹과 F그룹에서 각각 1수씩 폐사하였고, 13일차에는 B, D, E, F, G그룹에서 각각 1수씩 폐사하였고, C그룹에서 2수 폐사하였다. 14일차인 부검 당일에 양성 대조군인 B 그룹에서 마지막 1수가 폐사하여 생존율이 0%로 확인되었음. CHX 살모넬라 3가 백신 을 $3 \times 10^9/0.2\text{ml}$ 의 농도로 2번 접종한 H그룹에서는 모든 개체가 생존하여, 부검 당일 생존 개 체는 A~I그룹에서 각각 10, 0, 7, 4, 5, 5, 9, 10, 8수 씩이며, 생존한 모든 개체는 썩시팜 (Suxamethonium chloride hydrate, KP)으로 안락사 시켜 부검 진행하였음(표 4, 그림 8).

표 4. 공격접종 후 14일간 폐사 기록

그룹	공격접종	D+1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
B	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	7	4	2	2	1	0
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	7	6	5	3	3
D	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	5	4	4	4
E	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	7	7	6	5	5
F	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	7	6	5	5
G	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9
H	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
I	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8



그림 8. 공격접종 후 생존율 그래프

e. 도전감염 후 2주간 폐사 여부 확인 및 생존 닭으로부터 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총배설강)에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외독성 균주분리 및 동정 결과 음성대조군인 A 그룹에서는 모든 개체에서 살모넬라가 분리되지 않았으며, 부검 당일 모든 개체가 폐사한 양성대조군의 경우 가금티푸스(SG)로 인한 폐사가 확인됨. C그룹의 경우 총 7수가 생존하였고, 1수에서 비장에서 SE가 검출되었고, 5수에서 각 간과 비장에서 SG가 검출되었으며, 총 4수가 생존한 D그룹에서는 비장에서 SE가 검출된 개체가 4수, SG가 검출된 개체가 1수이며, E그룹은 총 5수가 생존하였고 비장에서 SE가 검출된 개체가 1수, SG가 검출된 개체가 3수이고, 간에서 SE가 검출된 개체가 2수, SG가 검출된 개체가 2수, 총배설강에서 SE가 검출된 개체가 1수, SG가 검출된 개체가 1수이며, F그룹은 총 5수가 생존하여 비장에서 SE가 검출된 개체가 2수, SG가 검출된 개체가 2수, 간에서 SE가 검출된 개체가 2수, SG가 검출된 개체가 2수, 총배설강에서 SG가 3수에서 검출되었음. G그룹은 총 9수가 생존하였으며, 비장에서는 8수에서 SG가 검출되었고, 간에서는 균이 검출되지 않았으며, 총배설강에서는 SE, SG 각 1수씩 검출되었음. H그룹은 10마리 모두 생존하였으며 8수의 비장에서 SG가 검출되었으며, 간에서는 SE가 검출된 개체가 1수, SG가 검출된 개체가 8수 였고, 총배설강에서는 균이 검출되지 않았음. I그룹은 총 8마리가 생존했으며 비장에서 SG가 검출된 개체가 7수, 간에서 SE가 검출된 개체가 3수, 총배설강에서는 SE가 검출된 개체가 1수, SG가 검출된 개체가 1수로, 모든 그룹에서 SE 혹은 SG가 검출되었으며, ST는 검출되지 않았음(표 5).

표 5. 부검 후 각 조직에서 분리된 살모넬라 검출 결과

(단위: %(수))

Group	n	SE			SG			ST		
		Liver	Spleen	Cloaca	Liver	Spleen	Cloaca	Liver	Spleen	Cloaca
A Negative Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B Positive Control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 포르말린 * 2	7	0	14(1)	0	71(5)	71(5)	0	0	0	0
D $3 \times 10^8 / 0.2ml * 1$	4	0	100(4)	0	25(1)	25(1)	0	0	0	0
E $3 \times 10^9 / 0.2ml * 1$	5	40(2)	20(1)	20(1)	40(2)	60(3)	20(1)	0	0	0
F $3 \times 10^{10} / 0.2ml * 1$	5	40(2)	40(2)	0	40(2)	40(2)	60(3)	0	0	0
G $3 \times 10^8 / 0.2ml * 2$	9	0	0	11(1)	0	88(8)	11(1)	0	0	0
H $3 \times 10^9 / 0.2ml * 2$	10	10(1)	0	0	80(8)	80(8)	0	0	0	0
I $3 \times 10^{10} / 0.2ml * 2$	8	37.5(3)	0	12.5(1)	0	87.5(7)	12.5(1)	0	0	0

B. 연속 3 Lot 시험 백신의 방어 효능 평가

가. 연구개발과제의 수행과정

(1) ㈜코미팜에서 제조된 연속 3 Lot 시험 백신의 산란계에서의 방어 효능 평가

a. ㈜코미팜에서 제조한 살모넬라 3가 불활화 오일 백신을 닭에 근육으로 2회 접종 (그림 9, 표 6)

1) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용

2) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs나 LPS에 음성인 닭만을 실험에 사용 [또는 AccuPower® Bacterial Poultry 3-Plex PCR Kit (Bioneer, South Korea)에서 살모넬라 음성인 닭을 실험에 사용]. 6

주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 4에 서술되어 있는 대로 근육 내로 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종



그림 9. 닭을 대상으로 한 연속 3 Lot 시험 백신의 효능 평가의 실험 개요

표 6. 갈색레그혼종을 대상으로 한 연속 3 Lot 시험백신의 효능 평가 시험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	도전감염 (12주령)	부검 (14 주령)
A	-	-	-	도전감염 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 도전감염 2주 후에 생존한 모든 가금을 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 각 조직에서의 균 분리
B	PBS	PBS	야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주 경구 접종	
C	연속 3 Lot 시험 백신 -1	연속 3 Lot 시험 백신 -1		
D	연속 3 Lot 시험 백신 -2	연속 3 Lot 시험 백신 -2		
E	연속 3 Lot 시험 백신 -3	연속 3 Lot 시험 백신 -3		

b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인

1) 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(3 WPPI), 도전감염 전(6 WPPI) 그리고 부검 전(8 WPPI)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리

2) 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs 또는 LPS를 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정

c. 2차 접종 후 10일 째에 혈액 또는 비장 세포로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 등 측정

1) 2차 접종 후 10일째에 각 그룹에서 5마리씩 채혈하고 닭의 비장을 채취하기 위해 희생하고, 비장들은 무균적으로 채취

2) 혈액 및 비장은 이전의 연구 Hur 등 (Hur et al., 2016)에서 기술된 방법에 따라 준비.

① 즉, 각 그룹별로 5마리의 닭을 마지막 예방 접종 후 10일 쯤에 각각 무균적으로 spleen을 채취하여 RPMI 1640에 모음.

② 그다음 0.8% 염화 암모늄 (ammonium chloride) (w/v)를 이용하여 적혈구 용해, 380×g, 4℃ 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척.

③ 마지막 원심 후 complete medium (100IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin 및 10% FCS을 포함하는 RPMI 1640)으로 재 부유.

④ 배양을 위한 세포 수를 계산하여 각 살모넬라 OMPs로 12시간 반응

⑤ 380×g, 4℃ 10분간 원심한 후 상층액을 -80℃에 보관하며 ELISA로 사이토카인 농도 측정. 또는 형광물질이 부착된 CD3, CD4, CD8 단클론 항체를 이용하여 FACs로 CD3⁺CD4⁺ T-cells과 CD3⁺CD4⁺ T-cells의 분포 비교 분석.

d. 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피유리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종

1) 2차 접종 후 3주 쯤에 야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피유리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 각각 동 균수로 혼합하여 경구 접종

e. 도전감염 후 2주간 폐사 여부 확인 및 생존 닭으로부터 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총 배설강)에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피유리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외 독성 균주분리 및 동정

1) 2차 접종 후 3주 쯤에 야외 독성 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피유리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 혼합하여 도전감염한 경우

① 2주간 하루에 두 번 씩 폐사 여부 확인

② 2주 후 부검을 통해 육안적 소견 관찰, 육안적 소견에서 이상 증후가 관찰된 조직에 대해 조직학적 소견 관찰

③ 2주 후 생존한 모든 가금을 희생시켜 비장, 간, 맹장 등에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피유리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 균 분리 및 균주별 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 최종 확인 (표 7)

표 7. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 감별을 위한 특이 프라이머 및 PCR 증폭 산물 크기

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ENTF	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG	304
	ENTR	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>ratA</i> ROD F	ATT GCT CTC GTC CTG GGT AC	571
	<i>ratA</i> ROD R	TAC CGA TAC GCC CAA CTA CC	

나. 수행내용

- a. (주)코미팜에서 제조한 살모넬라 3가 불활화 오일 백신을 산란계가 6주령이 되었을 때 각 그룹 별로 3개 lot의 백신을 각각 접종하였음.
- b. 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(3 WPPI), 도전감염 전(6 WPPI) 그리고 부검 전(8 WPPI)에 각각 모든 가금으로부터 정기적으로 채혈하여 각 면역 항체 유도 여부를 확인한 결과 음성대조군인 A 군을 제외하고 백신군인 C, D, E 그룹의 경우 접종 전인 0 WPPI에 비해 1차 접종후인 3 WPPI에 항체역가가 소폭 상승하였고, 2차 접종 후인 6 WPPI에는 백신 접종군인 C, D, E 모두 항체역가가 2배 이상 큰 폭으로 증가하였음. 0, 3, 6 WPPI에 모두 유의미한 항체역가의 차이가 보이지 않은 음성대조군인 A 군을 제외하고, 3개의 lot를 각각 접종한 C, D, E 그룹의 항체역가는 서로 유의미한 차이를 나타내지 않아 3개 lot에 차이가 없음을 확인하였음.

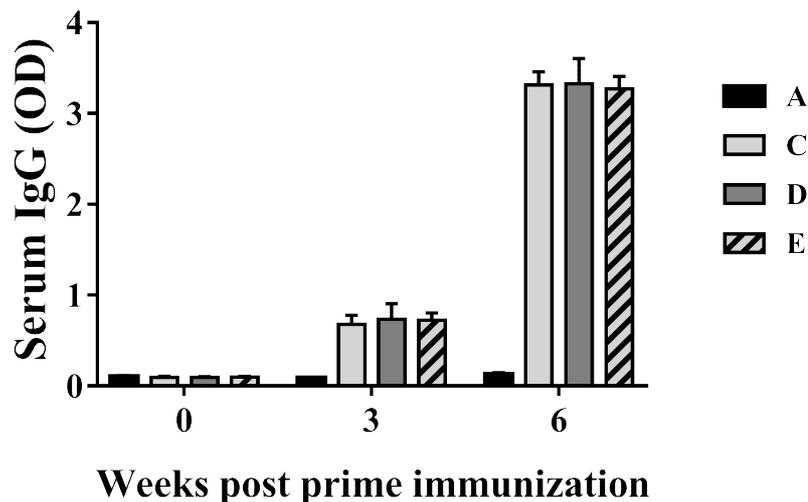


그림 10. 3개의 lot를 각각 접종 후 면역 항체 유도 여부 확인 결과

- c. 2차 접종 후 10일 째에 음성대조군인 A그룹과 백신 접종 그룹인 B, C, D 그룹의 혈액에서 분리된 림프구를 각 SE, SG, ST OMPs로 자극하고 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺를 측정된 결과 SE OMPs로 자극했을 때, 음성대조군인 A 그룹에 비해 B, C, D 그룹의 CD3⁺CD4⁺가 더 높게 측정되었고, 마찬가지로 CD3⁺CD8⁺의 경우에도 음성대조군인 A그룹에 비해 백신군인 B, C, D그룹에서 더 높게 측정되었음. SG OMPs로 자극한 A 그룹의 CD3⁺CD4⁺ 평균보다 백신 그룹 B, C, D의 는 더 높게

측정되었고, 마찬가지로 $CD3^+CD8^+$ 의 경우에도 백신군에서 더 높게 측정되었으며, ST OMPs로 자극한 백신접종군 B, C, D 그룹의 $CD3^+CD4^+$ 가 음성대조군의 $CD3^+CD4^+$ 에 비해 상승하는 것을 확인하였고, $CD3^+CD8^+$ 의 경우에도 음성대조군에 비해 백신군에서 높게 나타나는 것으로 관찰되었음(그림 11, 12).

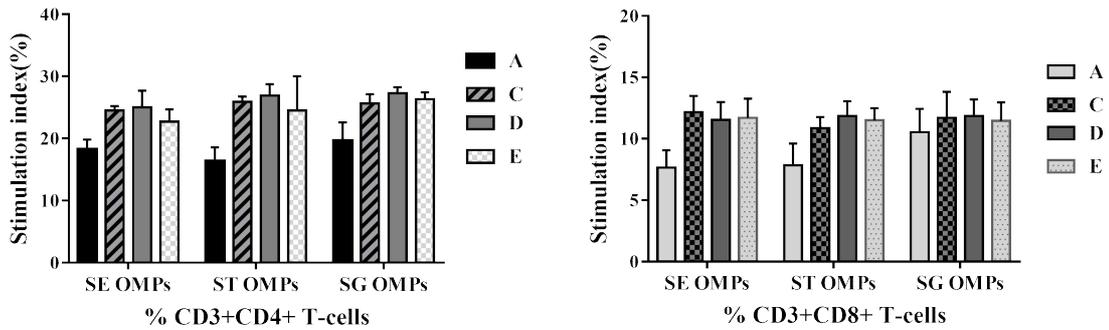


그림 11. SE, SG, ST OMPs로 자극한 $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ T-cell 백분율 그래프

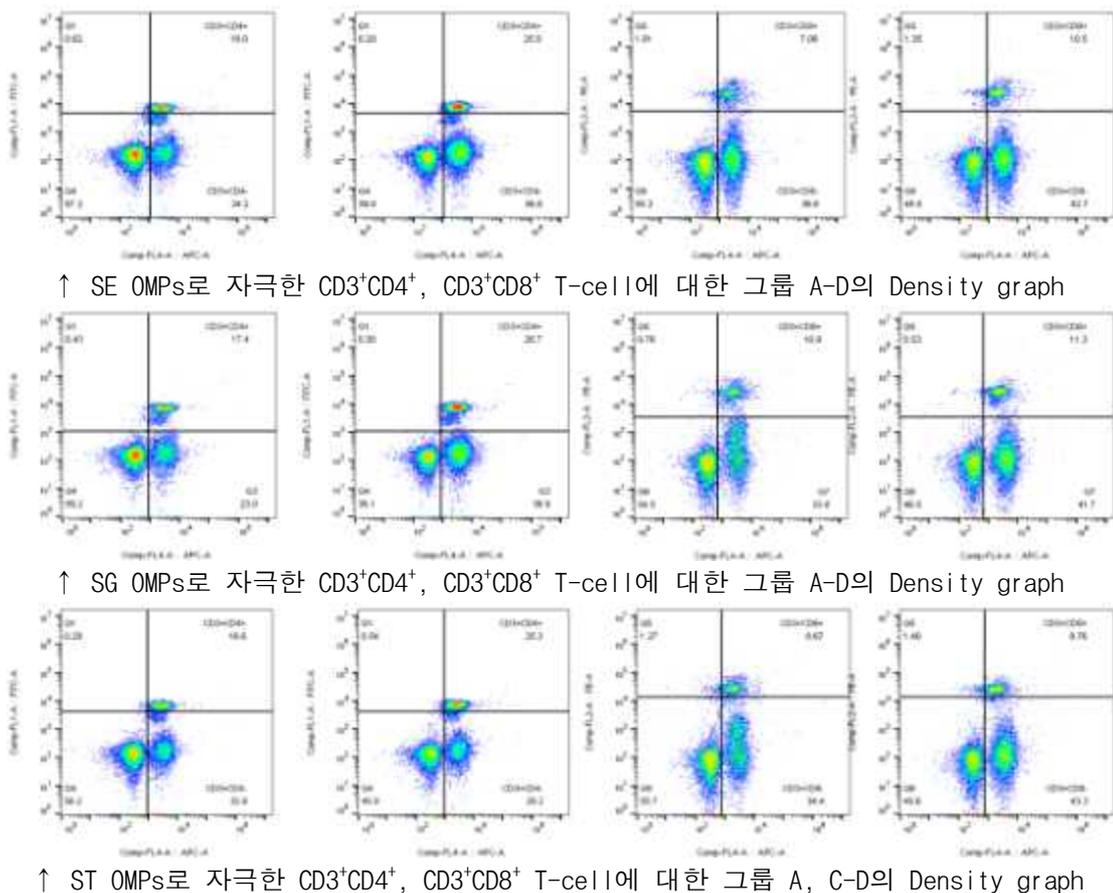


그림 12. SE, SG, ST OMPs로 각각 자극한 $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ T-cell에 대한 그룹 A-D의 Density graph

d. 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종한 결과 양성대조군인 B 그룹의 개체는 접종 후 7일차에 1수 폐사하기 시작하여 14일차에 모든 개체가 폐사하여 생존율 0%를 확인하였음. 음성

대조군인 A그룹과 백신군인 C, E 그룹의 모든 개체가 생존하여 생존율 100%임을 확인하였으나 백신군 D그룹의 경우 공격접종 13일차에 1수 폐사하였으나 이 경우 면역화가 진행되지 않아 폐사가 일어난 것으로 생각되기보다 원래 약했던 개체가 공격접종으로 인한 스트레스 및 밀식 사육으로 인한 같은 그룹 개체들의 공격 등으로 초래된 폐사로 여겨짐.

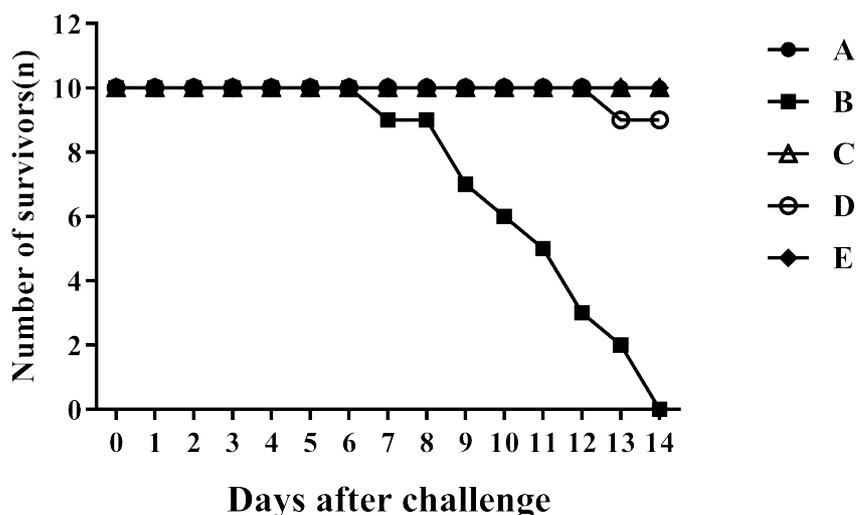


그림 13. 공격접종 후 생존율 그래프

e. 공격접종 후 2주간 폐사 여부를 확인하고 생존한 모든 산란계를 안락사 시켜 부검을 진행한 후 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총배설강)에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외 독성 균주분리 및 동정한 결과 음성대조군인 A 그룹에서는 모든 개체에서 살모넬라가 검출되지 않았고, 모든 개체가 폐사한 양성대조군 B 그룹의 경우 살모넬라 갈리나룸에 의한 가금티푸스로 인한 폐사로 확인되었음. 백신 접종군인 C, D, E 그룹의 경우 비슷한 정도의 균 분리율이 나타났고, D 그룹에서 폐사한 1수의 경우 살모넬라 갈리나룸이 검출되지 않아 가금티푸스를 방어하지 못해 폐사한 것 보다 환경적인 이유로 폐사했다고 보여짐(표 8). 동일한 조건의 다른 실험을 추가로 진행하여 각 그룹별로 SE, SG, ST를 각각 공격접종한 결과 SE 공격접종 양성대조군의 경우 간에서는 SE가 검출되지 않았으나 비장, 맹장, 총배설강의 경우 최소 80%, 최대 100%의 비율로 SE가 검출되었고, SG를 공격접종한 양성대조군의 경우 모든 개체가 폐사하여 생존율 0%로 확인되었고 균분리 결과 모든 개체에서 SG가 검출되었으며, ST를 공격접종한 양성대조군의 경우 간에서 30%, 비장에서 80%, 맹장에서 70%, 총배설강에서 80%의 비율로 ST가 검출되었음. 이 추가 실험 결과를 통해 살모넬라 3가 백신 3개의 lot 가 모두 살모넬라에 대한 충분한 방어효과가 있음을 확인할 수 있었음.

표 8. 부검 후 각 조직에서 분리된 살모넬라 검출 결과

(단위: %(수))

Group	n	SE			SG			ST		
		Liver	Spleen	Cloaca	Liver	Spleen	Cloaca	Liver	Spleen	Cloaca
A Negative Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B Positive Control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 살모넬라 3가 백신 lot-1	10	0	20(2)	10(1)	50(5)	50(5)	30(3)	0	20(2)	0
D 살모넬라 3가 백신 lot-2	9	0	11(1)	11(1)	44(4)	33(3)	44(4)	0	11(1)	11(1)
E 살모넬라 3가 백신 lot-3	10	0	20(2)	10(1)	40(4)	50(5)	30(3)	0	20(2)	10(1)

C. 살모넬라 3가 불활화 백신의 검정법 확립

(1) ㈜코미팜에서 제조한 살모넬라 3가 불활화 백신 마우스에서의 검정법 확립 가능성 평가

가. 연구개발과제의 수행과정

a. ㈜코미팜에서 제조한 살모넬라 3가 불활화 백신의 품질검사를 위한 마우스에 2회 근육 접종 (그림 4, 표 6)

1) 실험동물 : 5주령 BALB/c 마우스를 구입하여 실험에 사용

2) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 6에 서술되어 있는 대로 근육 내로 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종

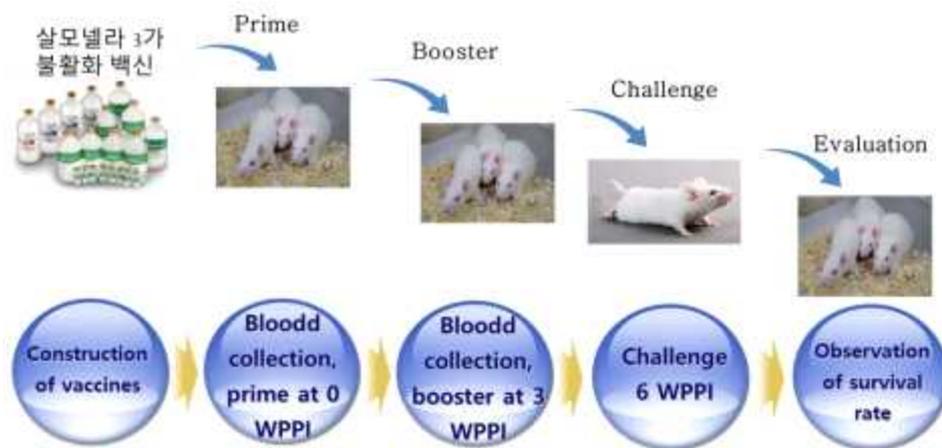


그림 14.마우스를 대상으로 한 살모넬라 3가 불활화 백신 검정법 확립 평가 시험 개요

표 9. BALB/c 마우스를 대상으로 한 살모넬라 3가 불활화 백신의 검정법 확립 평가 시험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	도전감염 (12주령)	부검 (14 주령)
A	-	-	-	도전감염 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 도전감염 2주 후에 생존한 모든 마우스를 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 각 조직에서의 균 분리
B	PBS	PBS	야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주 경구 접종	
C	살모넬라 3가 불활화 백신 -1	살모넬라 3가 불활화 백신 -1		
D	살모넬라 3가 불활화 백신 -2	살모넬라 3가 불활화 백신 -2		
E	살모넬라 3가 불활화 백신 -3	살모넬라 3가 불활화 백신 -3		

b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역항체 유도 여부 확인

1) 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(3 WPPI), 도전감염 전(6 WPPI)에 각각 모든 마우스로부터 채혈하여 혈청 분리

2) 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs 또는 LPS를 대상으로 mouse ELISA kit를 사용하여 serum IgG, IgG1, IgG2a 역가 측정

c. 2차 접종 후 3주째에 비장 세포로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-cells 또는 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-cells 등 측정

1) 2차 접종 후 3주 째에 각 그룹에서 5마리씩 마우스의 비장을 채취하기 위해 희생시키고, 비장은 무균적으로 채취(비장은 이전의 연구 Hur 등 (Hur et al., 2011)에서 기술된 방법에 따라 준비)

① 즉, 각 그룹별로 5마리의 마우스를 2차 접종 후 3주째에 각각 무균적으로 spleen을 채취하여 RPMI 1640에 모음.

② 그다음 RBC Lysis Buffer(Biolegend, San Diego, CA, USA)를 이용하여 적혈구 용해, 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척.

③ 마지막 원심 후 complete medium (100IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin 및 10% FCS을 포함하는 RPMI 1640)으로 1×10^6 /well이 되도록 재 부유.

④ 배양을 위한 세포 수를 계산하여 각 살모넬라 OMPs로 12시간 반응

⑤ 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 상층액을 -80°C에 보관하며 ELISA로 사이토카인 농도 측정. 또는 형광물질이 부착된 CD3, CD4, CD8, IFN- γ 단클론 항체를 이용하여 FACs로 CD3⁺CD4⁺ T-cells과 CD3⁺CD4⁺ T-cells, IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-cells, IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-cells의 분포 비교 분석.

d. 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종

1) 2차 접종 후 3주 째에 야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 각각 동 균수로 혼합하여 경구 접종

e. 도전감염 후 2주간 폐사 여부 확인 및 생존 마우스로부터 채취한 각 장기(간, 비장)에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외 독성 균주분리 및 동정

1) 2차 접종 후 3주 째에 야외 독성 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 혼합하여 도전감염한 경우

① 2주간 하루에 두 번 씩 폐사 여부 확인

② 2주 후 부검을 통해 육안적 소견 관찰, 육안적 소견에서 이상 증후가 관찰된 조직에 대해 조직학적 소견 관찰

③ 2주 후 생존한 모든 마우스를 희생시켜 비장, 간 등에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 균 분리 및 균주별 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 최종 확인 (표 10)

표 10. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 감별을 위한 특이 프라이머 및 PCR 증폭 산물 크기

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ENTF	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG	304
	ENTR	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>ratA</i> ROD F	ATT GCT CTC GTC CTG GGT AC	571
	<i>ratA</i> ROD R	TAC CGA TAC GCC CAA CTA CC	

나. 수행내용

- a. (주)코미팜에서 제조한 살모넬라 3가 불활화 백신의 품질검사를 위해 6주령 마우스에 2회 근육 접종한 결과 1차 및 2차 백신 접종 후 7일정도 피모의 역립 및 활동성 저하가 관찰되었으나 7 일 이후부터 털 상태가 양호해지고 움직임이 활발해 지는 모습이 관찰되었고, 이후 폐사 및 다른 이상소견은 관찰되지 않았음(그림 15).

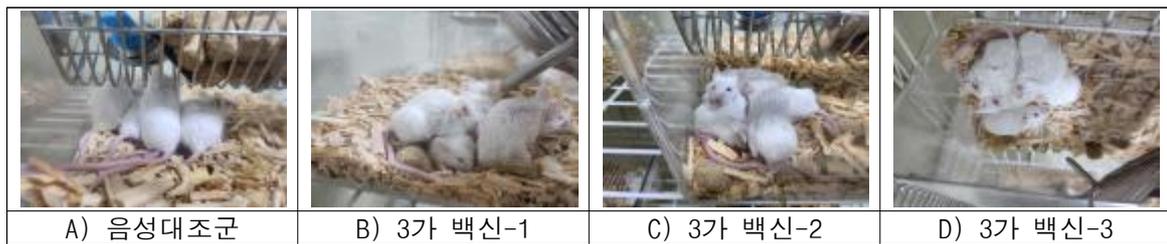


그림 15. 그룹 별 접종 후 피모 상태 및 활동성 저하로 인한 뭉쳐있는 모습

- b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부를 확인한 결과 *S. Enteritidis* OMPs로 ELISA를 진행 한 결과 음성대조군인 A 그룹의 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 항체 역가인 0.02 ± 0.04 , 0.02 ± 0.02 , 0.004 ± 0.006 보다 백신 접종 군인 B 그룹에서 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 0.02 ± 0.03 , 0.94 ± 0.15 , 1.72 ± 0.12 , C 그룹에서 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 각 0.03 ± 0.05 , 1.00 ± 0.15 , 1.77 ± 0.07 , D 그룹에서 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 각 0.02 ± 0.03 , 1.01 ± 0.16 , 1.75 ± 0.10 으로 유의적인 항체 역가의 상승이 확인되었음. 마찬가지로 *S. Gallinarum* OMPs로 ELISA를 수행한 결과 음성대조군인 A그룹의 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 항체 역가인 0.01 ± 0.02 , 0.01 ± 0.01 , 0.004 ± 0.001 보다 백신 접종 군인 B 그룹의 접종 전, 1차 접종 후, 2차 접종 후 0.01 ± 0.02 , 1.14 ± 0.23 , 1.74 ± 0.19 , C 그룹 0.01 ± 0.01 , 1.11 ± 0.30 , 1.82 ± 0.18 , D 그룹 0.004 ± 0.001 , 1.10 ± 0.31 , 1.83 ± 0.19 의 항체 역가가 유의적으로 상승하였음을 확인하였음. *S. Typhimurium* OMPs 로 ELISA 진행 한 결과 음성대조군인 A 그룹의 접종 전 항체역가 0.02 ± 0.01 , 1차 후 항체 역가 0.02 ± 0.01 , 2차 후 항체 역가 0.01 ± 0.01 에 비해 백신군인 B, C, D 그룹에서 각 1차 후 0.35 ± 0.09 , 0.38 ± 0.14 , 0.36 ± 0.12 , 2차 후 1.16 ± 0.18 , 1.17 ± 0.18 , 1.15 ± 0.3 으로 유의적인 항체역가의 상승이 나타났음을 확인되었음(그림 16).

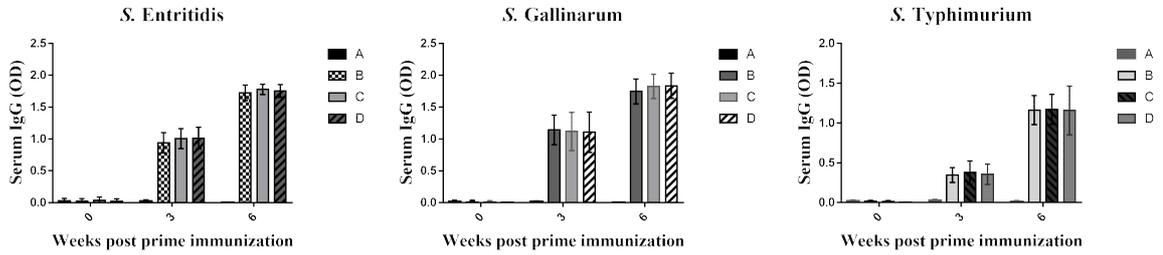


그림 16. 살모넬라 엔터라이티디스, 갈리나룸, 타이피뮤리움의 면역 항체 역가 측정 결과

- c. 2차 접종 후 3주째에 각 그룹별로 5마리씩 희생시켜 부검 후 비장 세포를 분리하여, 각 그룹별로 *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* OMPs로 자극하여 $CD3^+CD4^+$, $CD4^+ IL2^+$, $TNF\alpha^+$, $IFN-r^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD8^+ IL2^+$, $TNF\alpha^+$, $IFN-r^+$ 를 Beckman Coulter Software Kalluza version 2.1(Beckman Coulter, Krefeld, Germany) 프로그램을 사용해 분석함. SE OMPs로 자극한 $CD3^+CD4^+$ T 세포 중 $IL2^+$ 는 A그룹 $0.59 \pm 0.41\%$, B그룹 $1.81 \pm 0.37\%$, C그룹 $1.81 \pm 0.60\%$, D그룹 $1.67 \pm 0.22\%$ 으로 음성대조군에 비해 백신군인 B, C, D 그룹에서 모두 증가하였고, $TNF\alpha^+$ 는 A 그룹 $0.50 \pm 0.12\%$, B 그룹 $1.20 \pm 0.34\%$, C 그룹 $1.25 \pm 0.32\%$, D 그룹 $1.21 \pm 0.20\%$ 로 백신군에서 음성대조군에 비해 모두 증가하였으며, $IFN-r^+$ 는 A 그룹 $0.44 \pm 0.15\%$, B 그룹 $1.46 \pm 0.16\%$, C그룹 $1.52 \pm 0.27\%$, D 그룹 $1.54 \pm 0.26\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군의 $IFN-r^+$ 가 모두 증가하였음. 마찬가지로 SE OMPs로 12시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 자극한 $CD3^+CD8^+$ T 세포 중 $IL2^+$ 는 A그룹에서 $0.58 \pm 0.09\%$, B그룹 $1.37 \pm 0.15\%$, C그룹 $1.50 \pm 0.16\%$, D 그룹 $1.46 \pm 0.17\%$ 으로 백신군인 B, C, D 그룹 모두 음성대조군에 비해 약간 증가하였고, $TNF\alpha^+$ 는 A 그룹 $0.63 \pm 0.03\%$, B 그룹 $1.59 \pm 0.21\%$, C 그룹 $1.41 \pm 0.28\%$, D 그룹 $1.51 \pm 0.33\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군에서 약간 증가하였고, $IFN-r^+$ 는 A 그룹 $1.28 \pm 0.17\%$, B 그룹 $2.76 \pm 0.56\%$, C그룹 $2.64 \pm 0.62\%$, D 그룹 $2.69 \pm 0.61\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군의 $IFN-r^+$ 가 모두 증가하였음. 분석 결과 CO_2 인큐베이터에서 ST OMPs로 12시간 동안 자극한 $CD3^+CD4^+$ T 세포 중 $IL2^+$ 는 A그룹 $0.88 \pm 0.21\%$, B그룹 $1.47 \pm 0.21\%$, C그룹 $1.52 \pm 0.32\%$, D 그룹 $1.42 \pm 0.17\%$ 으로 백신군인 B, C, D 그룹 모두 음성대조군에 비해 약간 증가하였고, $TNF\alpha^+$ 는 A 그룹 $0.21 \pm 0.06\%$, B 그룹 $0.34 \pm 0.06\%$, C 그룹 $0.33 \pm 0.10\%$, D 그룹 $0.38 \pm 0.13\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군에서 약간 증가하였고, $IFN-r^+$ 는 A 그룹 $0.86 \pm 0.14\%$, B 그룹 $1.44 \pm 0.26\%$, C그룹 $1.30 \pm 0.17\%$, D 그룹 $1.33 \pm 0.34\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군의 $IFN-r^+$ 가 모두 약간 증가하였음. 마찬가지로 ST OMPs로 자극한 $CD3^+CD8^+$ T 세포 중 $IL2^+$ 는 A그룹 $4.95 \pm 1.41\%$, B그룹 $8.17 \pm 2.05\%$, C그룹 $9.30 \pm 2.01\%$, D 그룹 $9.05 \pm 2.74\%$ 으로 음성대조군에 비해 백신군인 B, C, D 그룹에서 모두 증가하였고, $TNF\alpha^+$ 는 A 그룹 $4.54 \pm 1.70\%$, B 그룹 $9.33 \pm 3.59\%$, C 그룹 $10.33 \pm 2.69\%$, D 그룹 $9.61 \pm 3.81\%$ 로 백신군에서 음성대조군에 비해 모두 증가하였으며, $IFN-r^+$ 는 A 그룹 $8.42 \pm 2.14\%$, B 그룹 $16.08 \pm 5.38\%$, C그룹 $17.28 \pm 5.07\%$, D 그룹 $16.94 \pm 4.15\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군의 $IFN-r^+$ 가 모두 증가하였음. SG OMPs로 12시간 동안 자극한 $CD3^+CD4^+$ T 세포 중 $IL2^+$ 는 A그룹 $4.95 \pm 1.41\%$, B그룹 $8.17 \pm 2.05\%$, C그룹 $9.30 \pm 2.01\%$, D 그룹 $9.05 \pm 2.74\%$ 으로 음성대조군에 비해 백신군인 B, C, D 그룹에서 모두 증가하였고, $TNF\alpha^+$ 는 A 그룹 $4.54 \pm 1.70\%$, B 그룹 $9.33 \pm 3.59\%$, C 그룹 $10.33 \pm 2.69\%$, D 그룹 $9.61 \pm 3.81\%$ 로 백신군에서 음성대조군에 비해 모두 증가하였으며, $IFN-r^+$ 는 A 그룹 $8.42 \pm 2.14\%$, B 그룹 $16.08 \pm 5.38\%$, C그룹 $17.28 \pm 5.07\%$, D 그룹 $16.94 \pm 4.15\%$ 로 음성대조군에 비해 백신군의 $IFN-r^+$ 가 모두 증가하였음. $CD3^+CD4^+$ 와 마찬가지로 SG OMPs로 자극한

CD3⁺CD8⁺ T 세포 중 IL2⁺는 A그룹 1.88±0.69%, B그룹 3.50±0.56%, C그룹 3.57±0.94%, D 그룹 3.49±2.15%으로 백신군인 B, C, D 그룹 모두 음성대조군에 비해 약간 증가하였고, TNFα⁺는 A 그룹 0.90±0.70%, B 그룹 2.68±0.95%, C 그룹 2.71±1.28%, D 그룹 2.77±1.20%로 음성대조군에 비해 백신군에서 약간 증가하였고, IFN-r⁺는 A 그룹 0.97±0.34%, B 그룹 1.97±0.53%, C그룹 1.87±0.37%, D 그룹 1.98±0.68%로 음성대조군에 비해 백신군의 IFN-r⁺가 모두 약간 증가하였음(그림 17).

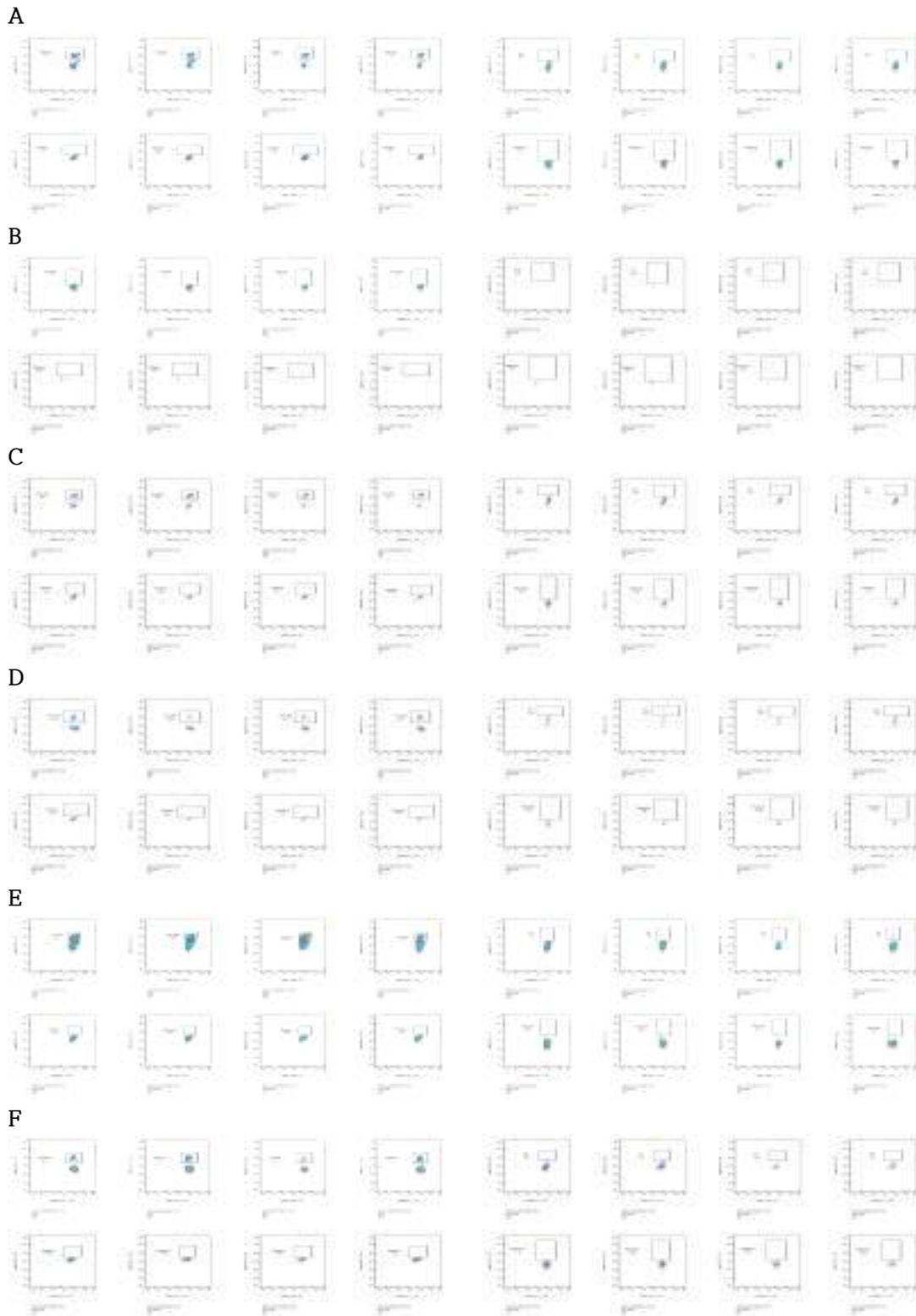


그림 17. CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-cells, IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-cells 측정(FACS) 결과. (A) *S.Typhimurium* OMPs로 자극시킨 CD3⁺CD4⁺, CD4⁺ IL2⁺, TNF α ⁺, IFN- γ ⁺, (B) *S.Typhimurium* OMPs로 자극시킨 CD3⁺CD8⁺, CD4⁺ IL2⁺, TNF α ⁺, IFN- γ ⁺, (C) *S.Gallinarum* OMPs로 자극시킨 CD3⁺CD4⁺, CD4⁺ IL2⁺, TNF α ⁺, IFN- γ ⁺, (D) *S.Gallinarum* OMPs로 자극시킨 CD3⁺CD4⁺, CD4⁺ IL2⁺, TNF α ⁺, IFN- γ ⁺, (E) *S.Enteritidis* OMPs로 자극시킨 CD3⁺CD4⁺, CD4⁺ IL2⁺, TNF α ⁺, IFN- γ ⁺, (F) *S.Enteritidis* OMPs로 자극시킨 CD3⁺CD8⁺, CD8⁺ IL2⁺, TNF α ⁺, IFN- γ ⁺

d. 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔테라이티디스와 살모넬라 타이피리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종할 경우 살모넬라 엔테라이티디스로 인한 전 두수 폐사가 예상됨에 따라 공격접종을 실시하기에 적절하지 않다고 판단되어 공격접종 및 균분리 실험은 진행되지 않았음.

- 협동연구기관((주) 코미팜) : 살모넬라 3가 불활화 시험 백신 제작 및 임상시험 신청

A. 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 제조

a. 백신주 3종에 대한 master seed stock 확보 및 증식성 확인

1) Master seed stock 확보

주관연구기관으로부터 분양받은 살모넬라 엔테라이티디스 HJL345strain, 살모넬라 타이피리움 HJL812 strain, 살모넬라 갈리나룸 HJL465 strain 3종을 각각 MacConky agar에 이식하여 37°C에서 24시간 배양 후, 집락을 선정하여 다시 TSB에 이식 후 37°C에 24시간 배양한 것을 master seed로 사용하였다.

표 11. Master seed에 대한 agar plate에 도말 colony 사진

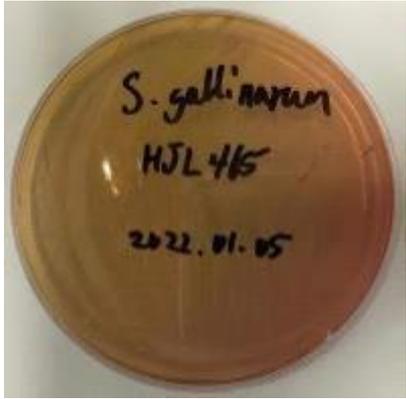
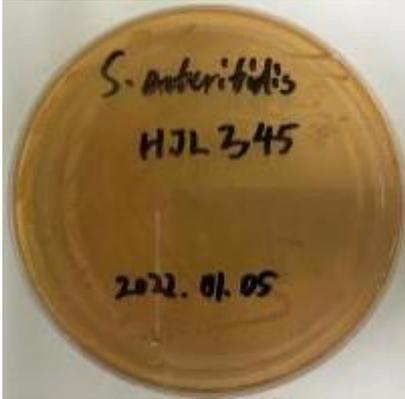
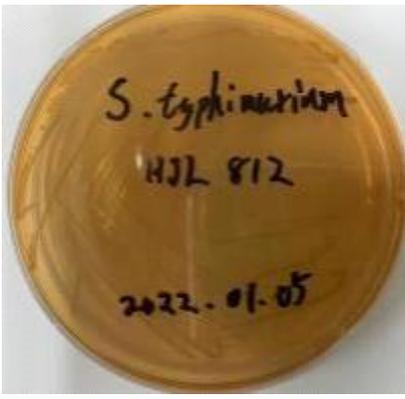
<i>Salmonella</i> Gallinarum HJL465 strain	<i>Salmonella</i> Enteritidis HJL345 strain	<i>Salmonella</i> Typhimurium HJL812 strain
		

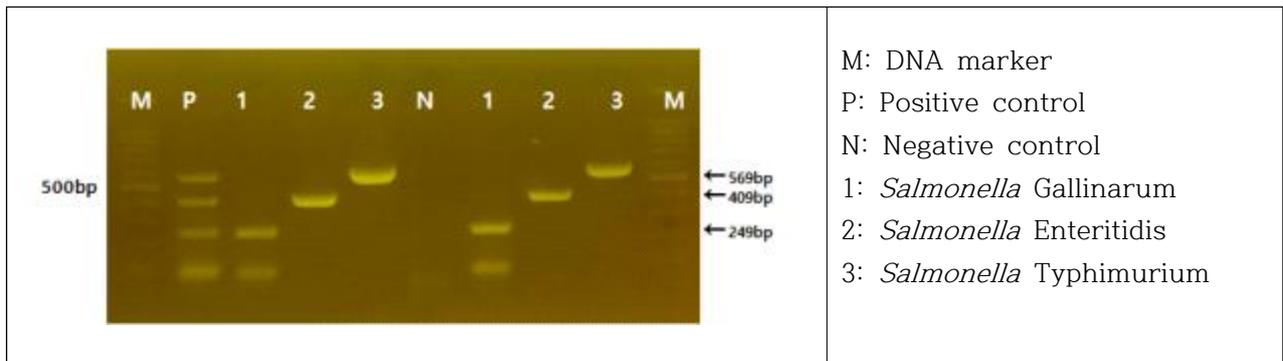
표 12. Master seed의 stock 사진

<i>Salmonella</i> Gallinarum HJL465 strain Master seed stock	<i>Salmonella</i> Enteritidis HJL345 strain Master seed stock	<i>Salmonella</i> Typhimurium HJL812 strain Master seed stock
		



표 13. Master seed에 대한 PCR 결과

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> Enteritidis	SDFI F	GATGTGGTTGGTTCGTCCTG	409
	SDFI R	GCGAGACCTCAAACCTTACTCAG	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	STM4995-F	CAGCGGTATGATGCGGTAGT	569
	STM4995-R	TCACCGGTGGACATGCCTGC	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	SGP F	GTTGCCGTACCGGTGTAACG	249
	SGP R	TTCCTGACGGGCATCGACGGC	



2) 증식성 확인

살모넬라 엔테라이티디스 HJL345 strain, 살모넬라 타이피뮤리움 HJL812 strain, 살모넬라 갈리나룸 HJL465 strain의 master seed 각 1종씩을 TSA에 이식하여 37℃에서 18~24시간 배양하고, single colony를 따서 20 ml TSB 배지에 접종 후, subculture를 진행하였다. 배양 종료 후, 1l TSB 배지에 1% 농도로 접종하고, 12시간 이상 배양하면서 O.D값에 따른 생균수 변화를 측정하였다. 각 strain 별로 대수 증식기에 도달하는 배양 시간을 확인하고, O.D 1.0을 기준으로 생균수를 환산하여 표준화하였다.

표 14. 세균별 증식기간 OD600 값 변화 결과(1차)

배양시간 (hr)	균주								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>S. Gallinarum</i>	0.029	0.043	0.136	0.339	0.566	0.8	0.945	1.087	1.209

<i>S. Enteritidis</i>	0.055	0.11	0.392	0.793	0.973	1.009	1.009	1.024	1.028
<i>S. Typhimurium</i>	0.095	0.193	0.656	1.079	1.144	1.141	1.158	1.189	1.215

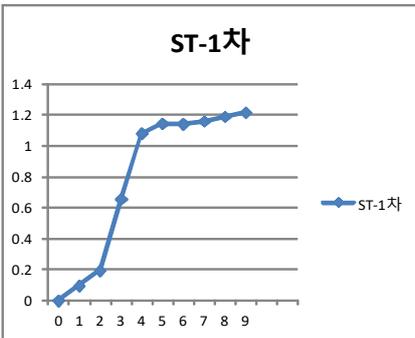
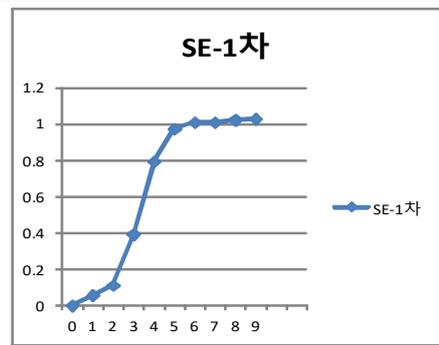
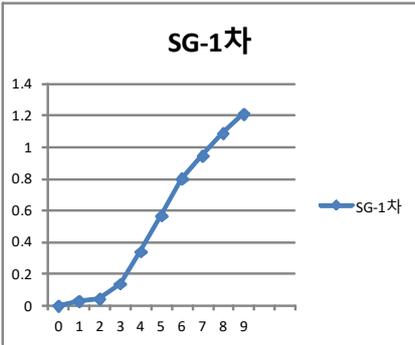


표 15. 세균별 증식기간 OD600 값 변화 결과(2차)

균주	배양시간 (hr)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<i>S. Gallinarum</i>	0.029	0.05	0.118	0.382	0.674	0.926	1.02	1.117	1.129	
<i>S. Enteritidis</i>	0.019	0.054	0.231	0.628	0.82	0.927	1.075	1.111	1.108	
<i>S. Typhimurium</i>	0.012	0.068	0.345	0.971	1.202	1.222	1.255	1.271	1.274	

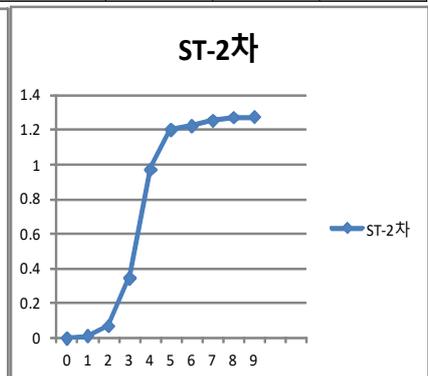
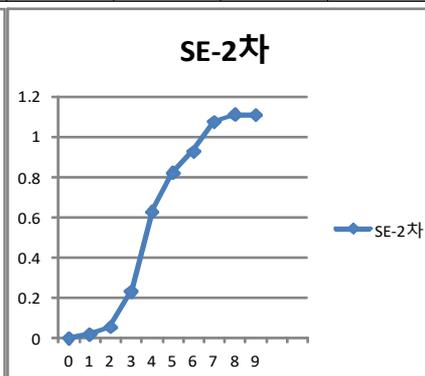
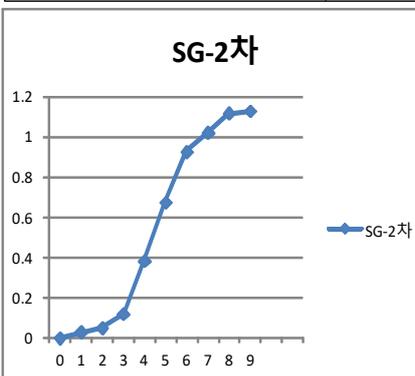


표 16. 세균별 증식기간 OD600 값 변화 결과(3차)

배양시간 (hr)	균주								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>S. Gallinarum</i>	0.017	0.028	0.075	0.206	0.447	0.712	0.905	1.064	1.188
<i>S. Enteritidis</i>	0.018	0.039	0.23	0.789	1.085	1.136	1.141	1.158	1.171
<i>S. Typhimurium</i>	0.037	0.191	0.452	1.062	1.205	1.207	1.207	1.227	1.243

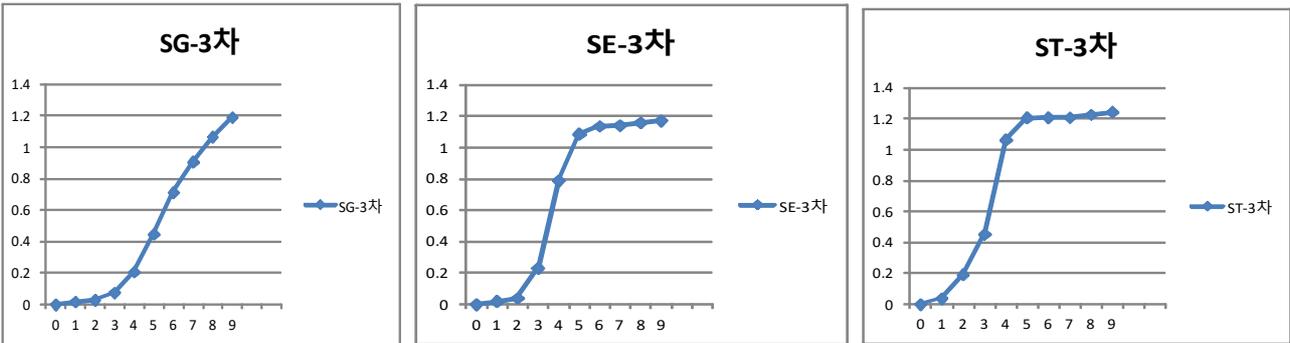


표 17. *S. Gallinarum* 생균수 측정 결과

		OD600 값 대응한 생균수 결과		
<i>S. Gallinarum</i>	OD600 값	0.206	0.447	1.064
	생균수	9.2×10^7 cfu/ml	1.9×10^8 cfu/ml	1.44×10^9 cfu/ml

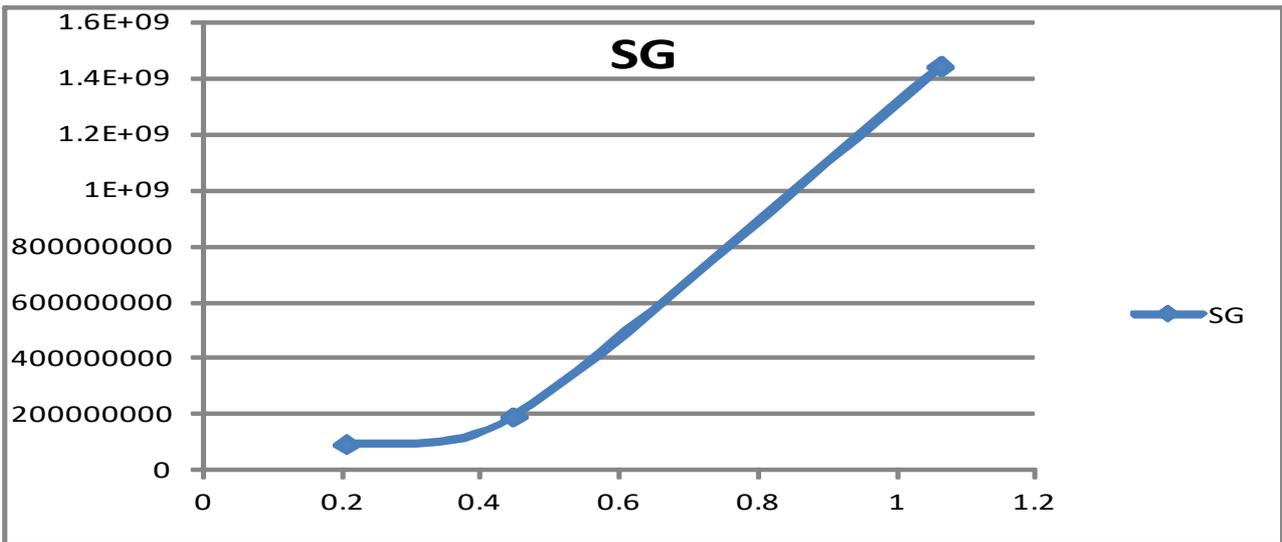


표 18. *S. Enteritidis* 생균수 측정 결과

		OD600 값 대응한 생균수 결과		
<i>S. Enteritidis</i>	OD600 값	0.23	0.789	1.085
	생균수	1.41×10^8 cfu/ml	5.8×10^8 cfu/ml	1.1×10^9 cfu/ml

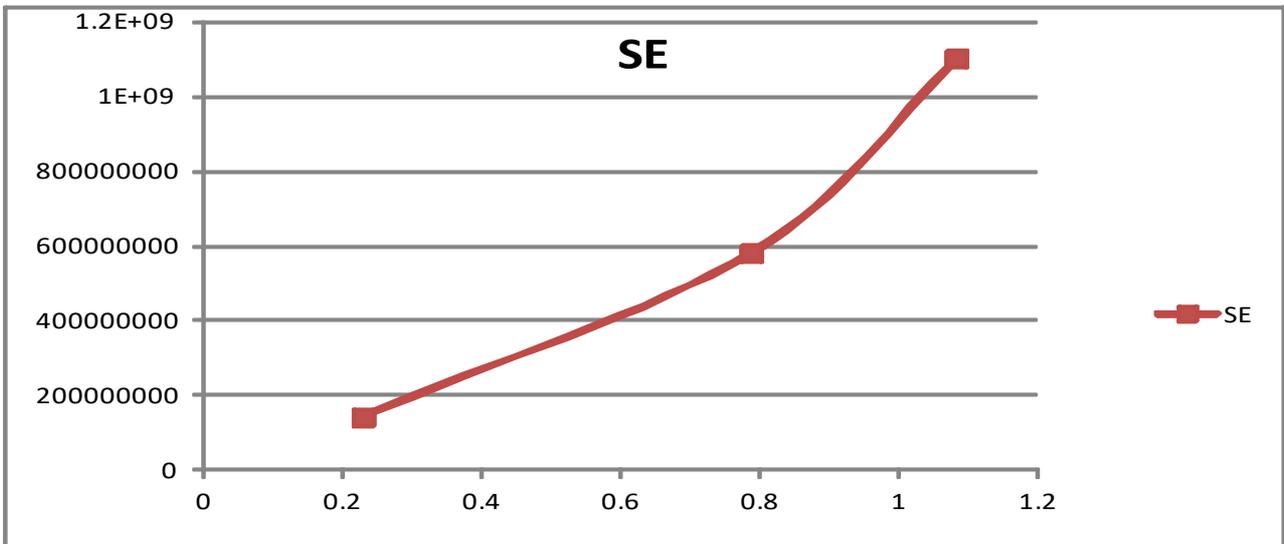
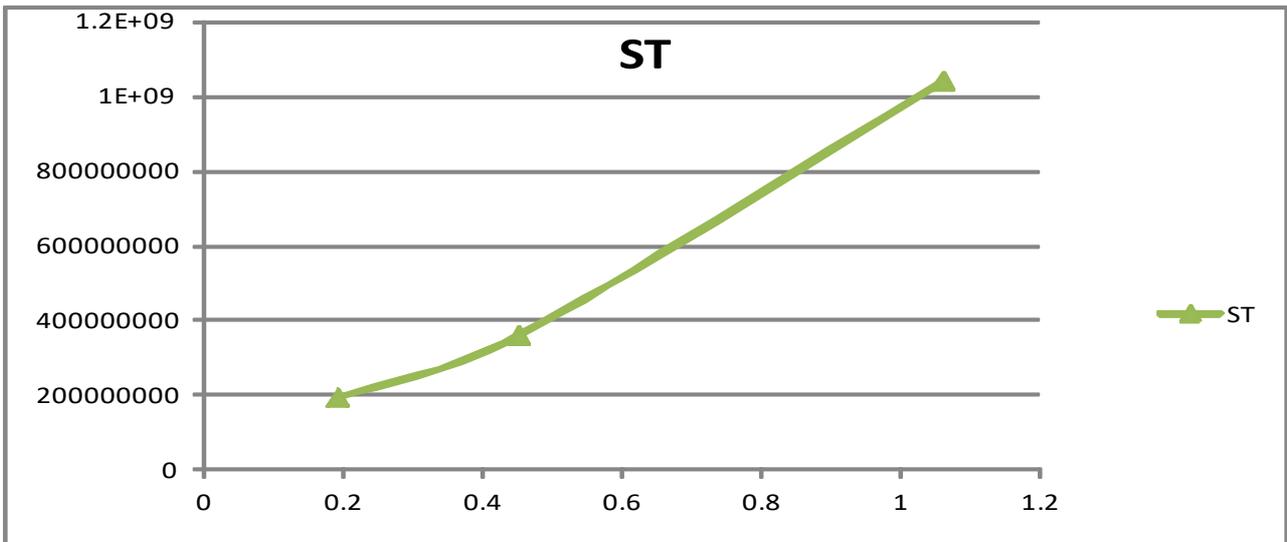


표 19. *S. Typhimurium* 생균수 측정 결과

		OD600 값 대응한 생균수 결과		
		0.191	0.452	1.062
<i>S. Typhimurium</i>	OD600 값	0.191	0.452	1.062
	생균수	1.93×10^8 cfu/ml	3.6×10^8 cfu/ml	1.04×10^9 cfu/ml



b. 뉴노멀 사균체 백신 제조 기술 기반 항원 함량별 3 Lot 시험백신 제조

1) 살모넬라 배양 및 불활화

각각의 백신주 3종을 5l flask에서 배양 후, 원심 채균하고, PBS로 재부유 한 후, chlorhexidine 처리를 통해 불활화 및 ghost화 cell을 제작하고, 이를 검증하였다.

표 20. chlorhexidine 처리를 통해 불활화 결과

		배양 시간 (hr)		
		24	48	72
<i>S. Gallinarum</i>	XLD agar+5%FBS	-	-	-
	LB Broth+5%FBS	-	-	-

S. Enteritidis	XLD agar+5%FBS	-	-	-
	LB Broth+5%FBS	-	-	-
S. Typhimurium	XLD agar+5%FBS	-	-	-
	LB Broth+5%FBS	-	-	-

*-: 세균 증식하지 않았음

표 21. XLD agar+5%FBS 불활화 시험 사진

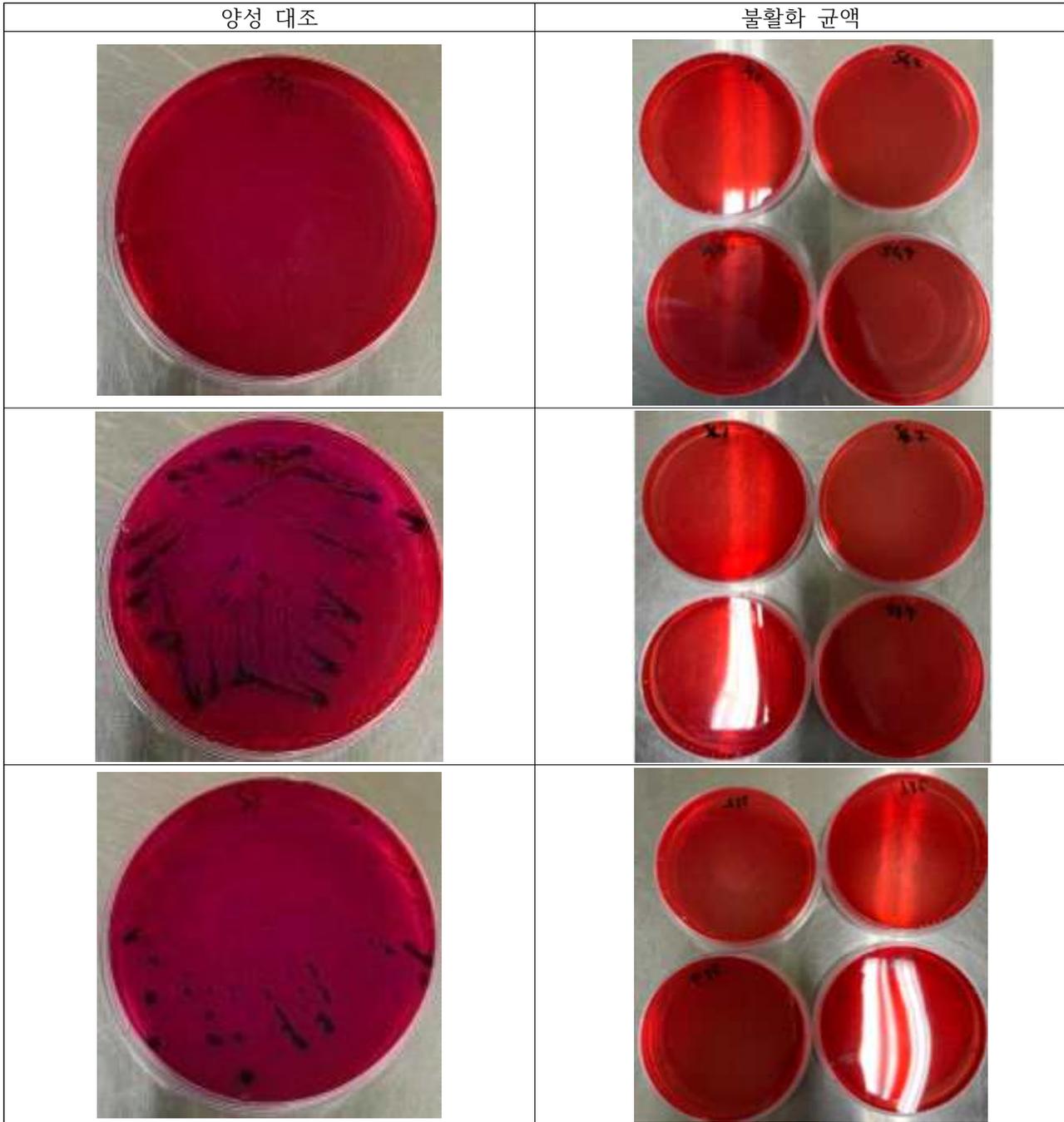
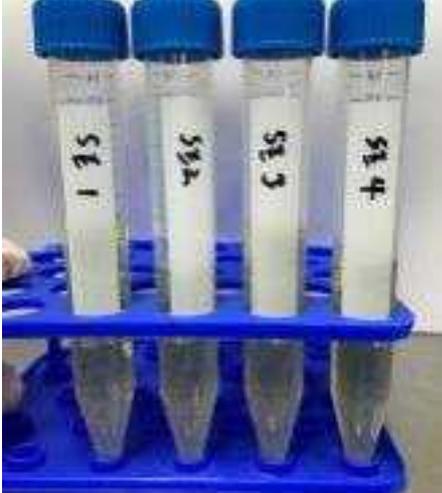
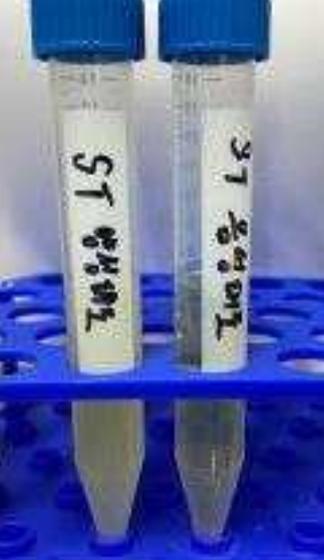
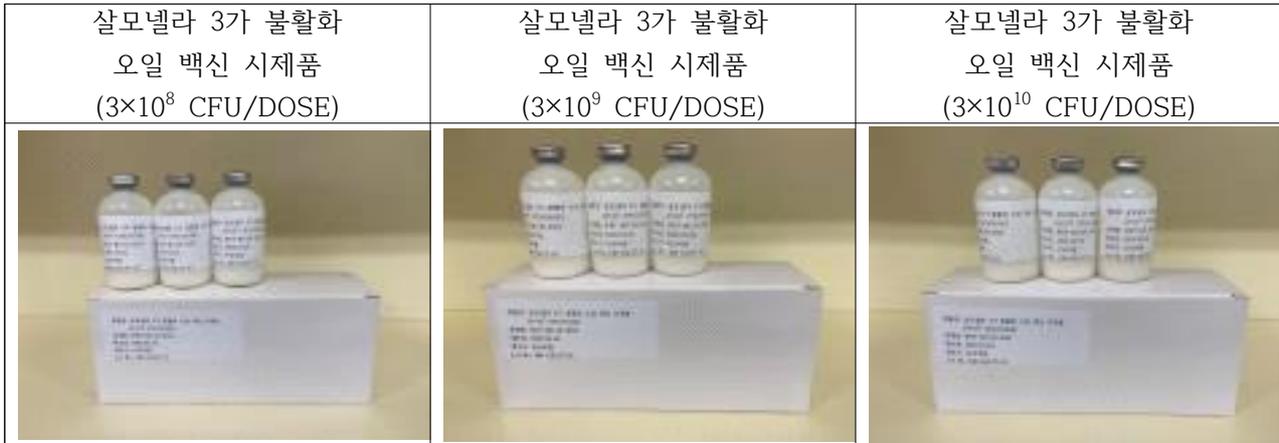


표 22. LB Broth+5%FBS 불활화 시험 사진

양성 대조 및 음성대조	불활화 균액
	
	
	

2) 항원 함량별 시험백신 제조

불활화 된 각각의 균체를 ISA78 adjuvant와 3:7의 비율로 유화하여 오일백신을 제조하고, 불활화 전 생균수 기준으로 백신 1 dose 당 3×10^8 CFU, 3×10^9 CFU 및 3×10^{10} CFU의 농 도를 가지는 항원 함량별 시험백신 3 Lot를 각각 제조하였다.



c. 포르말린 불활화 사균체 백신 제조 기술 기반 시험백신 제조

1) 살모넬라 배양 및 불활화

각각의 백신주 3종을 5l flask에서 배양 후, 원심 채균하고, PBS로 재부유 한 후, 0.3% 포르말린을 실온 에서 3일간 처리하여 불활화 하고, 이를 확인한다.

표 23. 포르말린 처리를 통해 불활화 결과

		배양 시간 (hr)		
		24	48	72
S. Gallinarum	XLD agar+5%FBS	-	-	-
	LB Broth+5%FBS	-	-	-
S. Enteritidis	XLD agar+5%FBS	-	-	-
	LB Broth+5%FBS	-	-	-
S. Typhimurium	XLD agar+5%FBS	-	-	-
	LB Broth+5%FBS	-	-	-

*-: 세균 증식하지 않았음

2) 시험백신 제조

포르말린 불활화 사균체 백신의 경우, 뉴노멀 사균체 백신 시제품 중 가장 고역가 제품과 동일한 항원 함량으로 1개 Lot를 제조하고, 면역증강제의 경우, aluminium gel을 사용하였다.

B. 연속 3 Lot 시험 백신 제조

a. 뉴노멀 사균체 백신 제조 기술 기반 연속 3 Lot 시험백신 제조

1) 살모넬라 배양 및 불활화

각각의 백신주 3종을 200 l fermentor에서 배양 후, 원심 채균하고, PBS로 재부유 한 후, chlorhexidine 처리를 통해 불활화 및 ghost화 cell을 제작하고, 이를 검증한다.

2) 연속 3 Lot 시험백신 제조

① 항원함량별로 제조된 뉴노멀 사균체 백신 시제품의 최소면역원성 결과에 근거하여 최적의 항원 함량을 선정 후, 해당 농도를 기준으로 백신을 제조한다.

② 불활화 된 각각의 균체를 ISA70 혹은 동등한 oil adjuvant와 3:7의 비율로 유화하여 오일 백신을 제조하고, 불활화 전 생균수 기준으로 백신 1 dose 당 $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{10}$ CFU의 농도 (최소면역원성 결과 확인 후 결정)가 되도록 각 Lot 당 100병씩 (Vial 당 1,000dose/500 ml 기준) 연속 3 Lot 시험백신을 제조한다.

③ 상기 제조된 시험백신은 향후, 유효기간 설정을 위한 장기보존성(안정성) 평가 및 3개 농장 야외 임상시험의 목적으로 활용된다.

살모넬라 3가 Ghost 백신 시험백신 Lot No. Sal-new3-01	살모넬라 3가 Ghost 백신 시험백신 Lot No. Sal-new3-02	살모넬라 3가 Ghost 백신 시험백신 Lot No. Sal-new3-03
		

C. 연속 3 Lot 시험 백신에 대한 자가 검정시험

a. 시험법

동물용의약품 국가출하승인검정 기준 중 “1-3-02-01 가금티푸스 불활화백신 검정기준”과 “1-3-02-07 살모넬라 엔터리티디스, 살모넬라 티피무름 불활화 백신”의 검정 기준에 준하여, 특성 시험, 수소이온농도시험, 무균시험, 방부제 정량시험, 안전시험을 실시하였다. (살모넬라 3종 백신에 대해서는 국내에 허가된 제품이 없으며, 관련 검정 기준 또한 등재되어 있지 않다)

b. 자가검정시험

1) 특성시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 냉암소에 보관하면서 2개 이상의 백신에 대하여 무색투명한 용기의 백신은 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~20 mm의 무색투명한 유리 용기에 옮겨서 색조, 투명도(흔탁도), 이물, 이취, 내용물의 균일성에 대하여 검사한다.

2) 수소이온농도시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 냉암소에 보관하면서 수소이온 농도 시험을 진행한 결과 pH 6~8 이내에 있어야 한다.

3) 무균시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 냉암소에 보관하면서 무균 시험을 진행한 결과, nutrient broth, nutrient agar 사면 및 액 체 thioglycolate 배지 모두에서 어떠한 세균 및 곰팡이의 증식도 없이 무균 상태를 유지하여야 한다.

4) 방부제 정량시험

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3℃ 냉암소에 보관하면서 방부제 정량시험을 진행한 결과 포르말린 함량은 0.3% 이내에 있어야 한다.

5) 안전시험

살모넬라 갈리나룸, 엔터리티디스 및 티피무름에 감수성이 있는 3~4주령 닭 5마리를 사용하여 시험군에 백신 2수분을 사용법(근육)에 접종하고 14일간 관찰한 결과, 모든 시험군에서 관찰기간 동안 아무런 임상증상 없이 건강하여야 한다.

표 26. 연속 3 lots 자가시험 성적

제조번호 시험항목	Sal-new3-01	Sal-new3-02	Sal-new3-03
특성시험	적합	적합	적합
수소이온농도 시험	7.01	7.09	7.16
무균시험	이상 없음	이상 없음	이상 없음
방부제 정량시험	0.2% 이하	0.2% 이하	0.2% 이하
안전 시험	이상 없음	이상 없음	이상 없음

 (주)코미팜	제목(Subject)		
	완제품 시험 지시 및 성적서		

제 품 명	PRO-VAC SAL-NEW3			지 시 자	김성기 (서명)
지시 번호	Q-8A220503이	지시 년월일	2022.05.03		
제조 수량	33	검체 채취량	3	합격수량	30
제조 번호	Sal-new3이			제조년월일	2022.05.02
시험 항목	허용 범위			시험 일자	결과
특성시험	유백색 내지 황갈색의 혼탁한 부유액이며 내용물의 성상이 균일하고 정치하면 백신 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 된다.			2022.05.03	적합, 부적합
수소이온 농도시험	pH 6.0 ~ 8.0 이내 (pH 측정기를 이용한 측정법)			2022.05.03	pH 7.1
무균시험	Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate 배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 배양 관찰하여 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.			2022.05.03 -2022.05.19	적합, 부적합
방부제 정량시험	포르말린 함량은 0.2% 이하 이어야 한다.			2022.05.03	0.119 %
안전시험	닭 (3~4주령) 5마리 - 시험군 5마리(근육, 2수분) - 14일간 관찰하여 모두 건강하여야 한다.			2022.05.03 -2022.05.19	적합, 부적합
판정결과	<div style="border: 2px solid blue; padding: 5px; display: inline-block;">PASSED</div>			시 험 자	최영실 (서명) 2022.05.05 하지현 (서명) 2022.05.05 (서명) (서명)
				확 인 자	김성기 (서명) 2022.05.05
				책 임 자	김성기 (서명) 2022.05.05

제 품 명	PRO-VAC SAL-NEW3			지 시 자	김성기 (서명)
지시 번호	Q-BA22051001	지시 년월일	2022.05.10		
제조 수량	33	검체 채취량	3	합격수량	30
제조 번호	Sal-new3-02			제조년월일	2022.05.09
시험 항목	허용 범위			시험 일자	결과
특성시험	유백색 내지 황갈색의 혼탁한 부유액이며 내용물의 성상이 균일하고 정치하면 백신 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 된다.			2022.05.10	적합, 부적합
수소이온 농도시험	pH 6.0 ~ 8.0 이내 (pH 측정기를 이용한 측정법)			2022.05.10	pH 7.09
무균시험	Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate 배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 배양 관찰하여 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.			2022.05.10 2022.05.24	적합, 부적합
방부제 정량시험	포르말린 함량은 0.2% 이하 이어야 한다.			2022.05.10	0.106%
안전시험	닭 (3~4주령) 5마리 - 시험군 5마리(근육, 2수분) - 14일간 관찰하여 모두 건강하여야 한다.			2022.05.10 2022.05.24	적합, 부적합
판정결과	PASSED			시 험 자	최운실 (서명) 2022.05.24 한지현 (서명) 2022.05.10 (서명) (서명)
				확 인 자	박제민 (서명) 2022.05.24
				책 임 자	김성기 (서명) 2022.05.24



(주)코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

제 품 명	PRO-VAC SAL-NEW3			지 시 자	김성기
지시 번호	2022051701	지시 년월일	2022.05.17		
제조 수량	33	검체 채취량	3	합격수량	30
제조 번호	sal-new3-03			제조년월일	2022.05.16
시험 항목	허용 범위			시험 일자	결과
특성시험	유백색 내지 황갈색의 혼탁한 부유액이며 내용물의 성상이 균일하고 정치하면 백신 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 된다.			2022.05.17	적합, 부적합
수소이온 농도시험	pH 6.0 ~ 8.0 이내 (pH 측정기를 이용한 측정법)			2022.05.17	pH 7.16
무균시험	Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate 배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 배양 관찰하여 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.			2022.05.17 2022.05.31	적합, 부적합
방부제 정량시험	포르말린 함량은 0.2% 이하 이어야 한다.			2022.05.17	0.128%
안전시험	닭 (3~4주령) 5마리 - 시험군 5마리(근육, 2수분) - 14일간 관찰하여 모두 건강하여야 한다.			2022.05.17 2022.05.31	적합, 부적합
판정결과	PASSED			시 험 자	최은진 (서명) 2022.05.31 한외권 (서명) 2022.05.17 (서명) (서명)
				확 인 자	박재민 (서명) 2022.05.31
				책 임 자	김성기 (서명) 2022.05.31

D. 수출용 허가 취득 및 해외 수출

본 과제에서 개발하고자 하는 살모넬라 3가 불활화 예방 백신의 조속한 제품화를 위하여 국내 및 해외에 대하여 개별적으로 품목허가를 진행하고자 하였다. 특히, 주관연구기관으로부터 기술이전 받은 3종의 살모넬라 균주를 활용하여, 기존에 코미팜에서 생산하던 방식의 포르말린 불활화 사균체 백신 제조 기술을 기반으로 “프로백 살모가드”라는 제품에 대한 수출용 허가를 우선 취득하였고, 2022년에 1차적으로 56,000 달러와 65,208 유로의 매출을 기록하였다. 본 과제를 통하여 개발중인 뉴노멀 사균체 백신 제조기술의 경우에도 생산부서로 기술이전이 완료된 상태로 후속 수출용 허가를 취득하여 효능적으로 개선된 제품을 수출에 적극 활용할 것이다.

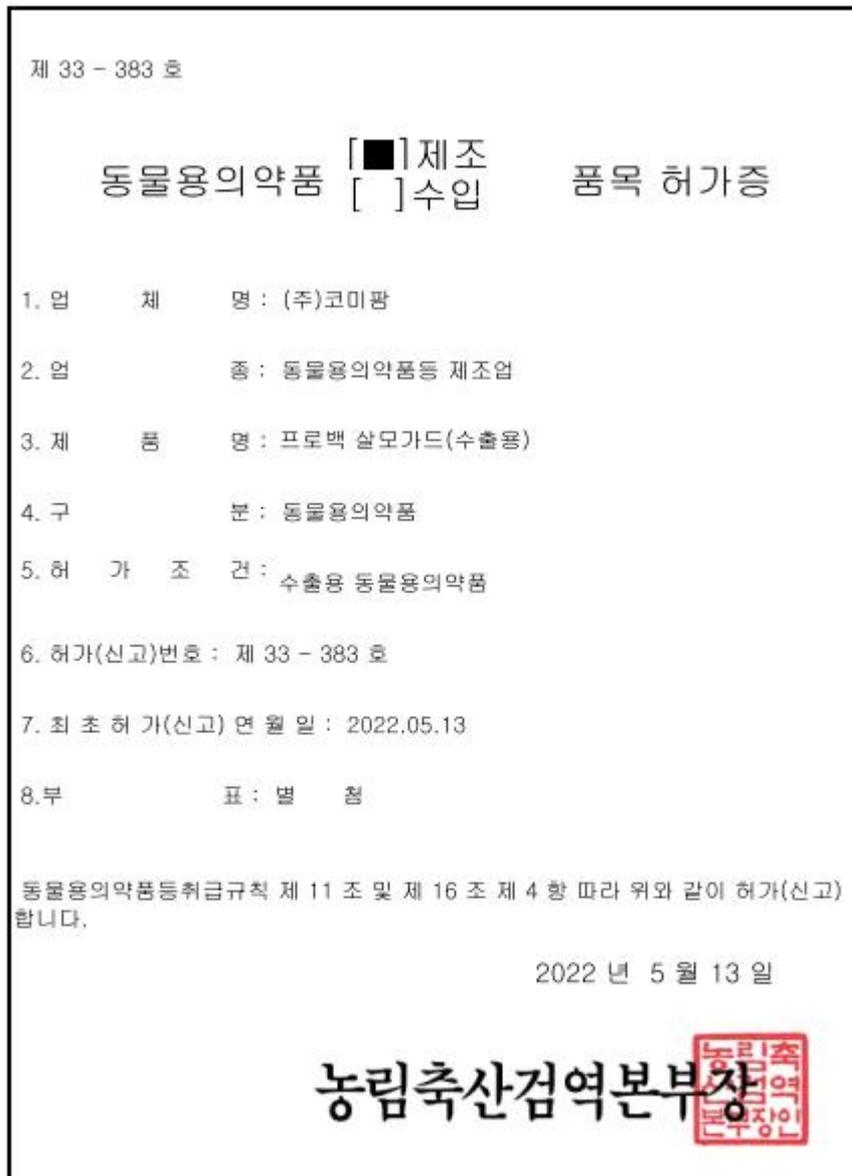


그림 18. 허가증

E. 임상시험 신청 및 보완사항 대응

1차년도 연구 결과를 토대로, 살모넬라 갈리나룸, 엔터리티디스 및 티피무름을 포함하는 뉴노

멸 살모넬라 3가 불활화 백신에 대한 전 임상 시험을 종료하고, 본격적인 제품화 단계에 착수하기 위한 임상시험 신청을 진행하고자 한다. 임상시험 승인을 위해서는 허가 기관인 농림축산검역 본부로부터 임상시험 승인을 받아야 하며, 이 과정에서 임상시험 승인 받고자 하는 백신의 안전성과 유효성이 입증되어야 하며, 3개 임상시험 농장에 대한 계약이 체결되어 있어야 한다. 22년 중에 임상시험 계획서를 농림축산검역본부로 제출하고, 기술검토 사항에 대한 보완 절차를 거쳐, 23년도 1/4분기 중에는 임상시험이 승인될 수 있도록 할 것이다.

<2차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(전북대학교 산학협력단) : 연속 3 Lot 시험 백신 야외 임상 시험 및 시판 백신과의 효능 비교 평가

- 협동연구기관((주) 코미팜) : 백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 평가 및 품목 허가 신청

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(전북대학교 산학협력단) : 연속 3 Lot 시험 백신 야외 임상 시험 및 시판 백신과의 효능 비교 평가

A. 3개 농장 대상 야외 임상시험

(1) ㈜ 코미팜에서 제조된 연속 3 Lot 시험 백신 3개 양계 농장을 대상으로 야외 임상 시험

가. 연구개발과제의 수행과정

a. 시험백신에 대한 안전성 평가

1) 실험동물 : 각각의 임상시험 농장에 대하여 6주령의 산란계 각 20수씩을 공시한다.

2) 백신 접종

① 과용량 안전시험 : 공시 동물에 대하여 6주령에 시험백신 2수 분 (1.0 ml)을 접종방법 (앞가슴 근육 혹은 경부피하 혹은 대퇴부 근육) 따라 접종하고, 3주 간 접종부위 이상반응 등 임상증상 유무를 확인한다.

② 규정보용량 안전시험 : 공시 동물에 대하여 6주령에 시험백신 1수 분 (0.5 ml)을 접종방법 (앞가슴 근육 혹은 경부피하 혹은 대퇴부 근육) 따라 접종하고, 3주 후에 1수 분을 동일한 방법으로 추가로 접종 후, 3주간 접종부위 이상 반응 등 임상증상 유무를 확인한다 (그림 18).

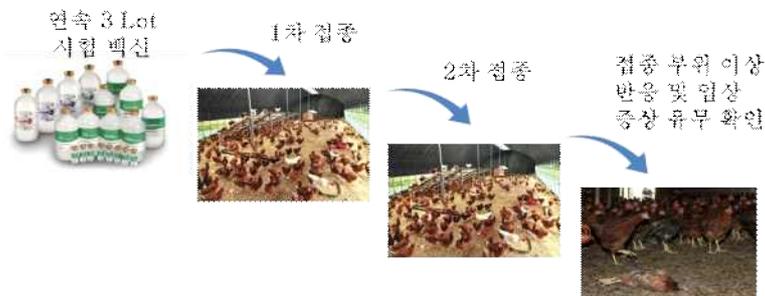


그림 18. 닭에서 연속 3 Lot 시험백신의 규정 용량 안전 시험 개요

b. 시험백신에 대한 효능 평가

- 1) 실험동물 : 각각의 임상시험 농장에 대하여 6주령의 산란계 전 수를 공시한다.
- 2) 백신 접종 : 공시 동물에 대하여 6주령에 시험백신 1수 분 (0.5 ml)을 접종방법 (앞가슴 근육 혹은 경부피하 혹은 대퇴부 근육) 따라 접종하고, 3주 후에 1수 분을 동일한 방법으로 추가로 접종한다.
- 3) 비접종 대조군 : 공시 농장의 최소 1개 동 이상을 비접종 대조군으로 설정하고, 시험백신접종을 제외한 나머지 백신 접종프로그램은 동일하게 한다.
- 4) 관찰 및 시료 채취 : 시험백신 접종군 및 비접종 대조군에 대하여 20수씩을 임의로 선정하여 접종 전, 접종 4주 후, 접종 8주 후, 접종 12주 후, 접종 16주 후 및 접종 20주 후에 각각 채혈 및 분변을 swab 하여 검사에 사용한다.
 - ① 항체가 검사
 - 각 혈청에 대하여 평판응집항체가 및 ELISA법으로 살모넬라에 대한 항체가 수준을 확인한다.
 - 각 혈청에 대하여 AIV, NDV, IBV, EDSV 등의 항체를 검사하여 살모넬라 외 다른 질병에 대한 감염 유무를 모니터링 한다.
 - ② 분변으로의 살모넬라 균 shedding 검사
 - 각 시기별 분변으로의 살모넬라 균 shedding 유무를 아래와 같은 PCR법으로 확인한다.

표 10. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 감별을 위한 특이 프라이머 및 PCR 증폭 산물 크기

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ENTF	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG	304
	ENTR	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>ratA</i> ROD F	ATT GCT CTC GTC CTG GGT AC	571
	<i>ratA</i> ROD R	TAC CGA TAC GCC CAA CTA CC	

- 5) 폐사율 확인 : 시험백신 접종 후, 비접종 대조군과 함께 각 농장별로 공시 계에 대한 폐사수를 기록하며, 각 채혈 시기별로 농장 정기 방문 시 마다 폐사 계를 일괄 수거하여, 폐사원인을 진단한다. 또한, 주간 폐사율이 평균치 이상으로 나타날 경우 즉시 농장을 방문하여 시험백신 접종과 폐사율 증가에 대한 상관관계가 있는지 확인한다. (정상 주간 폐사율은 0.2% 이하로 보고, 주간 누적폐사율이 0.2% 넘을 경우에는 채혈 시기와 상관없이 방문)
- 6) 산란율 확인 : 각 농장별로 시험백신 접종 이후 공시계의 주간 산란율을 기록하며, 비접종 대조군과 산란율을 비교해본다. 산란율 저하가 확인될 시, 혈청검사 혹은 병원체 확인검사법을 통해서 그 원인을 확인한다.

나. 수행내용

a. 시험백신에 대한 안전성 평가

- ① 과용량 안전시험 : 공시 동물에 대하여 6주령에 시험백신 2수 분(1.0 ml)을 접종방법(앞가슴 근육 혹은 경부피하 혹은 대퇴부 근육)에 따라 접종하고, 3주 간 접종부위 이상반응 등 임상 증상 유무를 확인한 결과 이상 반응 및 폐사 등 임상 증상이 나타나지 않았음.
- ② 규정용량 안전시험 : 공시 동물에 대하여 6주령에 시험백신 1수 분 (0.5 ml)을 접종방법 (앞가슴 근육 혹은 경부피하 혹은 대퇴부 근육) 따라 접종하고, 3주 후에 1수 분을 동일한 방법으로 추가로 접종 후, 3주간 접종부위 이상 반응 등 임상증상 유무를 확인한 결과 이상 반응 및 폐사 등 임상 증상이 나타나지 않았음.

b. 시험백신에 대한 효능 평가

① 항체가 검사

- 각 혈청에 대하여 평판응집항체가 및 ELISA법으로 살모넬라에 대한 항체가 수준을 확인한 결과 가, 나, 다 농장 모두 접종 전에 비해 1차 접종 후 유의미한 정도의 높은 항체 역가가 측정되었음. 가 농장의 경우 1차 및 2차 접종 후 높은 항체역가가 측정되어 16 WPPI 까지 유지되다 20 WPPI부터 항체 역가가 소폭 감소한 것을 확인 할 수 있었고, 나 와 다 농장의 경우 1차 및 2차 접종 후 높은 항체 역가를 유지하다 16 WPPI 이후부터 항체역가가 점차 감소하는 양상을 확인 할 수 있었음.

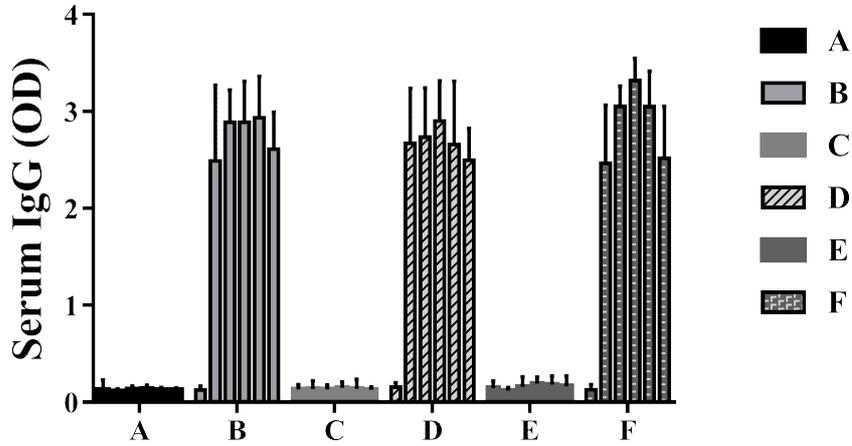


그림 19. 각 농장 별 면역 항체 유도 여부 확인 결과. (A) 가 농장의 음성대조군, (B) 가 농장의 백신접종군, (C) 나 농장의 음성대조군, (D) 나 농장의 백신접종군, (E) 다 농장의 음성대조군, (F) 다 농장의 백신접종군. 모든 그룹의 막대기는 왼쪽부터 각 0, 4, 8, 12, 16, 20 WPPI를 나타냄.

- 각 혈청에 대하여 AIV, NDV, IBV, MG 등의 항체를 검사하여 살모넬라 외 다른 질병에 대한 감염 유무를 모니터링 한 결과 AI의 경우 가, 나, 다 농장 모두에서 양성률이 0%로 확인되었고, ND의 경우 가농장의 음성대조군에서 5%, 백신군에서 5%의 양성률이 확인되었고, 나 농장의 경우 음성대조군에서 5%, 백신군에서 10%의 양성률이 확인되었으며, 다 농장의 경우 음성대조군에서 0%, 백신군에서 10%의 양성률이 확인되었음. IB의 경우 가, 나, 다 농장의 음성대조군과 백신군 모두에서 100%의 양성률이 확인되었음. MG의 경우 가, 나, 다 농장의 음성대조군과 백신군 모두에서 0%의 양성률이 확인되었음(그림 20).

A형 인플루엔자(AI) 항체검사 결과표 (BIONOTE)				
번호	검사기관	검사자	검사일자	
1	동물위생시험소 질병진단과	양승혁	2024-02-05	
농장정보입력				
검수번호	농장	검사수수	양성수수	양성률
1	가 음성 대조군	20	0	0.0%
2	가 백신군	20	0	0.0%
3	나 음성 대조군	20	0	0.0%
4	나 백신군	20	0	0.0%
5	다 음성 대조군	20	0	0.0%
6	다 백신군	20	0	0.0%

뉴캐슬바이러스(ND) 항체검사 결과표 (IDEXX)				
번호	검사기관	검사자	검사일자	
1	동물위생시험소 질병진단과	양승혁	2024-02-05	
농장정보입력				
검수번호	농장	검사수수	양성수수	양성률
1	가 음성 대조군	20	1	5.0%
2	가 백신군	20	1	5.0%
3	나 음성 대조군	20	1	5.0%
4	나 백신군	20	2	10.0%
5	다 음성 대조군	20	0	0.0%
6	다 백신군	20	2	10.0%

닭전염성기관지염(IB) 항체검사 결과표 (IDEXX)				
번호	검사기관	검사자	검사일자	
1	동물위생시험소 질병진단과	양승혁	2024-02-05	
농장정보입력				
검수번호	농장	검사수수	양성수수	양성률
1	가 음성 대조군	20	20	100.0%
2	가 백신군	20	20	100.0%
3	나 음성 대조군	20	20	100.0%
4	나 백신군	20	20	100.0%
5	다 음성 대조군	20	20	100.0%
6	다 백신군	20	20	100.0%

마이코플라즈마 갈리셉티쿰(MG) 항체검사 결과표 (IDEXX)				
번호	검사기관	검사자	검사일자	
1	동물위생시험소 질병진단과	양승혁	2024-02-05	
농장정보입력				
검수번호	농장	검사수수	양성수수	양성률
1	가 음성 대조군	20	0	0.0%
2	가 백신군	20	0	0.0%
3	나 음성 대조군	20	0	0.0%
4	나 백신군	20	0	0.0%
5	다 음성 대조군	20	0	0.0%
6	다 백신군	20	0	0.0%

그림 20. 각 농장의 AIV, NDV, IBV, MG 등의 항체를 검사하여 감염 유무를 모니터링 한 결과

② 분변으로의 살모넬라 균 shedding 검사

- 각 시기별 분변으로의 살모넬라 균 shedding 유무를 PCR을 통해 관찰한 결과 모든 개체에서 살모넬라 균이 검출되지 않았음.

③ 폐사율 확인 : 시험백신 접종 후, 비접종 대조군과 함께 각 농장별로 공시 계에 대한 폐사수를 기록하고, 주간 폐사율이 평균치 이상으로 나타날 경우 즉시 농장을 방문하여 시험 백신 접종과 폐사율 증가에 대한 상관관계가 있는지 확인한 결과 나, 다 농장 백신군에서 각각 1수씩 폐사하였고, 모든 농장에서 음성대조군에서는 폐사 개체가 발생하지 않았음. 그러나 두 건 모두 백신 접종 4주 이후에 발생하여 백신 접종으로 인한 폐사가 아닌 환경적 요인에 의한 폐사로 여겨짐.

- ④ 산란율 확인 : 각 농장별로 시험백신 접종 이후 공시계의 주간 산란율을 기록하며, 비접종 대조군과 산란율을 비교한 결과 각 농장 별로 최초 산란개시일로부터 3주차에 이르기까지 음성 대조군과 백신접종군의 산란율 차이가 최소 0.7개, 최대 6.1개 까지 측정되었으나, 4주차 이후부터 점차 비슷한 정도의 산란율을 나타내었음. 5주차의 나 농장에서 음성 대조군과 백신접종군 간의 산란율 차이가 약 4.6개 발생한 것을 제외하고는 5주차 이상부터는 주차별 최대 4개 이하의 차이가 확인되었음(표 11). 10주차 까지 산란율 측정 예정이며 최종 관찰 및 결과 정리는 최종 보고서에 첨부할 예정임.

표 11. 각 농장별 시험백신 접종 이후 공시계의 주간 산란율

(단위: 개)

구분	가 농장		나 농장		다 농장	
	음성대조군	백신접종군	음성대조군	백신접종군	음성대조군	백신접종군
산란개시일 포함 주(1주차)	5.0	4.3	6.7	3.7	4.7	2.3
2주차	10.7	7.9	11.3	5.6	9.0	7.6
3주차	16.0	11.7	16.1	10.0	13.9	11.7
4주차	16.9	13.9	16.7	14.0	14.4	14.4
5주차	17.3	15.6	18.7	14.1	15.3	16.6
6주차	17.7	17.4	18.6	16.1	17.0	16.9
7주차	18.0	17.6	18.9	15.7	16.6	17.7
8주차	18.7	17.1	19.1	15.4	16.7	18.4
9주차						
10주차						

B. 시판 백신과의 효능 비교 평가

(1) ㈜ 코미팜에서 제조된 시험 백신과 시판되고 있는 약독화 생균 백신과의 효능 비교 평가

가. 연구개발과제의 수행과정

a. 살모넬라 시험 백신과 국내에서 시판되고 약독화 생균 백신인 SG9R을 산란계 닭을 대상으로 각각 추천하는 방법에 따라 접종

1) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용

2) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs나 LPS에 음성인 닭만을 실험에 사용 [또는 AccuPower® Bacterial Poultry 3-Plex PCR Kit (Bioneer, South Korea)에서 살모넬라 음성인 닭을 실험에 사용] . 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 9에 서술되어 있는 대로 시험 백신은 근육 내로 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종. 약독화 생균 백신인 SG9R은 6주령 산란계에 피하로 1회 접종 (그림 21)



그림 21. 산란계를 대상으로 시험 백신과 시판 SG9R 약독화 생균 백신의 효능 비교 평가의 실험 개요

표 9. 산란계를 대상으로 시험 백신과 시판 SG9R 약독화 생균 백신의 효능 비교 평가의 실험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	도전감염 (12주령)	부검 (14 주령)
A	-	-	-	도전감염 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 도전감염 2주 후에 생존한 모든 가금을 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 각 조직에서의 균 분리
B	PBS	PBS	야외 독성 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주 경구 접종	
C	시판 약독화 생균 (피하접종)	-		
D	시험 백신 (근육접종)	시험 백신 (근육접종)		

- b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인
- 1) 시험 백신의 접종을 기준으로 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(3 WPPI), 도전감염 전 (6 WPPI) 그리고 부검 전(8 WPPI)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리
 - 2) 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs 또는 LPS를 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정
- c. 2차 접종 후 10일 째에 혈액 또는 비장 세포로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 등 측정
- 1) 2차 접종 후 10일째에 각 그룹에서 5마리씩 채혈하고 닭의 비장을 채취하기 위해 희생하고, 비장들은 무균적으로 채취
 - 2) 혈액 및 비장은 이전의 연구 Hur 등 (Hur et al., 2016)에서 기술된 방법에 따라 준비.
- ① 즉, 각 그룹별로 5마리의 닭을 마지막 예방 접종 후 10일 째에 각각 무균적으로 spleen을 채

- 취하여 RPMI 1640에 모음.
- ② 그다음 0.8% 염화 암모늄 (ammonium chloride) (w/v)를 이용하여 적혈구 용해, 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척.
 - ③ 마지막 원심 후 complete medium (100IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin 및 10% FCS 을 포함하는 RPMI 1640)으로 재 부유.
 - ④ 배양을 위한 세포 수를 계산하여 각 살모넬라 OMPs로 12시간 반응
 - ⑤ 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 상층액을 -80°C에 보관하며 ELISA로 사이토카인 농도 측정. 또는 형광물질이 부착된 CD3, CD4, CD8 단클론 항체를 이용하여 FACs로 CD3⁺CD4⁺ T-cells과 CD3⁺CD4⁺ T-cells의 분포 비교 분석.
- d. 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔테라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살 모넬라 갈리나룸을 동량 혼합하여 경구 접종
- 1) 2차 접종 후 3주 째에 야외 독성 살모넬라 엔테라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 각각 동 균수로 혼합하여 경구 접종
- e. 도전감염 후 2주간 폐사 여부 확인 및 생존 닭으로부터 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총배 설강)에서 살모넬라 엔테라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외 독성 균주분리 및 동정
- 1) 2차 접종 후 3주 째에 야외 독성 살모넬라 엔테라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 혼합하여 도전감염한 경우
 - ① 2주간 하루에 두 번 씩 폐사 여부 확인
 - ② 2주 후 부검을 통해 육안적 소견 관찰, 육안적 소견에서 이상 증후가 관찰된 조직에 대해 조 직학적 소견 관찰
 - ③ 2주 후 생존한 모든 가금을 희생시켜 비장, 간, 맹장 등에서 살모넬라 엔테라이티디스와 살모 넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 균 분리 및 균주별 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 최종 확인 (표 10)

표 10. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균별 특이 프라이머 및 PCR 증폭 산물 크기

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ENTF	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG	304
	ENTR	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>ratA</i> ROD F	ATT GCT CTC GTC CTG GGT AC	571
	<i>ratA</i> ROD R	TAC CGA TAC GCC CAA CTA CC	

나. 수행내용

- a. 살모넬라 시험 백신과 국내에서 시판되고 약독화 생균 백신인 SG9R을 산란계 닭을 대상으로 각각 추천하는 방법에 따라 접종한 결과 백신 접종으로 인한 식욕부진, 침울 및 폐사 등 임상

증상 관찰되지 않음.

- b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부를 확인한 결과 음성대조군과 양성대조군인 A, B 그룹의 경우 0, 3, 6 WPPI에 항체 역가의 변화가 없었고, 시판중인 약독화 생균백신 SG9R을 1회만 접종한 그룹인 C 그룹의 경우 1차 접종후인 3WPPI에는 항체역가가 증가한 것을 확인 할 수 있었으나 접종 후 6주 후인 6 WPPI에는 항체 역가가 소폭 감소한 것을 확인 할 수 있었음. 살모넬라 3가 백신을 2회 접종한 그룹인 D그룹의 경우 1차 접종 후인 3 WPPI에 항체 역가가 증가하였고, 2차 접종 후인 6 WPPI에는 3WPPI에 비해 항체역가가 소폭 증가한 것을 확인 할 수 있었음(그림 22)

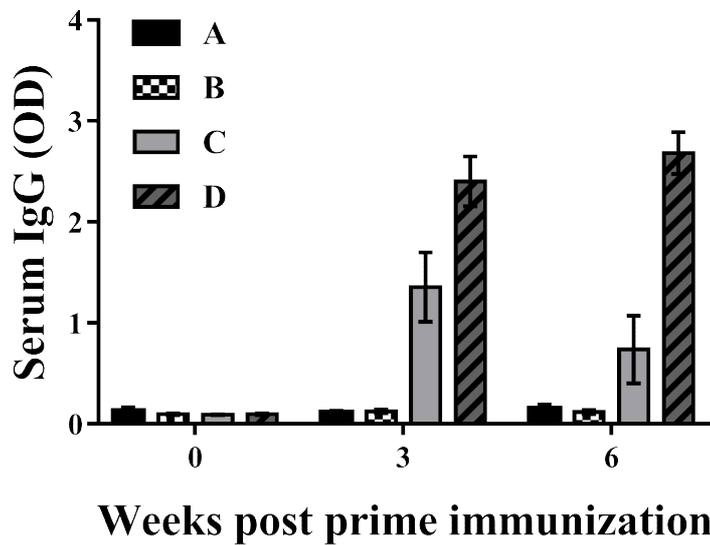


그림 22. ELISA kit를 이용하여 면역 항체 유도 여부 확인 결과

- c. 2차 접종 후 10일 째에 혈액으로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 등을 측정 한 결과 음성대조군인 A그룹과 백신 접종 그룹인 C, D 그룹의 혈액에서 분리된 림프구를 각 *S.Enteritidis*, *S.Gallinarum*, *S.Typhimurium* OMPs로 자극하고 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 를 측정 한 결과 음성대조군에서의 CD3⁺CD4⁺ 보다 백신접종군인 C, D 그룹에서의 가 CD3⁺CD4⁺ 유의적으로 높게 측정되었고, CD3⁺CD8⁺의 경우에도 음성대조군인 A그룹에 비해 백신 접종군에서 CD3⁺CD8⁺가 유의적으로 높게 측정되었고, SE OMPs로 자극하였을 경우 백신을 혼합접종한 그룹에서 가장 높은 정도의 CD3⁺CD8⁺가 측정되었으나 SG, ST OMPs로 자극하여 측정 한 CD3⁺CD8⁺는 살모넬라 3가 백신을 접종한 그룹인 D그룹에서 가장 높게 측정되었다(그림 23).

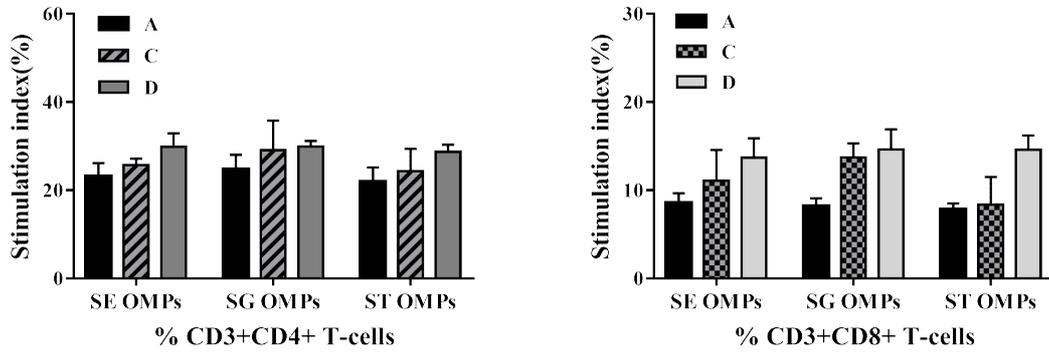


그림 23. 혈액으로부터 분리된 림프구로부터 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺를 측정된 결과

d. 2차 접종 후 10일 째에 혈액으로부터 분리된 림프구로부터 각 항원으로 재 자극한 후 Sivasankar et al.(2023)의 논문을 참고하여 Real-time PCR을 진행하였다(표 11). 실험결과 동일한 그룹의 개체에서도 개체별 편차가 크고, 대조군과의 유의미한 차이가 나지 않아 신뢰도 있는 결과라고 판단되지 않는다(그림 24). 이에 따라 정확한 결과를 얻기 위해 현재 Real-time PCR에 대한 세팅 중이며, 또다른 논문인 Al-Aneed et al.(2024) 등의 방법을 참고하여 실험을 진행 할 예정이다(표 12). 덧붙여, 닭에서 싸이토카인을 측정하는 다른 방법으로 Cusabio Biotech, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)사의 Chicken IFN γ , IL2, TNF α 등 ELISA Kit 사용 등이 있으나 실험 결과에 대한 회의적인 부분으로 인해 ELISA에 의한 싸이토카인 측정은 진행 하지 않았다.

표 11. Previously used sequence

Primer	Sequence	Source of reference
TNF α F	CTTCTGAGGCATTTGGAAGC	Sivasankar et al., (2023)
TNF α R	ACTGGGCGGTCATAGAACAG	
IFN γ F	CAAAGCCGCACATCAAACA	
IFN γ R	TTTACCTTCTTCACGCCAT	
IL-1 β F	CTACACCCGCTCACAGTCCT	
IL-1 β R	TCACTTTCTGGCTGGAGGAG	
IL2 F	ATCTTTGGCTGTATTTCCGGTAG	
IL2 R	TGGGTCTCAGTTGGTGTGTAG	
IL4 F	GGAGAGCATCCGGATAGTGA	
IL4 R	TGACGCATGTTGAGGAAGAG	
GAPDH F	AGAACATCATCCCAGCGTCC	
GAPDH R	CGGCAGGTCAGGTCAACA	

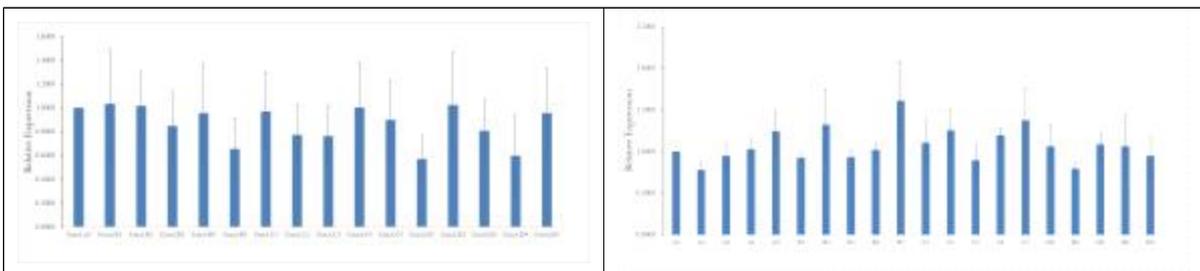




그림 24. Results of measuring cytokines using existing sequences. Neither the individual results of the control group nor the results of the vaccinated group show significant differences.

표 12. New sequence to use

Primer	Sequence	Source of reference
IFN γ F	ATGTAGCTGACGGTGGACCTAT	Al-Aneed et al., (2024)
IFN γ R	TTCACCTTCTTCACGCCATCAG	
IL22 F	GGATGGGTTGTCTTCTGCTGT	
IL22 R	ATGTAGGGCTGCTGGAAGTTG	
IL17A F	TCCCCAAACTGTGAGAGTCA	
IL17A R	ACTGGGCATCAGCAACCAAG	
IL4 F	ACATCCAGGGAGAGGTTTCCT	
IL4 R	TGACGCATGTTGAGGAAGAGAC	

※ 참고문헌

Sivasankar, C., Hewawaduge, C., & Lee, J. H. (2023). Screening of lipid-A related genes and development of low-endotoxicity live-attenuated *Salmonella gallinarum* by *arnT* deletion that elicits immune responses and protection against fowl typhoid in chickens. *Developmental & Comparative Immunology*, 145, 104707.

Al-Aneed, B., Masoudi, A. A., Katalani, C., Ahmadian, G., Hajizade, A., & Razmyar, J. (2024). Evaluation of the Expression of IFN- γ , IL-4, IL-17, and IL-22 Cytokines in Birds Immunized with a Recombinant Chimeric Vaccine Containing Alpha Toxin, NetB, and ZMP against Necrotic Enteritis. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 11(1), 229-1235.

- e. 백신 2차 접종 후 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 엔테라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸을 혼합하여 음성대조군인 A 그룹을 제외한 모든 닭에 경구 접종하고 14일간 생존율을 관찰한 결과 양성대조군인 B 그룹에서 공격접종 7일차에 1수가 폐사하기 시작하였고, 8일차에 1수, 9일차에 2수, 10-12일차에 각 1수씩 폐사하였고 부검일인 14일차에 3수 폐사하여 양성대조군 10수 중 모든 개체가 폐사하였으나 음성대조군을 포함한 모든 백신군의 경우 모든 개체가 생존하였다(그림 25).

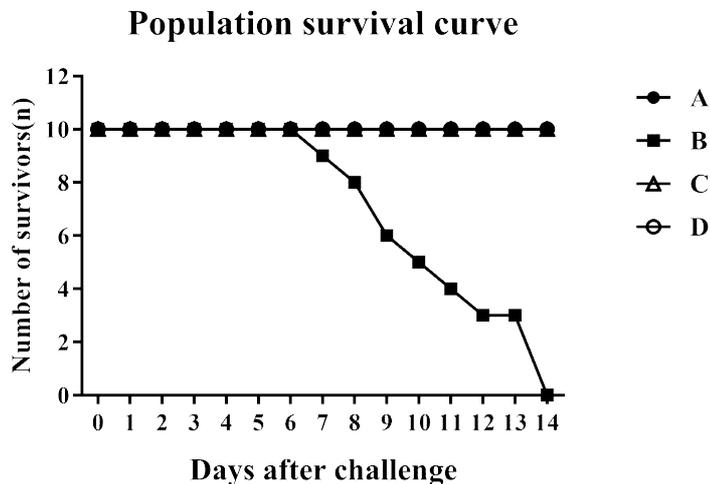


그림 25. SE, SG, ST 균주를 혼합하여 경구로 공격접종 후 14일간 생존율 그래프

- e. 공격접종 후 2주간 폐사 여부 확인 및 생존 닭으로부터 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총배설강)에서 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 살모넬라 갈리나룸 야외독성 균주분리 및 동정한 결과 음성대조군인 A 그룹에서는 균분리를 시도한 모든 조직에서 *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium*이 검출되지 않았고, 양성대조군인 B 그룹의 경우 모든 개체가 SG로 인해 폐사하였으며, SG 9R로 면역화된 그룹 C의 경우 Cecum, Cloaca에서 SG 검출율이 각 10% 씩으로 낮게 나타났으나, SE, ST의 경우 한 마리에서 Liver, Spleen에서 ST가 검출되었고 Cecum, Cloaca의 경우 SE가 각 70%의 비율로 검출되었고, ST의 경우 각 90, 70%의 비율로 검출되었다. 시험백신으로 면역화한 그룹 D의 경우에도 SE, SG, ST가 검출되었으나 각 장기별 최대 50%가 넘지 않는 비율로 검출되었다.

표 13. 공격접종 후 각 조직에서의 균분리하여 증균배양 후 동정 결과

그룹 / 조직	부검 두수	증균배양 결과											
		<i>S. Enteritidis</i>				<i>S. Gallinarum</i>				<i>S. Typhimurium</i>			
		Liver	Spleen	Cecum	Cloaca	Liver	Spleen	Cecum	Cloaca	Liver	Spleen	Cecum	Cloaca
A	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	10	0	1	7	7	0	0	1	1	1	1	9	7
D	10	0	1	5	2	3	3	0	0	1	0	5	4

C. 백신 접종 프로그램 연구

(1) ㈜코미팜에서 제조한 시험 백신과 시판 중인 약독화 생균 백신과의 최적 백신 접종 프로그램 평가

가. 연구개발과제의 수행과정

a. ㈜코미팜에서 제조한 시험백신과 시판되고 있는 약독화 생균백신을 표 11에서 제시한 바와 같이 피하 또는 근육 접종 (그림 26, 표 14)

- 1) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용
- 2) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 6주령이 되었을 때 채혈한 후 각 그룹 별로 표 11에 서술되어 있는 대로 약독화 생균 백신인 SG9R은 피하 접종을, 시험 백신은 근육 접종, 6주 후인 12주령이 되었을 때 그룹 C와 D의 모든 산란계에 시험 백신을 근육 접종



그림 26. 산란계를 대상으로 살모넬라 백신 프로그램 연구 실험 개요

표 14. 갈색레그혼종을 대상으로 한 살모넬라 백신 프로그램 연구 실험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (12주령)	정기적 채혈 (16, 20, 24, 28, 32주령)
A	PBS (근육)	PBS (근육)	2차 접종 후 4주, 8주, 12주, 16주, 20주째에 각각 채혈하여 serum IgG 항체 역가 측정
B	SG9R (피하)	-	
C	SG9R (피하)	시험 백신 (근육)	
D	시험백신 (근육)	시험백신 (근육)	

b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인

- 1) 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전(6 WPPI), 2차 접종 후 4주 (10 WPPI), 8주 (14 WPPI), 12주 (18 WPPI), 16주 (22 WPPI), 20주 (26 WPPI)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리
- 2) AccuPower® Bacterial Poultry 3-Plex PCR Kit (Bioneer, South Korea) 또는 IDEXX Salmonella enteritidis Ab X2 Test를 사용하여 serum IgG 역가 측정

나. 수행내용

- a. ㈜코미팜에서 제조한 시험백신과 시판되고 있는 약독화 생균백신을 표 12에서 제시한 바와 같이 피하 또는 근육으로 접종 함.
- b. 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs 또는 각 살모넬라 LPS를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인 결과 음성대조군인 A 그룹의 경우 0, 6, 10, 14, 18, 22, 26 WPPI 모두 항체역가의 유의미한 증가나 감소는 일어나지 않았음. SG9R 만을 접종한 그룹인 B 그룹의 경우 1차 접종후인 6 WPPI와 10 WPPI에는 높은 정도의 항체 역가를 나타내었으나 14 WPPI 이후 점차 감소하는 양상이 관찰되었음. SG9R로 1차 접종하고, 살모넬라 3가 백신으로 2차 접종하여 면역화시킨 C 그룹의 경우 0 WPPI에 비해 6, 10 WPPI에 B 그룹과 비슷한 정도의 항체 역가를 나타내었으나 2차 접종 후인 14 WPPI의 경우 항체 역가가 점차 떨어지는 양상을 보이는 B 그룹에 비해 유의미한 정도의 항체역가의 상승을 나타내었고, 26 WPPI 까지 높은 항체 역가를 유지하는 것을 확인 할 수 있었음. 살모넬라 3가 백신으로 1차, 2차 접종하여 면역화한 그룹인 D 그룹의 경우 접종전인 0 WPPI 보다 1차 접종후인 6 WPPI에 모든 그룹중 가장 높은 정도의 항체 역가로 상승하였고, 2차 접종 및 이후 항체역가 측정 결과에서도 26 WPPI를 제외하고는 모든 그룹 중 가장 높은 정도의 항체 역가가 관찰되었음(그림 27).

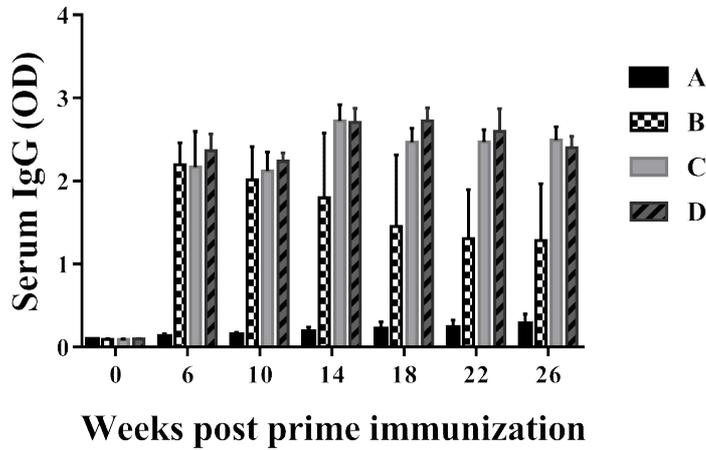


그림 27. 정기적으로 채혈하여 면역 항체 유도 여부 확인 결과

- 협동연구기관((주) 코미팜) : 백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 평가 및 품목 허가 신청

A. 백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 시험

a. 시험법

동물용의약품 국가출하승인검정 기준 중 “1-3-02-01 가금티푸스 불활화백신 검정기준”과 “1-3-02-07 살모넬라 엔터리티디스, 살모넬라 티피무름 불활화 백신”의 검정 기준에 준하여, 특성시험, 수소이온농도시험, 무균시험, 방부제 정량시험, 안전시험 및 혈청역가시험을 실시함

* 백신의 24개월 유효기간을 확인하기 위해서는 제조직후, 제조 후 3개월, 제조 후 6개월, 제조 후 9개월, 제조 후 12개월에 대한 정기적 자가 검정 시험이 실시하였으나 제조 후 18개월, 제조 후 24개월에 대한 자가검정시험이 도래 시간에 맞추어 진행할 계획함.

b. 자가검정시험

1) 특성시험

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3°C 냉장소에 보관하면서 2개 이상의 백신에 대하여 무색투명한 용기의 백신은 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~20 mm의 무색투명한 유리 용기에 옮겨서 색조, 투명도(흔탁도), 이물, 이취, 내용물의 균일성에 대하여 검사하였다. 3 Lot 모두 24개월 관찰 기간 동안 미색내지 황갈색의 현탁액으로 정치하면 불활화 균체의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균질화되며 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일함.

시험백신 3 Lot의 12개월 특성 시험 결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월
Sal-New3-01	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Sal-New3-02	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Sal-New3-03	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합

2) 수소이온농도시험

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3°C 냉암소에 보관하면서 수소이온 농도 시험을 진행한 결과 3 Lot 모두 12개월 관찰 기간 동안 수소이온 농도가 pH 6.0~8.0 이내로 잘 유지되고 있었다

시험백신 3 Lot의 12개월 수소이온농도 시험 결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월
Sal-New3-01	7.13	7.15	7.18	7.17	7.20
Sal-New3-02	7.08	7.12	7.15	7.16	7.20
Sal-New3-03	7.15	7.16	7.21	7.24	7.24

3) 무균시험

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3°C 냉암소에 보관하면서 무균 시험을 진행한 결과, 3 Lot 모두 12개월 관찰 기간 동안 nutrient broth, nutrient agar 사면 및 액체 thioglycolate 배지 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 없이 무균 상태가 잘 유지되고 있었다.

시험백신 3 Lot의 12개월 무균 시험 결과

제조번호	온도	배지	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월
Sal-New3-01	22°C	NA	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-
Sal-New3-02	22°C	NA	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-
Sal-New3-03	22°C	NA	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-

4) 방부제 정량시험

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3°C 냉암소에 보관하면서 방부제 정량시험을 진행한 결과 3 Lot 모두 12개월 관찰 기간 동안 프로말린 함량은 0.3% 이하로 기준에 적합함.

시험백신 3 Lot의 12개월 방부제 정량 시험 결과

제조번호	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월
Sal-New3-01	0.3% 이하				
Sal-New3-02	0.3% 이하				
Sal-New3-03	0.3% 이하				

5) 안전시험

살모넬라 갈리나룸, 엔터리티디스 및 티피무름에 감수성이 있는 3~4주령 닭 5마리를 사용하여 시험군에 백신 2수분을 사용법(근육)에 접종하고 14일간 관찰한 결과, 모든 시험군에서 관찰기간 동안 아무런 임상증상 없이 안전성이 보장됨을 확인함.

시험백신 3 Lot의 12개월 안전성 시험 결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월
	생존 수/공시 수 (임상증상)				
Sal-New3-01	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)
Sal-New3-02	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)
Sal-New3-03	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)	5/5 (이상 없음)

6) 효능시험

주관연구기관의 연구결과에 준하여 살모넬라 3종 불활화 백신에 적합한 검정기준을 적용하여 평가하였으며 모두 적합함

시험백신 3 Lot의 12개월 효능 시험 결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월
Sal-New3-01	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Sal-New3-02	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Sal-New3-03	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합

B. 품목허가 신청

1차년도 및 2차년도 연구 결과를 토대로, 살모넬라 갈리나룸, 엔터리티디스 및 티피무름을 포함하는 뉴노멀 살모넬라 3가 불활화 백신에 대한 전 임상 시험 및 종료하고, 야외 임상시험 신청함.

현재 농림축산검역본부로부터 보완요청이 있어 보완요청 대응 중에 있음

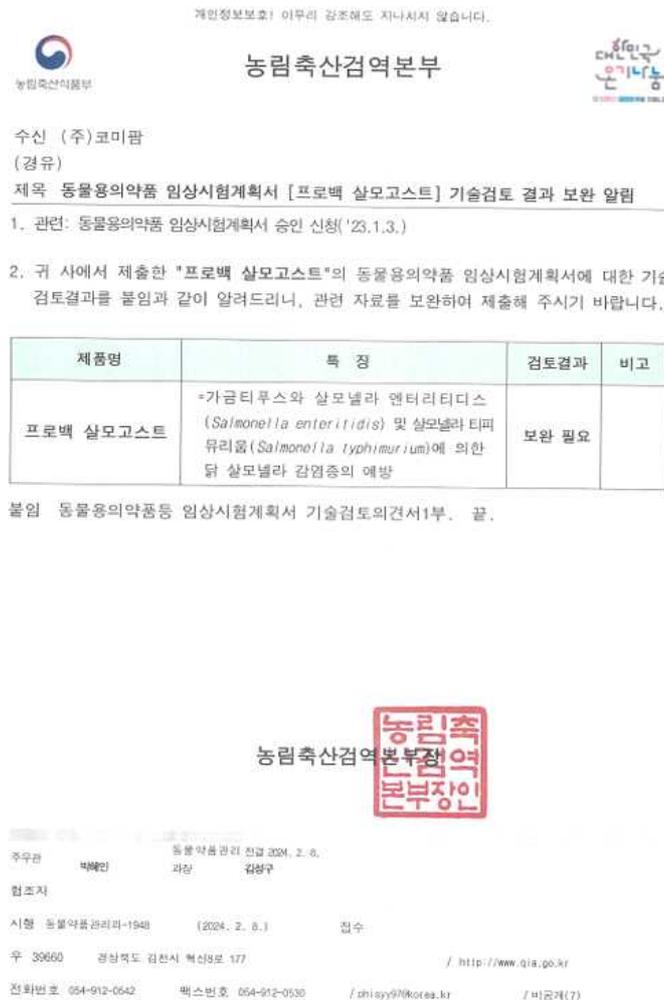


그림 28. 동물용의약품 임상시험계획서 [프로백 살모고스트] 기술검토 결과 보완 알림

C. 해외 임상시험

살모넬라 3가 불활화 백신 수출하여 농장 사용 평가 중

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

-
- **살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 안전성 및 유효성 평가**
 - 최적의 항원 함량을 결정하기 위해 다양한 항원 함량으로 제조된 시제품으로 산란계에 근육 접종 후 야외 병원성 살모넬라 갈리나룸, 엔터라이티디스, 타이피뮤리움 혼합균주로 도전감염에 따른 방어 여부로 최적의 각 살모넬라 사균체 항원 함량 결정
 - 갈색 산란계를 대상으로 한 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품의 안전성 확인 함
 - 갈색 산란계에 살모넬라 3가 백신 근육 접종 후 살모넬라 갈리나룸, 살모넬라 엔터라이티디스, 살모넬라 차이피뮤리움을 각각 경구로 도전감염하여 각 도전감염에 대한 유효성을 확인함
 - **연속 3 Lot 시험 백신의 방어 효능 평가**
 - 최종 결정된 항원 함량이 함유된 임상 시험 신청을 위한 연속 3 lot 시험 백신을 제조함
 - 연속 3 lot 시험 백신에 대한 일반적인 독성 평가를 진행함
 - 연속 3lot 시험 백신에 대한 닭을 대상으로 근육 접종 후 백신의 안전성을 확인함
 - 연속 3 lot 시험 백신을 산란계를 대상으로 근육 접종 후 야외 독성 살모넬라 균주로 도전감염에 대한 방어 효능 평가를 진행함
 - **살모넬라 3가 불활화 백신의 검정법 확립**
 - 백신 완제품에 대한 각 batch 별 품질검사를 위한 마우스에서의 품질 검사법 가능성을 평가함
 - 마우스에서 백신 근육 접종 후 항체 역가 비교 내지는 도전감염 후 방어 여부에 따른 백신의 품질 검사법 가능성 평가 및 확립을 위한 실험을 진행함
 - **살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 제조**
 - 뉴모델 불활화 *Salmonella Gallinarum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 사균체가 함유된 오일 기반 면역보강제가 함유된 살모넬라 3가 불활화 사균체 오일 백신 시제품 제작
 - **연속 3 Lot 시험 백신 제조**
 - 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 안전성 및 유효성 결과 근거하여 각 살모넬라 사균체 항원함량 결정 후 연속 3Lot 시험 백신 제조함
 - **연속 3 Lot 시험 백신에 대한 자가 검증시험**
 - 확립 된 자가 검정법에 따라 연속 3 Lot 시험 백신에 대한 자가 검정시험 실시함.
 - **수출용 허가 취득 및 해외 수출**
 - 살모넬라 3가 불활화 백신 (PRO-VAC™ SALMO-GURAD) 수출 허가 신청 완료
 - **임상시험 신청 및 보완사항 대응**
 - 야외 임상시험 수행을 위한 임상시험계획서 작성 및 제출함
 - 농림축산검역본부의 기술검토 의견에 따른 보완사항 대응 계획
 - **3개 농장 야외 임상 시험**
 - 시험백신 품목 허가를 위한 야외 임상시험 허가 후 3개의 닭 농장을 대상으로 야외 임상실험을 수행함
 - 백신 접종 군과 백신 미접종군에서의 살모넬라병 발생 양상을 비교함
 - **시판 백신과의 효능 비교 평가**
 - 목적동물인 산란계를 대상으로 현재 판매되고 있는 약독화 생균 백신은 피하접종 그리고 제작된 시험백신은 근육접종 후 야외 독성 균주로 도전감염 후 도전감염 균주에 대한 방어 여부로 시판 백신과 시험 백신의 효능을 비교 평가함
 - **백신 접종 프로그램 연구**
 - 기존 판매되고 있는 약독화 생균 백신과의 혼합사용 여부 결정을 위한 백신 혼합사용 결정 시험을 진행함
 - 시판 약독화 생균 백신만을 접종한 군, 시판 약독화 생균 백신 접종 후 추가 백신으로 시험 백신 접종군, 시험 백신 2회 접종 군을 각각 추천하는 방법에 따라 백신을 접종 한 후 항체 지속 기간 및 최종 백신 접종 후 일정 기간이 지난 후에 야외 독성 균주에 대한 방어 여부로 최적의 백신 프로그램을 결정함
 - **백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 평가**
 - 제조된 시험 백신의 품목 허가 사항 중 유효기간 설정을 위해 제조된 시험 백신의 정기적인 안
-

정성을 평가함, 유효기간 24개월 설정할 계획 현재까지 12개월까지 확인함

○ 품목 허가 신청

- 백신의 유효기간 자료, 3개 농장 야외 임상시험 결과 취합하여 제조품목허가 취득을 위한 허가 서류 작성 및 제출할 계획
- 농림축산검역본부의 기술검토 의견에 따른 보완사항 대응

○ 해외임상시험

- 살모넬라 3가 불활화 백신 수출하여 농장 사용 평가 중
- 수출용 백신 허가 후 판매증진을 위한 현지 농장 확대 임상 시험 실시

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2022~2023)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	비SCI논문	목표(단계별)	2		2	
		실적(누적)	2		2	
	학술발표	목표(단계별)	2		2	10
		실적(누적)	2		2	10
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술이전	목표(단계별)	1		1	10
		실적(누적)	1		1	10
	기술료	목표(단계별)	10,000		10,000	10
		실적(누적)	10,000		10,000	10
	제품화	목표(단계별)	2		2	15
		실적(누적)	2		2	15
	수출액	목표(단계별)	100,000		100,000	25
		실적(누적)	408,602		408,602	25
	고용창출	목표(단계별)	1		1	20
		실적(누적)	1		1	20
	인력양성	목표(단계별)	1		1	10
		실적(누적)	1		1	10
계						100
						100

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	산란계에서 Chlorhexidine -inactivated <i>Salmonella</i> Enteritidis, S. Typhimurium 및 S. Gallinarum 3가 백신의 효능평가	한국가축 위생학회 지	유영주, 허진	46,4	대한민국	한국동물위 생학회	비SCIE	2023.12.3 1	1225-6552	100
2	Optimization of novel type of trivalent inactivated <i>Salmonella</i> bacterial vaccine prevention program against <i>Salmonella</i> infections in poultry	Journal of Preventive Veterinary Medicine	유영주, 허진	47, 4	대한민국	한국예방수 의학회	비SCIE	2023.12.3 1	2287-7991	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 대한백신학회, 대한인 수공통감염병학회 추계학술대회	유영주, 유정희, 허진	2022.10.07	건국대학교 새천년관 대공연장	대한미국
2	한국예방수의학회 2023년 정기학술대회	유영주, 유정희, 허진	2023. 07. 07	충남대학교 대덕캠퍼스 정심화국제문화센터 백마홀	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√		√							

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	내부 자금	살모넬라 엔터라이티디스 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물 (특허출원번호:10-2021-0012418)	(주)코미팜	2022.09.19	10,000,000원(VAT별도)	10,000,000원(VAT별도)

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1			국내	PRO-VAC SALMO-G host	국내 판매용	(주)코미팜	0			20
2	기술이전	신제품 개발	국외	PRO-VAC SALMO-G UARD	해외 수출 전용	(주)코미팜	0	192,520 (달러), 65,208 (유로)	2022-2023	20

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
PRO-VAC SALMO-GUARD	2022	0	56,000 (달러), 65,208 (유로)	56,000 (달러), 65,208 (유로)	
	2023	0	136,520	136,520	
합계		0	192,520 (달러), 65,208 (유로)	192,520 (달러), 65,208 (유로)	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		국내용 백신 야외임상시험 계획서 제출, 해외 수출 전용 백신 허가 후 수출		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2		
	소요예산(천원)	200,000		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		0	125,000	250,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내 국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		가금에서 살모넬라균 완전 근절 기술개발 연구과제 신청		
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출	408,602	375,000	375,000

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	PRO-VAC SALMO-GUARD	(주)코미팜	1		1
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황												
			학위별				성별		지역별						
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타		
					1			1						1	

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

가금에서 살모넬라 완전 근절 연구 성과 도출하여 농림축산식품부 2024년도 기술사업화지원사업에 접수

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

유영주 · 유정희 · 허진*

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 54506, Korea

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

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 neck 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 2×10^8 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.

Key Words: Salmonellosis, Zoonosis, Poultry, 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 발생 되는 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-

Copyright © The Korean Society of Veterinary Service.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

결론

본 연구는 사람에게서 식중독을 일으키는 주요 원인균인 살모넬라를 예방하기 위해서 살모넬라 3가 불활화 백신을 제조하여 체액성 및 세포성 면역 반응 유도과 공격적접종 군주에 대한 방어효과를 평가하였다. *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium 및 *S.* Gallinarum 혈청형을 Chlorhexidine을 이용하여 불활화시키고 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 공격적접종 하여 각 군주에 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 공격적접종 후 보다 완벽한 예방 효과를 위해서는 각 살모넬라 불활화 사균제의 백신 제조 시 혼합 비율 및 접종량의 조절 그리고 약독화 상균 백신인 SG9R과 연계한 백신 접종 프로그램 최적화 등 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 장부의 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, Spriggins 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-



Optimization of novel type of trivalent inactivated *Salmonella* bacterial vaccine prevention program against *Salmonella* infections 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

Abstract: The optimization of a prevention program utilizing a novel trivalent inactivated *Salmonella* bacterial vaccine to protect poultry from *Salmonella* infections was evaluated in this study. A total of 50 brown nick layers were divided into 5 groups, A to E, each containing 10 hens. Group B hens were immunized with the SG9R vaccine, group C chickens were immunized with the trivalent inactivated *Salmonella* bacterial vaccine, and group D hens were primed with SG9R and boosted with the trivalent inactivated *Salmonella* bacterial vaccine. Group E hens were injected with sterile PBS. All hens in groups B to E were orally challenged with a mixture of wild-type *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and *S. Gallinarum* (approximately 6×10^8 CFU/0.2 ml/bird). Serum IgG titers, CD3+CD4+ T-cell levels, and CD3+CD8+ T-cell levels in group D were significantly higher than those in group A. Additionally, all animals in groups A to D showed no clinical symptoms and survived after the virulent challenges, whereas all chickens in group E died following the challenge. The challenge strains of *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and *S. Gallinarum* were not isolated from the liver, spleen, cecum, and cloaca of group D chickens. These findings indicate that priming with SG9R and boosting with a trivalent inactivated *Salmonella* bacterial vaccine can be an effective approach for preventing *Salmonella* infections by inducing robust protective humoral and cellular immune responses in chickens.

Key words: *Salmonella* infections, Zoonosis, Poultry, Trivalent inactivated *Salmonella* bacterial vaccine, Optimization

서론

살모넬라속에 속하는 세균들에 의해 발병되는 감염 질환을 살모넬라균 감염증이라고 통칭하고 있으며, 살모넬라균은 설사, 발열, 오한, 구토 등의 증상을 일으키는 대표적인 세균으로써 일반적으로 계란과 닭을 이용한 음식에 의한 감염 사례가 주로 보고되고 있다 [7, 23]. 살모넬라균은 분류된 혈청형별로 항생제 내성 경향, 숙주 특이성 등 다양한 차이를 보이며, 사람에게 감염되는 가장 대표적인 혈청형은 *Salmonella (S) Enteritidis*와 *S. Typhimurium*으로 이 혈청형들은 숙주 특이성이 낮아 감염력이 높고 전파가 쉽게 이루어진다 [23]. 2019년부터 2021년까지 3년간 살모넬라균 감염증의 국내 발생은 1,789건으로 연간 평균 624건이 확인되었고, *S. Enteritidis* 379주(20.2%), *S. Typhimurium* 357주(19.1%)으로 각각 1, 2위를 차지하는 것으로 확인되었으며, 특히 주로 집단으로 발생하는 식중독의 원인 혈청형으로 확인되었다 [19]. *S. Enteritidis*가 닭에 감염될 경우 설사를 비롯한 소화기 증상을 유발하고, 종배설강을 통해 다량의 균이 배출되어 산란 시 수직전파가 가능한 것으로 알려져 있으며 [11, 12], *S. Typhimurium*의 경우 산란계의 경우를 통해 감염되

면 닭의 생식기로 이동하여 생성되는 계란을 오염시키는 것으로 알려져 있다 [13].

이 외의 혈청형인 *S. Gallinarum*에 의해 발생하는 가금티푸스 (FT)의 경우 모든 연령대의 산란계에서 발생할 수 있으며 최대 100%의 폐사를 초래하고, 간 비장의 종대를 특징으로 한다 [2]. 국내에서는 양계농장의 사친 차단방역 실패 및 위생관리 부실 등의 이유로 전국적으로 확산되어 경제적인 피해를 일으키고 있고 [22, 37], 개발도상국의 경우 통제되지 않은 상태로 가금류 농장에 널리 퍼져있는 것으로 알려져 있다 [35].

일반적으로 살모넬라의 예방을 위해 사용되는 백신으로는 약독화 생균백신과 불활화백신이 있으며, 살모넬라 균주의 특성상 세포매개성면역을 자극시키는 약독화 생균백신이 더 우수하다는 평가를 받고 있다 [25]. 그러나 생균백신의 경우 접종된 숙주에서 백신주가 증식하는 과정에서 약독화 된 유전자와 원래의 유전자로 복귀되어 병원성이 회복될 수 있다는 점으로 인해 안전성에 대한 문제가 지속적으로 대두되고 있다 [3, 4]. 불활화 백신은 병원성의 복귀에 대한 우려가 없다는 안전성, 다양한 살모넬라 혈청형과 혼합하여 사용할 수 있는 융용성을 지니고 있으며, 모계 접종을 통해 병아리에 모체이행항체를 전달할 수 있다고 알려져 있다 [5, 8, 10, 27]. 또한 지금까지 알려진 바에 의하면 살모넬라 불활화 백신은 살모넬라에 감염된 산란계에서 분변을 통한 균의 배출을 감소시키고, 계란 내 오염 또한 감소시키는 것으로 보고되

*Received 13 December 2023, Revised 15 December 2023, Accepted 15 December 2023
 *Corresponding Author: Jin Hur, Tel: +82-63-850-0958, Fax: +82-63-850-0910,
 E-mail: hurjin@jnu.ac.kr
 Copyright © 2023 The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine.
 The full text is freely available on the web at <http://www.jpvm.kr>.

근육 집중하였을 경우 각 항원의 간섭 없이 각 항원별로 면역 항체가 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

산란계에서 살모넬라 제거를 위해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-cells은 중요한 역할을 수행 한다 [14, 29, 33, 34, 36]. CD4⁺ T-cells은 항체 생산 B-cell 지원 [29] 및 IFN- γ 와 같은 대식세포 활성화 사이토카인 생산 및 유도를 통해 살모넬라 감염 제어에 중요한 역할을 수행 한다 [28]. CD8⁺ T-cells은 대식세포 유주 및 감염된 세포 용해 유도 등을 통해 살모넬라 제거에 중요한 역할을 담당 한다 [30, 41]. 백신 접종군인 B-D 그룹의 산란계에 백신을 접종한 후 말초혈액 내 CD3⁺CD4⁺ T-cells과 CD3⁺CD8⁺ T-cells은 대조군인 A 그룹에 비해 면역반응 유도가 확인되었다. 특히, CD3⁺CD4⁺ T-cells과 CD3⁺CD8⁺ T-cells의 경우 약독화 생균 백신을 1차 접종하고 추가로 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 2차 접종 한 그룹에서 모든 항원에 대해 유의성있는 세포성 면역 반응이 유도되었음이 확인되었다. 이상의 결과는 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*에 대해 체액성 및 세포성 면역 반응 모두를 효과적으로 유도하기 위해서는 약독화 생균 백신을 1차 접종하고, 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 추가 접종을 통해서 가능하다는 것을 보여주는 결과였다.

산란계에 살모넬라 사균제와 오일보조제(Oil-adjuvant)를 혼합하여 제작한 불활화 백신을 접종한 결과, 내부 장기 내 살모넬라 분리율의 감소, 분변 내 살모넬라 배출 빈도 및 균량이 감소되는 것으로 보고되었고 [3, 15], SG9R과 같은 약독화 생균 백신은 가금티푸스로 인한 폐사율을 효과적으로 낮추는 것으로 알려져 있다 [25]. 야외 독성 분리주인 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*을 혼합하여 공격접종 후 14일간 폐사율을 관찰하고, 분변 및 주요 기관에서 균 분리를 진행한 결과 SG9R을 접종한 B 그룹의 경우 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 분리율이 최대 각각 70%와 90%까지 나타났으나 *S. Gallinarum*의 경우 맹장과 총배설강에서는 각 10%의 비율로 분리되었다. 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 접종한 C 그룹의 경우 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*이 분리된 개체가 최대 각 50% 씩으로 나타났고, *S. Gallinarum*의 경우 간과 비장에서 각 30%의 개체에서 분리되었다. 하지만 약독화 생균 백신인 SG9R을 1차로 피하 접종하고, 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 2차로 접종한 D 그룹의 경우 모든 개체의 간, 비장, 맹장 그리고 총배설강에서 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 및 *S. Gallinarum*이 분리되지 않았다. PBS를 접종한 양성대조군 E 그룹의 경우 공격접종 5일째부터 식욕 부진 및 운동 실조 등이 관찰되었고, 7일째부터 폐사가 시작되어 14일째 모두 폐사하여 폐사율이 100%로 관찰되었다. 이를 통해 상업적으로 판매 중인 약독화 생균 백신인 SG9R을 1차로 피하 접종하고, 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 근육으로 추가 접종 할 경우 체액성 및 세포성 면역 반응을 유도할 뿐만 아니라 가금티푸스 및 주요 세균성 인수공통 감염병인 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*을 효과적으로 예방할 수 있음을 확인하였다.

본 연구에서는 사람에게서 세균성 식중독을 일으키는 주요 원인 균인 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*, 그리고 가금에서 폐사를 일으키는 가금티푸스 원인균인 *S. Gallinarum*에 대한 산란계에 서의 효과적인 살모넬라균 감염 예방을 위한 최적의 예방 프로그램 확립을 위한 연구를 수행하였다. 약독화 생균 백신만을 접종한 경우와 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신만을 단독 접종한 산란 계 모두에서 폐사는 발생하지 않았지만, 내부 장기 및 맹장 그리고 총 배설강 등에서 도전감염 균주가 분리되었다. 하지만 시판 백신인 약독화 생균 백신인 SG9R을 1차로 피하 접종한 후, 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신으로 추가로 근육 접종한 경우에는 내부 장기 및 맹장과 총배설강 등지에서 도전감염 균주가 분리되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 보면 약독화 생균 백신 및 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 단독으로 접종한 경우보다 약독화 생균 백신 접종 후, 3가 살모넬라 불활화 사균제 백신을 추가로 접종할 경우 산란계에서 주요 살모넬라균을 효과적으로 예방할 수 있음이 확인되었다. 추후 야외 양계장에서 백신의 상용화를 위한 야외 양계장을 대상으로 한 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).

REFERENCES

- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. J Clin Microbiol. 2004, 42(4): 1734-1738.
- Alves Batista DF, Freitas Neto OC, Maria de Almeida A, Maboni G, Carvalho TF, Carvalho TP, Berchieri A. Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. PloS One. 2018, 13(7): e0200585.
- Barbezange C, Ermel G, Ragimbeau C, Humbert F, Salvat G. Some safety aspects of *Salmonella* vaccines for poultry: in vivo study of the genetic stability of three *Salmonella* Typhimurium live vaccines. FEMS Microbiol Lett. 2000, 192(1): 101-106.
- Barrow PA, Lovell MA. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* enteritidis phage type 4. Avian Pathol. 1991, 20: 335-348.



2022

대한백신학회
대한인수공통감염병학회
추계학술대회

일시 | 2022년 10월 6일(목)-7일(금)

장소 | 건국대학교 새천년관 대공연장



KVS 대한백신학회
www.korvac.org

 대한인수공통감염병학회
KOREAN SOCIETY FOR ZOOZOSES

Poster 39

Protective efficacy of the live, attenuated *Salmonella* Typhimurium by deleting the virulence-associated three genes in a murine model

Yeong Ju Yu, Jeong Hee Yu, Jin Hur

College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan, 54596, South Korea

배경: *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) causes gastroenteritis mainly in domestic animals, as well as humans. For effective protection against *S. Typhimurium*, the cellular immune response is vital, and the humoral immune response is also known to contribute to the clearance of *S. Typhimurium* infection through serum IgG and secretory IgA. Efficacy of a new live *Salmonella* Typhimurium vaccine candidate attenuated by deletion of three virulence genes was evaluated in a murine model.

방법: Live form of the vaccine was intramuscularly immunized. A total of 90 female BALB/c mice were used and divided into 6 groups, A to F, containing 15 mice per group. All mice in groups A and B were injected with sterile phosphate-buffered saline (PBS). All mice in groups C to E were immunized with approximately 1×10^4 colony-forming unit (CFU), 5×10^4 CFU, 1×10^5 CFU of the vaccine candidate, respectively, in 0.1 ml of PBS. Group F mice were inoculated with approximately 1×10^5 CFU of original strain of the vaccine candidate in 0.1ml of PBS. All mice (except groups A, and F mice) were orally challenged with approximately 2×10^8 CFU of wild-type *S. Typhimurium* in $20\mu\text{l}$ of PBS.

결과: All mice in groups C to E showed rare clinical symptom post immunization, however all mice in group F died within 12 days after inoculation. Serum IgG, secretion IgG1, IgG2a titers and levels of serum IFN- γ , IL-2, and TNF- α of groups C-E significantly increased. In addition, all animals in groups A, C, D, and E showed no clinical symptoms and survived after the virulent challenges, whereas all mice in group B died following the challenge.

결론: These indicate that the vaccine candidate can be an effective tool for prevention of *Salmonella* infections by inducing robustly protective immune responses and leading to the production of cellular immune response-associated cytokines.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, Vaccine, Protective efficacy, Mice, Attenuation

한국예방수의학회

2023년 정기학술대회 2023 KSPVM Symposium

제47권 제1호 부록, 2023년 7월

포스트 코로나 시대의 예방수의학의 역할

- 일 시 : 2023년 7월 6일(목) ~ 7일(금)
- 장 소 : 충남대학교 대덕캠퍼스 정심화국제문화회관 백마홀
- 주 최 : ㉠ 한국예방수의학회
- 주 관 : 한국예방수의학회, 충남대학교 수의과대학 동물의과학연구소/중점연구소



한국 예방수의학회

The Korea Society of Preventive Veterinary Medicine

Efficacy evaluation of the chlorhexidine-inactivated *Salmonella* Enteritidis, *S. Gallinarum*, and *S. Typhimurium* in a chicken model

Yeong Ju Yu, Jeong Hee Yu, Jin Hur*

College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan, 54596, South Korea,

In this study, the mixture of chlorhexidine-inactivated *Salmonella* (*S.*) Enteritidis (SE), *S. Gallinarum* (SG), and *S. Typhimurium* (ST) vaccine candidates was evaluated as a vaccine candidate against salmonellosis in chickens. The inactivated form of the vaccine was intramuscularly immunized. A total of 70 brown nick commercial layers were used and divided into 7 groups, A to G, containing 10 chickens per group. All chickens in groups B to D were immunized with approximately 7×10^8 cells (1×10^8 of ST, 3×10^8 of SE, and 3×10^8 of SG) of the mixture of the three vaccine candidates in 0.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS). All chickens in groups E to G were injected with sterile PBS. All chickens of groups B and E, groups C and F, and groups D and G were orally challenged with approximately 2×10^9 colony-forming unit (CFU) of wild-type SE, SG, and ST, respectively, in 200 μ l of PBS. Serum IgG titers and CD3⁺CD4⁺ T-cells, and CD3⁺CD8⁺ T-cells levels of groups B-D significantly higher than those of group A. All animals in groups A-E, and G showed no clinical symptoms and survived after the virulent challenges, whereas all chickens in group F died following the challenge. In addition, chickens in groups B and D were significantly protected from wild type Se, and ST infections. These indicate that the vaccine candidate can be an effective tool for prevention of *Salmonella* infections by inducing robustly protective immune responses and leading to the production of cellular immune response in chickens.

Acknowledgements: This research was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry, IPET (No. 122007-2).

기술이전

■ 농림축산식품연구개발사업 관리기준 [별지 제27호 서식] <제35조제4항 관련>

(2쪽 중 1쪽)

기술실시 보고서							
(단위 : 원)							
연구개발과제 현황	사업명	가축질병대응기술고도화지원사업		연구과제번호	122007-2		
	연구과제명	가금에서의 살모넬라 3가 문합화 예방 백신 고도화					
	연구개발기관명	전북대학교 산학협력단	연구책임자	허진	참여기업명	㈜코미팜	
	연구협약일	2022. 4. 1.	연구기간	2022. 4. 1. ~ 2023. 12. 31.(21개월)			
	연구개발비	정부지원연구개발비 700,000,000	기관부담연구개발비 10,000,000	기타 ()	계 710,000,000		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	특허 전용실시 계약					
	계약(활용)일	2022. 9. 19.	실시(활용)기간	특허 존속기간			
	지재권 종류	특허		실시권 유형	전용실시		
	* 지재권이 특허(출원, 등록) 인 경우	명칭	살모넬라 엔테라이티디스 문합화 사균체를 포함하는 살모넬라종 예방 또는 치료용 백신 조성물				
		번호	10-2021-0012418	일자	2021. 1. 28.		
	실시(활용)기관	기관명	㈜코미팜		기관유형	중소기업	
		주소	133-81-23365		대표자	양용진, 문성철	
		사업자번호	경기도 시흥시 경계로 17		전화번호		
부서(담당자)		문성철		e-mail			
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건		
	징수(예정)일	징수(예정)금액	착수기분	징수(예정)일			징수(예정)금액
	2022. 9. 30.	10,000,000	매출에 따 른 기 술 료	징수시작(예정)일	결산월		
	-	-		-	-		
	-	-		징수종료(예정)일	징수율		
계	10,000,000	-		매출액의 (-)%			
기타특기사항	-						
<p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증명자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2024년 2월 5일</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관 전북대학교 산학협력단 단장 [직인]</p> <p>농림식품기술기획평가원장 귀하</p>							

기술료 징수 및 사용현황 보고서

(단위 : 원)

연구개발과제 현황	사업명	가축질병대응기술고도화지원사업		연구과제번호	122007-2		
	연구과제명	가금에서의 살모넬라 3가 물활화 예방 백신 고도화					
	연구개발기관명	전북대학교 산학협력단	연구책임자	허진	참여기업명	(주)코미팜	
	연구협약일	2022. 4. 1.	연구기간	2022. 4. 1. - 2023. 12. 31.(21개월)			
	연구개발비	정부지원연구개발비	기관부담연구개발비	기타 ()	계		
	700,000,000	10,000,000		710,000,000			
기술실시계약 성과활용 현황	계약(활용)명	특허 전용실시 계약					
	계약(활용)일	2022. 9. 19.	실시(활용)기간	특허권속기간			
	지재권 종류	특허		실시권 유형	전용실시		
	* 지재권이 특허(출원, 등 록)인 경우	명 칭	살모넬라 엔터라이티디스 물활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물				
		번호	10-2021-0012418	일 자	2021. 1. 28.		
	실시(활용)기관	기관명	(주)코미팜		기관유형	중소기업	
		주 소	133-81-23355		대 표 자	양용진, 문성철	
사업자번호		경기도 시흥시 경계로 17		전화번호			
부서(담당자)		문성철		e-mail			
징수 기술료	구 분	징수년도	징수금액	사용금액	잔 액		
	지난년도 징수						
	당해년도 징수	2022	10,000,000	10,000,000			
	계	10,000,000	10,000,000				
당해년도 징수 기술료 사용실적	구 분			사 용 금 액			
	- 연구개발과제 참여연구원 보상금			6,500,000			
	- 기술이전·사업화 및 지식재산권 출원·등록·유지			1,500,000			
	- 성과 활용에 기여한 직원 등에 대한 보상금						
	- 연구개발 재투자 및 기관운영 경비			2,000,000			
<p>「농림축산식품연구개발사업 운영규정」 제33조제4항에 따라 위와 같이 기술료 사용실적을 보고합니다.</p> <p style="text-align: center;">2024년 2월 6일</p> <p style="text-align: center;">연구개발기관 전북대학교 산학협력단 단장 []</p> <p style="text-align: center;">농림식품기술기획평가원장 귀하</p>							

사업화 -1 (사업화된 제품 사진)

- * 해외 수출 전용 살모넬라 3가 불활화 사균체 백신
- 국내용 야외임상시험 계획서 제출을 위한 추가 실험 시제품



2022년-2.

COMMERCIAL INVOICE

SHIPPER/ SELLER (I/C BENEFICIARY) KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA E-MAIL: Jason62@komipharm.com TEL: +82-31-498-2121 • FAX: 82-31-498-2120 • DIRECT:+82-70-7166-8728		INVOICE NO. & DATE HYM2201 & June 30, 2022	
		PURCHASE ORDER NUMBER & DATE	
CONSIGNEE YEMEN		BUYER (IF OTHER THAN CONSIGNEE) SAME AS CONSIGNEE	
DATE OF FACTORY OUT July 08, 2022		DEPARTURE DATE July 15, 2022	
VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR) MSC DANIELA / FY227A		FROM BUSAN PORT, SOUTH KOREA	
TO ADEN SEAPORT, YEMEN		OTHER REFERENCE <input checked="" type="checkbox"/> KEEP REFRIGERATED. DO NOT FREEZE. <input checked="" type="checkbox"/> MANUFACTURER/ EXPORTER: THE SAME <input checked="" type="checkbox"/> COUNTRY OF PRECEDENCE/ORIGIN/ACQUISITION: KOREA	
		TERMS OF DELIVERY AND PAYMENT <input checked="" type="checkbox"/> DELIVERY TERM: CIF ADEN SEAPORT, YEMEN (INCOTERMS 2010) <input checked="" type="checkbox"/> PAYMENT TERM:	
SHIPPING MARK 	NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION	QUANTITY	PRICE
Avian Pharm for Poultry KEEP REFRIGERATED (2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA	PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)		USD 56,000.00
SUB-TOTAL:		USD 135,220.00	
		TOTAL AMOUNT CIF ADEN SEAPORT, YEMEN: USD 135,220.00	
• TELEPHONE NO.: 82-31-498-2121 • FACIMILE NO.: 82-31-498-2120		Signed By: Komipharm International Co., Ltd.  K. H. YOU / SENIOR EXECUTIVE DIRECTOR	



USD1,280.75
USD1,280.75

수출신고필증(적재전, 감지)

※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토발 관세사무소 노민지	④ 신고번호 14061-ZZ-800235X	⑤ 세관.과 014-D9	⑦ 신고일자 2022-07-01	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A	
② 수출대행자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**1-72-1-01-1 수출회주 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**1-72-1-01-1 (주소) 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (대표자) 윤성철 (사업자등록번호) 133-81-23355		수출자구분 A (소재지) 15094		⑩ 거래구분 11 일반형태	⑪ 품류 A 일반수출	⑫ 결재방법 TT 단순송금발식
③ 제조자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**1-72-1-01-1 제조장소 15094 산업단지부호 999		⑬ 목적국 YE YEMEN		⑭ 도착항 KRPIUS 부산항	⑮ 선박회사 (항공사)	⑯ 선박회사 (항공사)
④ 구매자 (구매자부호)		⑰ 선적담당관번호		⑱ 출항예정일자	⑲ 적재예정세구역 03099999	
⑤ 품명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE		⑥ 운송형태 10 FC		⑳ 검사희망일 2022/07/01		
⑦ 거래품명		㉑ 물품소재지 15094 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (주)코미팜		㉒ L/C번호		
⑧ 모델.규격		㉓ 성분		㉔ 수량(단위)		㉕ 단가(USD)
⑨ 세번부호 300242-9000		㉖ 총중량 2624.0 (KG)		㉗ 수량 0 0		㉘ 신고가격(FOB) \$133,181 W170,571,515
⑩ 총중량 2915.0 (KG)		㉙ 총포장갯수 12(PG)		㉚ 총신고가격 (FOB) \$133,181 W170,571,515		㉛ 신고가액(FOB) \$133,181 W170,571,515
⑪ 운임(W) 2,561,500		㉜ 보험료(W) 50,000		㉝ 결재금액 CIF-USD-135,220.00		㉞ 포장갯수(종류) 12(PG)
⑫ 수입화물 관리번호		㉟ 컨테이너번호		㊱ 원산지 KR--N		
⑬ 수출요건확인 (발급서류명)		㊲ 컨테이너번호		㊳ 포장갯수(종류) 12(PG)		
⑭ 신고인기재관 선적기간 : 2022-07-01 - 2022-07-31		⑮ 세관기재관 20.7.1일부터 중소기업의 컨테이너 수출민화물 등에 대해 세관검사비용을 지원 하고 있으나, 지원 대상 여부를 확인하시어 신청하시기 바랍니다. (unipass.customs.go.kr)		㊴ 원산지 KR--N		
⑯ 운송(신고인) 기간 부터 까지		⑰ 적재의무기한 2022/08/01		⑱ 담당자		㊵ 신고승인일자 2022/07/01



발행번호 : 2022279856614(2022.07.01)
 ① 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.
 (관세법 제51조, 제27조) 또한 휴대단말 발송시에는 반드시 출국심사부두, 포스공통 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.
 ② 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(http://unipass.etim.go.kr)
 * 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.
 * 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시정확인필' 스탬프를 클릭하여 확인할 수 있습니다.

USD1,280.75
USD1,280.75



수출신고필증(적재전, 을지)

※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토달 관세사사무소	노민지	⑤ 신고번호 14081-22-800235X	⑥ 세관.과 014-D9	⑦ 신고일자 2022-07-01	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A
● 품명·규격 (관번호/총관수 : 001/001)						
② 품 명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE			⑩ 상표명			
③ 거래품명						
④ 모델·규격			⑤ 성분	⑥ 수량(단위)	⑦ 단가(USD)	⑧ 금액(USD)
(NO.07) PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)						56,000
			001란 이하	계속		

발행번호 : 2022279856614(2022.07.01)

Page : 2/3

① 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재시임을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제27조, 제27조) 또한 유디락출 반출시에는 반드시 출국심사부조소(공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

② 수출신고필증의 잔위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(사이트: <http://aripass.customs.go.kr>)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진본여부 확인은 전자문서의 '시점확인필' 스탬프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

See website for large version of the reverse | Ver página Web para términos y condiciones | Consultez nos sites pour renseignements complémentaires | 請參閱背面和附件以獲取詳情 | www.msc.com

MSC **MEDITERRANEAN SHIPPING COMPANY S.A.**
 12-14, chemin Rieu - CH -1208 GENEVA, Switzerland
 website: www.msc.com SCAC Code: MEDU

BILL OF LADING No. MEDUK1508051
NON-NEGOTIABLE COPY

SHIPPER
 KOMPHARM INTERNATIONAL CO., LTD.
 17, GYEONGJE-RO, BHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA
 E-MAIL: JASON62@KOMPHARM.COM
 TEL: +82-31-499-2421 FAX: +82-31-499-2123
 DIRECT: +82-70-7166-9726

CARRIER'S RECEIPT (ENDORSEMENTS) (REGIONS AGRREEMENT) (P&O)
 SHIPPER'S COPY, THIS AND CARRIER'S RECEIPT TO COMPANY, THE CARRIER HAS NO INTENT TO VERIFY THE SHIPPER'S REPRESENTATION AND THE LATTER TO BE RELATIVELY RESPONSIBLE FOR SHORTAGES ESTABLISHED AS CERTIFICATION IN CASE THE CONTAINER IS RECORDED WITH THE SAME SEAL AS NOTED ON THIS BILL OF LADING

CONSIGNEE: This B/L is not negotiable unless marked "To Order" or "To Order of ..." here

NOTIFY PARTY: No responsibility shall attach to Carrier or to its Agent for failure to notify - see Clause 20

CARRIER has no liability or responsibility whatsoever for damage to the goods by reason of natural conditions or atmospheric temperatures during the voyage period, and for charges by loading or unloading of the Goods for carriage in any way containers, and for inherent vice of the Goods, in such circumstances

Incoterms Number: 320002
 Merchant is aware and acknowledges that the situation in Yemen ports is unstable due to ongoing war and that the local authorities and the available armed forces are susceptible to rapid change and may without justification. The carrier shall not be responsible for rejection of goods by such destruction of these authorities, and the Merchant shall hold the Carrier harmless against any costs incurred as a result of such rejection.

SURRENDERED

PORT OF DESTINATION AGENT
 Mediterranean Shipping Company Yemen Ltd. Msaala
 Hafson P.O. Box 8819 Aden YEMEN
 Aden
 Phone : +967 2 347 321
 Fax : +967 2 347 326

VESSEL AND VOYAGE NO (see Clause 14.1)
 MSC DANIELA - FY227A

PORT OF LOADING
 BUSAN PORT, SOUTH KOREA

PLACE OF RECEIPT (Combined Transport ONLY - see Clause 1 & 5.2)
 XXXXXXXXXXXXXXXX

BOOKING REF (BY)
 EBK03514498

SHIPPER'S REF
 Service Contract Number
 3463-999-01

PORT OF DISCHARGE
 ADEN SEAPORT, YEMEN

PLACE OF DELIVERY (Combined Transport ONLY - see Clause 1 & 5.2)
 XXXXXXXXXXXXXXXX

PARTICULARS FURNISHED BY THE SHIPPER - NOT CHECKED BY CARRIER - CARRIER NOT RESPONSIBLE (see Clause 14)

Container Numbers, Seal Numbers and Marks	Description of Packages and Goods (Continued on attached Bill of Lading rider pages(s), if applicable)	Gross Cargo Weight	Measurement
OTPU8437832 40' HIGH CUBE REEFER Seal Number: FJ13476407 Tare Weight: 4,480 kgs. Marks and Numbers: AVIAN PHARM FOR POULTRY (IN DIA) KEEP REFRIGERATED (2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA	12 Pallet(s) OF PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE) FREIGHT PREPAID Temperature: 5.0 C	2,916.000 kgs.	49.000 cu. m.
Total		2,916.000 kgs.	49.000 cu. m.

FREIGHT & CHARGE: Cargo shall not be delivered unless Freight & Charges are paid (see Clause 16)

FREIGHT & CHARGES	BASES	RATE	PREPAID	COLLECT

RECEIVED by the Carrier in apparent good order and condition (unless otherwise stated herein) the total number or quantity of Containers or other packages or units indicated in the box entitled Carrier's Receipt for carriage subject to all the terms and conditions hereon from the Place of Receipt or Place of Loading to the Port of Discharge or Place of Delivery, whichever is applicable, in accordance with the BILL OF LADING. THE SHIPPER/AGENT EXPRESSLY ACCEPTS AND AGREES TO ALL THE TERMS AND CONDITIONS, WHETHER PRINTED, STAMPED OR OTHERWISE INCORPORATED ON THIS SIDE AND ON THE REVERSE SIDE OF THIS BILL OF LADING AND THE TERMS AND CONDITIONS OF THE CARRIER'S APPLICABLE TARIFF AS IF THEY WERE ALL SIGNED BY THE MERCHANT.

If this is a negotiable (To Order) or (To the order) Bill of Lading, duly endorsed must be submitted by the Merchant to the Carrier (or its Agent) when outstanding Freight and charges in exchange for the Goods or a Delivery Order. If this is a non-negotiable (Receipt) Bill of Lading, the Carrier shall deliver the Goods at issue a Delivery Order (after payment of outstanding Freight and charges) against the surrender of one original Bill of Lading or its equivalent with the national law at the Port of Discharge or Place of Delivery whichever is applicable.

IN WITNESS WHEREOF the Carrier or their Agent has signed the number of Bills of Lading stated on the top, all of this tenor and date, and wherever one original Bill of Lading has been surrendered, all other Bills of Lading shall be void.

DECLARED VALUE (Only applicable if Ad Valorem charges paid - see Clause 7.3)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

CARRIER'S RECEIPT (No. of Copies or Pages sent by Carrier - see Clause 14.1)
 1 copy

SIGNED on behalf of the Carrier MSC Mediterranean Shipping Company S.A.
 by MSC KOREA LIMITED As Agent For The Carrier

PLACE AND DATE OF ISSUE
 SEOUL
 15-Jul-2022

SHIPPED ON BOARD DATE
 15-Jul-2022

Standard Edition - 02/2015 TERMS CONTINUED ON REVERSE

거 래 명 세 표

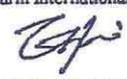
번호: 2022-01

출고일: 2022년 07월 15일		판매자 (인)		등록번호	133-81-23355			
거래처:				상 호	주크미팜	대표이사	윤성철(인)	
				주 소	경기도 시흥시 정왕동 1236-6			
				전 화	(031)498-2121~5			
합계금액₩:				171,188,520	일억칠천일백팔십팔만팔천오백이십원정			
No	분류코드	품 번 · 품 명	규격	수 량	외화금액	공급가액	기준환율	
1							1,266.00	
2							(06/13선수)	
3								
4	330383-01	PRO-VAC SALMO-GUARD	1000DOSE			70,896,000		
5								
6								
계					US\$135,220.00	171,188,520		

예민

202212-2

COMMERCIAL INVOICE

SHIPPER/SELLER (L/C BENEFICIARY) KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA E-MAIL: Jason62@komipharm.com TEL.: +82-31-498-2121 • FAX.: 82-31-498-2120 • DIRECT:+82-70-7166-8728		INVOICE NO. & DATE HYM2202 & DEC 05, 2022 <hr/> PURCHASE ORDER NUMBER & DATE																				
CONSIGNEE <p style="text-align: center;">YEMEN</p>		BUYER (IF OTHER THAN CONSIGNEE) <p style="text-align: center;">SAME AS CONSIGNEE</p> <hr/> OTHER REFERENCE <input type="checkbox"/> KEEP REFRIGERATED. DO NOT FREEZE. <input type="checkbox"/> MANUFACTURER/EXPORTER: THE SAME <input type="checkbox"/> COUNTRY OF PRECEDENCE/ORIGIN/ACQUISITION: KOREA																				
DATE OF FACTORY OUT December 16, 2022	DEPARTURE DATE December 23, 2022	TERMS OF DELIVERY AND PAYMENT <input type="checkbox"/> DELIVERY TERM: CIF ADEN SEAPORT, YEMEN (INCOTERMS 2010) <input type="checkbox"/> PAYMENT TERM: 100% T/T IN ADVANCE BEFORE SHIPMENT																				
VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR) MAERSK HOUSTON / 250W	FROM BUSAN PORT, SOUTH KOREA	TO ADEN SEAPORT, YEMEN																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">SHIPPING MARK</th> <th style="width: 45%;">NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION</th> <th style="width: 10%;">QUANTITY</th> <th style="width: 10%;">PRICE</th> <th style="width: 10%;">AMOUNT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">  Avian Pharm for Poultry </td> <td> KEEP REFRIGERATED (2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE) </td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: right;">EUR 65,208.00</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">GRAND TOTAL:</td> <td style="text-align: center;">19,940 BOTTLES</td> <td></td> <td style="text-align: right;">EUR 243,440.00</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td colspan="2" style="text-align: right;">TOTAL AMOUNT CIF ADEN SEAPORT, YEMEN:</td> <td style="text-align: right;">EUR 243,440.00</td> </tr> </tbody> </table>			SHIPPING MARK	NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION	QUANTITY	PRICE	AMOUNT	 Avian Pharm for Poultry	KEEP REFRIGERATED (2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)			EUR 65,208.00	GRAND TOTAL:		19,940 BOTTLES		EUR 243,440.00			TOTAL AMOUNT CIF ADEN SEAPORT, YEMEN:		EUR 243,440.00
SHIPPING MARK	NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION	QUANTITY	PRICE	AMOUNT																		
 Avian Pharm for Poultry	KEEP REFRIGERATED (2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)			EUR 65,208.00																		
GRAND TOTAL:		19,940 BOTTLES		EUR 243,440.00																		
		TOTAL AMOUNT CIF ADEN SEAPORT, YEMEN:		EUR 243,440.00																		
• TELEPHONE NO.: 82-31-498-2121 • FACIMILE NO.: 82-31-498-2120		Signed By : Komipharm International Co., Ltd. <div style="text-align: center;">  <hr style="width: 100px; margin: 0 auto;"/> K. H. YOU / SENIOR EXECUTIVE DIRECTOR </div>																				



USD1,323.64
EUR1,376.02

수출신고필증(적재전, 감지)

※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소 노면지		⑤ 신고번호 14081-22-800454X	⑥ 세관과 014-D9	⑦ 신고일자 2022-12-06	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A
② 수출대행자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 수출화주 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 (주소) 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (대표자) 문성철 (소재지) 15094 (사업자등록번호) 133-81-23355		수출자구분 A		⑪ 거래구분 11 일반형태	⑫ 종류 A 일반수출	⑬ 결제방법 TT 단순송금방식
				⑭ 목적국 YE YEMEN	⑮ 적재항 KRPUS 부산항	⑯ 선박회사 (항공사)
				⑰ 선박영양공명량	⑱ 출항예정일자	⑲ 적재예정보세구역 03099999
				⑳ 운송형태 10 FC	㉑ 검사희망일 2022/12/06	
				㉒ 물품소재지 15094 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (주)코미팜		
③ 제조자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 제조장소 15094 산업단지부호 999		② L/C번호		⑳ 물품상태 N		
		㉓ 사전입시개청통보여부 N		㉔ 반송 사유		
④ 구매자 (구매자부호)		㉕ 환급신청인 2 (1:수출대행자/수출화주, 2:제조자)		㉖ 자동간이정액환급 NO		
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 001/002)						
② 품명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE				② 상표명		
③ 거래품명 PRO-VAC CHECK ND						
③ 모델·규격		③ 성분	③ 수량(단위)	③ 단가(EUR)	③ 금액(EUR)	
		1 란 을 지	계 속			
⑤ 세번부호 300242-9000	⑤ 순중량 5,355.5 (KG)	⑤ 수량 0 0	⑤ 신고가격(FOB)	\$249,697 ₩330,508,732		
⑤ 송품장부호 HYM2202	⑤ 수입신고번호	⑤ 원산지 KR--N	⑤ 포장갯수(종류)	17(GT)		
④ 수출요건확인 (발급서류명)						
⑤ 총중량 5,966.0 (KG)	⑤ 총포장갯수 18(GT)	⑤ 총신고가격 (FOB)	\$250,998 ₩ 332,231,028			
⑤ 운임(W) 2,647,280	⑤ 보험료(W) 100,000	⑤ 결제금액	CIF-EUR-243,440.00			
⑤ 수입화물 관리번호		⑤ 컨테이너번호		N		
※ 신고인기재란 선적기간 : 2022-12-06 - 2023-01-05			⑤ 세관기재란 *20.7.1일부터 중소기업의 컨테이너 수출입화물에 대해 세관검사비용을 지원하고 있으니, 지원 대상 여부를 확인하시어 신청하시기 바랍니다. (unipass.customs.go.kr)			
⑤ 운송(신고인) 기간 부터 까지	⑤ 적재의무기한 2023/01/05	⑤ 담당자	⑤ 신고수리일차	2022/12/06		



발행번호 : 2022340899418(2022.12.06)

Page : 1/3

(1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.
(관세법 제251조, 제277조) 또한 휴대전화 발송시에는 반드시 출국심사(부두, 초소, 공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.
(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(http://unipass.customs.go.kr)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.
* 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시점확인필' 스탬프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

USD 1,323.64
EUR 1,376.02



수출신고필증(적재전, 을지)



※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토달 관세사무소 노민지	⑤ 신고번호 14081-22-800454X	⑥ 세관.과 014-D9	⑦ 신고일자 2022-12-06	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 001/002)					
② 품 명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE			④ 상표명		
③ 거래품명 PRO-VAC CHECK ND					
⑩ 모델·규격	⑪ 성분	⑫ 수량(단위)	⑬ 단가(EUR)	⑭ 금액(EUR)	
(NO.06) PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)				65,208	
	001란 이하	계속			

발행 번호 : 2022340899418(2022.12.06)

Page : 2/3

(1) 수출신고수리일로부터 30일 이내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제251조, 제277조) 또한 휴대타송 반출시에는 반드시 출국심사(부두조소공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(<http://unipass.customs.go.kr>)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시정확인필' 스탬프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.



MEDITERRANEAN SHIPPING COMPANY S.A.
 12-14, chemin Rieu - CH -1208 GENEVA, Switzerland
 website: www.msc.com SCAC Code: MEDU

BILL OF LADING No. MEDUK1726802
NON-NEGOTIABLE COPY

"Port-To-Port" or "Combined Transport"(see Clause 1)

NO. & SEQUENCE OF ORIGINAL B/L's NO. OF RIDER PAGES
 0 Zero

SHIPPER:
 KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD.
 17,GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO,SOUTH KOREA
 E-MAIL: JASON62@KOMIPHARM.COM
 TEL.:+82-31-498-2121 FAX.:+82-31-498-2120

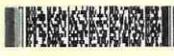
CARRIER'S AGENT'S ENDORSEMENTS: (include Agent(s) at POD)
 SHIPPER'S LOAD, STOW AND COUNT
 SAID TO CONTAIN. THE CARRIER HAD NO MEANS TO VERIFY SHIPPER'S REPRESENTATION AND THE LATTER TO BE ULTIMATELY RESPONSIBLE FOR SHORTAGES ESTABLISHED AT DESTINATION IN CASE THE CONTAINER IS DISCHARGED WITH THE SAME SEALS AS NOTED ON THIS BILL OF LADING
 FCL/FCL
 Carrier has no liability or responsibility whatsoever for thermal loss or damage to the goods by reason of natural variations in atmospheric temperatures during the winter period, and / or caused by inadequate packing of the Goods for carriage in dry-wan containers, and / or inherent vice of the Goods, in such temperatures
 Lloyd's/MO Number: 9848950
 Merchant is aware and acknowledges that the situation in Yemen ports is unstable due to ongoing war and that the local authorities and the coalition armed forces are susceptible to reject cargo's import without justification. The carrier shall not be responsible for rejection of goods by such decisions of these authorities and the Merchant shall hold the Carrier harmless against any costs accrued as a result of such rejection.

CONSIGNEE: This B/L is not negotiable unless marked "To Order" or "To Order of ..." here.
 YEMEN

NOTIFY PARTIES: (No responsibility shall attach to Carrier or to his Agent for failure to notify - see Clause 20)
 YEMEN

PORT OF DISCHARGE AGENT:
 Mediterranean Shipping company Yemen Ltd.Maalla
 Hafoon P.O. Box 5819 Aden YEMEN
 Aden
 Phone : +967 2 247 321
 Fax : +967 2 247 325

SURRENDERED



VESSEL AND VOYAGE NO (see Clause 8 & 9) MAERSK HOUSTON - 260W	PORT OF LOADING BUSAN PORT,SOUTH KOREA	PLACE OF RECEIPT: (Combined Transport ONLY - see Clause 1 & 5.2) XXXXXXXXXXXXXXXXXX
BOOKING REF. (or) SHIPPER'S REF. Service Contract Number EBKG04472134 3403-999-ST	PORT OF DISCHARGE ADEN SEAPORT,YEMEN	PLACE OF DELIVERY: (Combined Transport ONLY - see Clause 1 & 5.2) XXXXXXXXXXXXXXXXXX

PARTICULARS FURNISHED BY THE SHIPPER - NOT CHECKED BY CARRIER - CARRIER NOT RESPONSIBLE (see Clause 14)

Container Numbers, Seal Numbers and Marks	Description of Packages and Goods (Continued on attached Bill of Lading Rider page(s), if applicable)	Gross Cargo Weight	Measurement
TTNU8360320 40' HIGH CUBE REEFER seal Number: FJ16330947 Tare Weight: 4,640 kgs. Marks and Numbers: AVIAN PHARM FOR POUL TRY (IN DIA) KEEP REFRIGERATED(2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA	18 Pallet(s) OF VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE) FREIGHT PREPAID Temperature: 5.0 C	5,966.000 kgs.	24.670 cu. m.
Total		5,966.000 kgs.	24.670 cu. m.

FREIGHT & CHARGE: Cargo shall not be delivered unless Freight & Charges are paid(see Clause 16)				
FREIGHT & CHARGES	BASIS	RATE	PREPAID	COLLECT

RECEIVED by the Carrier in apparent good order and condition (unless otherwise stated herein) the total number or quantity of Containers or other packages or units indicated in the box entitled Carrier's Receipt for carriage subject to all the terms and conditions hereof from the Place of Receipt or Port of Loading to the Port of Discharge or Place of Delivery, whichever is applicable. IN ACCEPTING THIS BILL OF LADING THE MERCHANT EXPRESSLY ACCEPTS AND AGREES TO ALL THE TERMS AND CONDITIONS, WHETHER PRINTED, STAMPED OR OTHERWISE INCORPORATED ON THIS SIDE AND ON THE REVERSE SIDE OF THIS BILL OF LADING AND THE TERMS AND CONDITIONS OF THE CARRIER'S APPLICABLE TARIFF AS IF THEY WERE ALL SIGNED BY THE MERCHANT.

If this is a negotiable (To Order / or) Bill of Lading, one original Bill of Lading, duly endorsed must be surrendered by the Merchant to the Carrier (together with outstanding Freight and charges) in exchange for the Goods or a Delivery Order. If this is a non-negotiable (straight) Bill of Lading, the Carrier shall deliver the Goods or issue a Delivery Order (after payment of outstanding Freight and charges) against the surrender of one original Bill of Lading or in accordance with the national law at the Port of Discharge or Place of Delivery whichever is applicable.

IN WITNESS WHEREOF the Carrier or their Agent has signed the number of Bills of Lading stated at the top, all of this tenor and date, and wherever one original Bill of Lading has been surrendered all other Bills of Lading shall be void.

DECLARED VALUE (Only applicable if Ad Valorem charges paid - see Clause 7.3) XXXXXXXXXXXXXXXXXX	CARRIER'S RECEIPT (No. of Cntrs or Pkgs rcvd by Carrier - see Clause 14.1) 1 cntr	SIGNED on behalf of the Carrier MSC Mediterranean Shipping Company S.A. by MSC KOREA LIMITED As Agent For The Carrier
PLACE AND DATE OF ISSUE SEOUL 23-Dec-2022	SHIPPED ON BOARD DATE 23-Dec-2022	

096

A 359805421

거 래 명 세 표

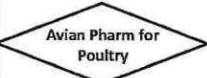
번호: 2022-02

출 고 일: 2022년 12월 23일		공 급 자		등록번호	133-81-23355				
거 래 처:				상 호	(주)코미팜	대표이사	문 성 철(인)		
				주 소	경기도 시흥시 정왕동 1236-6				
				전 화	(031)498-2121~5				
합계금액₩:				334,642,361	삼익삼천사백육십사만이천삼백육십일원정				
No	분류코드	품 번 · 품 명	규격	수 량	외화금액	공급가액	기준환율		
1							1,374.64		
2							(12/09선수)		
3									
4	330383-01	PRO-VAC SALMO-GUARD	1000DOSE		65,208	89,637,525			
5									
6									
7									
8									
계					€ 243,440.00	334,642,361			

예멘

202305-1

COMMERCIAL INVOICE

SHIPPER/ SELLER (L/C BENEFICIARY) KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA E-MAIL: Jason62@komipharm.com TEL.: +82-31-498-2121 • FAX.: 82-31-498-2120 • DIRECT:+82-70-7166-8728		INVOICE NO. & DATE HYM2301 & May 15, 2023	
CONSIGNEE Avian Pharm for Poultry medicines, vaccines, and feed import 60TH STREET, SANA'A, YEMEN TEL: +967-1-313942 Mobile: +967 733755278 Attn. Mr, Mohammed Saleh Alsanabani EMAIL: avian.p.co@avian-pharm.com		PURCHASE ORDER NUMBER & DATE	
DATE OF FACTORY OUT May 23, 2023		DEPARTURE DATE May 29, 2023	
VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR) UMM SALAL / 0033W		FROM BUSAN PORT, SOUTH KOREA	
TO ADEN SEAPORT, YEMEN		OTHER REFERENCE <input checked="" type="checkbox"/> KEEP REFRIGERATED. DO NOT FREEZE. <input checked="" type="checkbox"/> MANUFACTURER/ EXPORTER: THE SAME <input checked="" type="checkbox"/> COUNTRY OF PRECEDENCE/ORIGIN/ACQUISITION: KOREA	
SHIPPING MARK		TERMS OF DELIVERY AND PAYMENT <input checked="" type="checkbox"/> DELIVERY TERM: CIF ADEN SEAPORT, YEMEN (INCOTERMS 2010) <input checked="" type="checkbox"/> PAYMENT TERM: 100% T/T IN ADVANCE BEFORE SHIPMENT	
NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION		QUANTITY	PRICE
 KEEP REFRIGERATED (2-8°C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA			
PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)			USD 51,520.00
PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)			USD 14,000.00
GRAND TOTAL:		39,447 BOTTLES	USD 303,540.00
		TOTAL AMOUNT CIF ADEN SEAPORT, YEMEN:	USD 303,540.00
• TELEPHONE NO.: 82-31-498-2121 • FACIMILE NO.: 82-31-498-2120		Signed By : Komipharm International Co., Ltd.  K. H. YOU / SENIOR EXECUTIVE DIRECTOR	



USD1,323.16
USD1,323.16

수출신고필증(적재전, 갑지)

※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소 노민지	⑤ 신고번호 14081-23-800196X	⑥ 세관.과 014-D9	⑦ 신고일자 2023-05-15	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 S
② 수출대행자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 수출자구분 A 수출화주 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 (주소) 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (대표자) 문성철 (소재지) 15094 (사업자등록번호) 133-81-23355			⑩ 거래구분 11 일반형태	⑪ 종류 A 일반수출	⑫ 결제방법 TT 단순송금방식
			⑬ 목적국 YE YEMEN	⑭ 적재항 KRPUS 부산항	⑮ 선박회사 (항공사) 선박회사
			⑯ 선박명(항공편명)	⑰ 출항예정일자	⑱ 적재예정보세구역 03099999
			⑲ 운송형태 10 FC	⑳ 검사희망일	2023/05/15
⑳ 물품소재지 15094 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (주)코미팜 /					
④ 제조자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 제조장소 15094 산업단지부호 999			㉑ L/C번호	㉒ 물품상태 N	
④ 구매자 (구매자부호)			㉓ 사전임시개청통보여부 N	㉔ 반송 사유	
			㉕ 환급신청인 2 (1:수출대행자/수출화주, 2:제조자) 자동간이정액환급 NO		
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 001/003)					
② 품명 OTHER PREPARATIONS OF ANIMAL FEEDING			② 상표명		
③ 거래품명 SG-GUARD					
③ 모델·규격		③ 성분	③ 수량(단위)	③ 단가(USD)	③ 금액(USD)
		1 란 을 지	계 속		
⑤ 세번부호 2309.90-3090	⑤ 순중량	35.0 (KG)	⑤ 수량 0 0	⑤ 신고가격(FOB)	\$3,217 ₩4,256,697
⑤ 송품장부호 HYM2301	⑤ 수입신고번호		⑤ 원산지 KR---N	⑤ 포장갯수(종류)	2(PG)
④ 수출요건확인 (발급서류명)					
⑥ 총중량 7,384.0 (KG)	⑥ 총포장갯수	16(PG)	⑥ 총신고가격 (FOB)	\$300,464 ₩ 397,562,506	
⑥ 운임(₩) 3,969,480	⑥ 보험료(₩)	100,000	⑥ 결제금액	CIF-USD-303,540.00	
⑥ 수입화물 관리번호			⑥ 컨테이너번호	N	
※신고인기재란 선적기간 : 2023-05-15 - 2023-06-14			⑥ 세관기재란 '20.7.1일부터 중소기업의 컨테이너 수출입화물에 대해 세관검사비용을 지원하고 있으니, 지원 대상여부를 확인하시어 신청하시기 바랍니다. (unipass.customs.go.kr)		
⑥ 운송(신고)인	⑥ 기간	부터	까지	⑥ 적재의무기한 2023/06/14	⑥ 담당자
				⑥ 신고수리일자	2023/05/15



발행번호 : 2023402105407(2023.05.15)

Page : 1/5

- ① 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.
(관세법 제251조, 제277조) 또한 휴대탁송 반출시에는 반드시 출국심사(부두초소공형) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.
- ② 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(http://unipass.customs.go.kr)
- * 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.
- * 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시정확인필' 스탬프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

USD1,323.16
USD1,323.16



수출신고필증(적재전, 을지)



※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소	노민지	⑤ 신고번호 14081-23-800196X	⑥ 세관.과 014-D9	⑦ 신고일자 2023-05-15	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 S
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 002/003)						
② 품 명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE				⑩ 상표명		
③ 거래품명 PRO-VAC CHECK ND						
⑪ 모델·규격		⑫ 성분	⑬ 수량(단위)	⑭ 단가(USD)	⑮ 금액(USD)	
(NO.01)						
(NO.02)						
(NO.03)						
(NO.04)						
(NO.05) PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)					51,520	
(NO.06) PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)					14,000	
(NO.07)						
(NO.08)						
(NO.09)						
(NO.10)						
		002란 이하	계속			

발행번호 : 2023402105407(2023.05.15)

Page : 3/5

(1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제251조, 제277조) 또한 휴대락송 반출시에는 반드시 출국심사(부두초소공행) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(<http://unipass.customs.go.kr>)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시점확인필' 스탬프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

NON-NEGOTIABLE COPY

BILL OF LADING



Shipper/Exporter(Complete name and address) KOMIPHARM INTERNATIONAL CO.LTD. 1RA-107, SHIHWI INDUSTRIAL COMPLEX, 1236-6 CHONGWANG-DONG SHIHUNG-SI, KYOUNGGI-DO, SOUTH KOREA	Booking No. SELA74977200	B/L No. HDMU SELA74977200
Consignee(Complete name and address) YEMEN	Export References	
Notify Party(Complete name and address) YEMEN	Forwarding Agent References	
	Point and Country of Origin	
	Also Notify / Domestic Routing / Export Instructions **ATTN. EMAIL:	

Pre-Carriage by	Place of Receipt * BUSAN PORT, SOUTH KOREA	Port of Discharge ADEN SEAPORT, YEMEN
Ocean Vessel / Voyage / Flag UMM SALAL V# 0033W	Port of Loading BUSAN PORT, SOUTH KOREA	Place of Delivery * ADEN SEAPORT, YEMEN
Onward Inland Routing/Onward Inland Routing	For Transshipment to	Final Destination(For the Merchants Ref.)

PARTICULARS FURNISHED BY SHIPPER

Container No./Seal No. Marks and Numbers	No. of Containers or Other Pkgs	Description of Packages and Goods	Gross Weight	Measurement
AVIAN PHARM FOR POULTRY KEEP REFRIGERATED (2-8C) DO NOT FREEZE MADE IN KOREA	"SHIPPER'S LOAD,COUNT,SEALED & WEIGHT S.T.C." 1 X 40'H RF CONTAINER 16 PALLETS 16 PALLETS OF	PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)	7,384.000 KGS	30.4500 CBM

=FREIGHT PREPAID =
CY / CY



CAIU5516033 / 210540524 RF 4H CY / CY

Total Number of Containers or Packages(in words) ONE (1) CONTAINER ONLY

Freight & Charges	Rate	Unit	Prepaid	Collect
FREIGHT ALL AS ARRANGED				
SURRENDER				
Rate Applicability Date : 2023-05-29				

Declared Value (Optional) :US \$	(PACKAGE LIMITATION CLAUSE) Section 4 (5) of U.S. Carriage of Goods by Sea Act-1924: Neither the carrier nor the ship shall in any event be or become liable for any loss or damage	Total Charge	Number of Original B(s) / L THREE (3)	On Board Date MAY. 29, 2023
damage to or in connection with the transportation of goods in an amount exceeding \$500 per package lawful money of the United States, or in case of goods not shipped in packages, per customary freight unit or the equivalent of that sum in other currency, unless the nature and value of such goods have been declared by the shipper before shipment and inserted in the Bill of Lading and additional freight has been paid as required. This declaration, if embodied in the Bill of Lading, shall be prima facie evidence, but shall not be conclusive on the carrier. THIS CLAUSE SHALL APPLY ONLY TO GOODS MOVING TO OR FROM PORTS OF UNITED STATES.		(OBD:MAY TWENTY-NINTH, 2023) Dated at SEOUL, KOREA MAY. 29, 2023 HMM CO.,LTD. AS CARRIER		
IN ACCEPTING THIS BILL OF LADING, the shipper, owner and consignee of the goods, and the holder of the Bill of lading expressly accept and agree to all its stipulations, exceptions and conditions, whether written, stamped, or printed, as fully as if signed by such shipper, owner, consignee and/or holder. No agent is authorized to waive any of the provisions of the clauses. IN WITNESS WHEREOF, the master or agent of the said ship has affirmed to Bill of Lading, all of this tenor and date, ONE of which being accomplished, the others to stand void.		By _____		

** Applicable only when this document is used as an intermodal transport Bill of Lading

거 래 명 세 표

번호: 2023-01

출 고 일:	2023년 05월 29일	공 단 자	등록번호	133-81-23355		
거 래 처:			상 호	㈜코미팜	대표이사	문 성 철(인)
			주 소	경기도 시흥시 정왕동 1236-6		
			전 화	(031)498-2121 ~5		
		합계금액₩:	400,672,800 사역육심칠만이천팔백원정			

No	분류코드	품 번 · 품 명	규격	수 량	외화금액	공급가액	기준환율
1							1,320.00
2							(04/11선수)
3							
4							
5	330383-01	PRO-VAC SALMO-GUARD	1000DOSE		65,520	86,486,400	
6	:						
7	:						
8	:						
9	:						
10	:						
11	:						
계					\$303,540.00	400,672,800	

예멘

2023년-2

COMMERCIAL INVOICE

SHIPPER/ SELLER (L/C BENEFICIARY)		INVOICE NO. & DATE	
KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA		KIQ #23-05 & July 18, 2023	
CONSIGNEE		BUYER (IF OTHER THAN CONSIGNEE)	
IRAQ		SAME AS CONSIGNEE	
		OTHER REFERENCE	
		KEEP REFRIGERATED. DO NOT FREEZE.	
SHIPMENT DATE	ARRIVAL DATE (APPROXIMATE)		
August 7, 2023	August 10, 2023		
VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR)	FROM	TERMS OF DELIVERY AND PAYMENT	
AIR	INCHEON AIRPORT, KOREA	CIP ERBIL, IRAQ	
TO			
ERBIL AIRPORT, IRAQ			
SHIPPING MARK	NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION	QUANTITY	PRICE AMOUNT
 VANO PALLET NO. 1 ~ 9 MADE IN KOREA	<u>ITEM DESCRIPTION</u>		<u>CIP ERBIL AIRPORT, IRAQ</u>
	PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSES)		USD 15,000.00
TOTAL :		13,000 EA	USD 135,300.00
		////////////////////////////////////// TOTAL AMOUNT CIP ERBIL AIRPORT, IRAQ : USD 135,300.00	
 Komipharm International Co., Ltd. ■ Address: 17, GyeongJe-Ro, Shiheung-Si, Gyeonggi-Do, South Korea ■ Tel: 82-31-498-2124 Fax: 82-31-498-2120 ■ Website: http://www.komipharm.com		SIGNED BY Komipharm International Co., Ltd.  K. H. YOU / SENIOR EXECUTIVE DIRECTOR	

USD1,294.74
USD1,294.74



수출신고필증(적재전, 갑지)

※ 처리기간: 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소 노민지	⑤ 신고번호 14081-23-800291X	⑥ 세관.과 014-D9	⑦ 신고일자 2023-07-20	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A
② 수출대행자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 수출자구분 A 수출화주 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 (주소) 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (대표자) 문성철 (소재지) 15094 (사업자등록번호) 133-81-23355		⑩ 거래구분 11 일반형태	⑪ 종류 A 일반수출	⑫ 결제방법 TT 단순송금방식	
		⑬ 목적국 IQ IRAQ	⑭ 적재항 ICN 서울/인천	⑮ 선박회사 (항공사)	
		⑯ 선박명(항공편명)	⑰ 출항예정일자	⑱ 적제예정보세구역 04099999	
		⑲ 운송형태 40 ETC	⑳ 검사희망일 2023/07/20		
		㉑ 물품소재지 15094 경기 시흥시 경제로 17 ((주)코미팜) (주)코미팜 /			
③ 제조자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 제조장소 15094 산업단지부호 999		㉒ L/C번호		㉓ 물품상태 N	
		㉔ 사전입시개청통보여부 N		㉕ 반송 사유	
④ 구매자 (구매자부호)		㉖ 환급신청인 2 (1:수출대행자/수출화주, 2:제조자) 자동간이정액환급 NO			
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 001/001)					
㉗ 품명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE			㉘ 상표명		
㉙ 거래품명 PRO-VAC AINK					
㉚ 모델·규격		㉛ 성분	㉜ 수량(단위)	㉝ 단가(USD)	㉞ 금액(USD)
		1 란 을 지	계 속		
㉟ 세번부호 3002.42-9000	㊱ 순중량 2,790.0 (KG)	㊲ 수량 0	㊳ 신고가격(FOB) \$132,261 W171,244,102		
㊴ 송품장부호 KIQ #23-05	㊵ 수입신고번호	㊶ 원산지 KR--N	㊷ 포장갯수(종류) 9(PG)		
㊸ 수출요건확인 (발급서류명)					
㊹ 총중량 3,100.0 (KG)	㊺ 총포장갯수 9(PG)	㊻ 총신고가격(FOB) \$132,261 W 171,244,102			
㊼ 운임(W) 3,884,220	㊽ 보험료(W) 50,000	㊾ 결제금액 CIP-USD-135,300.00			
㊿ 수입화물 관리번호		㋀ 컨테이너번호 N			
※신고인기재란 선적기간 : 2023-07-20 - 2023-08-19		㋁ 세관기재란 '20.7.1일부터 중소기업의 컨테이너 수출입화물에 대해 세관검사비용을 지원하고 있으니, 지원 대상여부를 확인하시어 신청하시기 바랍니다. (unipass.customs.go.kr)			
㋂ 운송(신고인) 기간 부터 까지	㋃ 적재의무기한 2023/08/21	㋄ 담당자	㋅ 신고승인일자 2023/07/20		

발행번호 : 2023430971946(2023.07.28)

Page : 1/2

(1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제251조 제277조) 또한 휴대방송 반출시에는 반드시 출국심사(부두조소공행) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(http://unipass.customs.go.kr)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진본여부 확인은 전자문서의 '시점확인필' 스텝프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

USD1,294.74
USD1,294.74



수출신고필증(적재전, 을지)



※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소	노민지	⑤ 신고번호 14081-23-800291X	⑥ 세관·과 014-D9	⑦ 신고일자 2023-07-20	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 001/001)						
② 품 명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE				② 상표명		
③ 거래품명 PRO-VAC AINK						
⑩ 모델·규격		⑪ 성분	⑫ 수량(단위)	⑬ 단가(USD)	⑭ 금액(USD)	
(NO.01)						
(NO.02)						
(NO.03)						
(NO.04) PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSES)					15,000	
(NO.05)						
(NO.06)						
(NO.07)						
(NO.08)						
(NO.09)						
		001란 이하	여백			

발행 번호 : 2023430971946(2023.07.28)

Page : 2/2

(1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제251조, 제277조) 또한 휴대박송 반출시에는 반드시 출국심사(부두, 초소공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(<http://unipass.customs.go.kr>)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시정확인필' 스탬프로 클릭하여 확인할 수 있습니다.



235 | CN | 68303970

235-68303970

Shipper's Name and Address KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-ST, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA		Shipper's Account Number		Not Negotiable Air Waybill TURKISH AIRLINES Issued by ATATURK HAVALIMANI YESILKOY ISTANBUL TURKEY	
Consignee's Name and Address IRAQ		Consignee's Account Number		It is agreed that the goods described herein are accepted in apparent good order and condition (except as noted) for carriage SUBJECT TO THE CONDITIONS OF CONTRACT ON THE REVERSE HEREOF. ALL GOODS MAY BE CARRIED BY ANY OTHER MEANS INCLUDING ROAD OR ANY OTHER CARRIER UNLESS SPECIFIC CONTRARY INSTRUCTIONS ARE GIVEN HEREON BY THE SHIPPER, AND SHIPPER AGREES THAT THE SHIPMENT MAY BE CARRIED VIA INTERMEDIATE STOPPING PLACES WHICH THE CARRIER DEEMS APPROPRIATE. THE SHIPPER'S ATTENTION IS DRAWN TO THE NOTICE CONCERNING CARRIER'S LIMITATION OF LIABILITY. Shipper may increase such limitation of liability by declaring a higher value for carriage and paying a supplemental charge if required.	
Issuing Carrier's Agent Name and City SITC LOGISTICS KOREA CO., LTD		Accounting Information "FREIGHT PREPAID" SAME AS CONSIGNEE "TK PREMIUM"			
Agent's IATA Code 99-9 7530/001 4		Account No.			
Airport of Departure (Addr. of First Carrier) and Requested Routing INCHEON AIRPORT, KOREA				Reference Number	
Optional Shipping Information				Declared Value for Carriage N. V. D	
Airport of Destination ERBIL, IRAQ				Requested Flight Date TK0091/07.AUG.2023	
Handling Information 14081-23-800291X KEEP COOL 2'C TO 8'C 24TH CONTACT NO.: +82-10-4581-4515				Amount of Insurance NIL	
No. of Pieces RCP 9				Gross Weight 3,242.0	
Rate Class Q				Chargeable Weight 3,242.0	
Commodity Item No.				Rate Charge AS ARRANGED	
Nature and Quantity of Goods (incl. Dimensions or Volume) 9 PALLETS OF VACCINES PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSES)				Total AS ARRANGED	
VANO (IN DIA) PALLET NO. 1-9 MADE IN KOREA				Total Other Charges Due Agent AS ARRANGED	
Prepaid AS ARRANGED				Other Charges -INVOICE NO. & DATE K1Q #23 - 05 & JULY 18, 2023 HS CODE: 3002.42	
Weight Charge Collect				Shipper certifies that the particulars on the face hereof are correct and that, insofar as any part of the consignment contains dangerous goods, such part is properly described by name and is in proper condition for carriage by air according to the applicable ICAO Technical Instructions.	
Valuation Charge				SITC LOGISTICS KOREA CO., LTD AGENT FOR THE CARRIER : TURKISH AIRLINES	
Tax				Signature of Shipper or his Agent _____	
Total Other Charges Due Carrier AS ARRANGED				Executed on (Date) 07.AUG.23 at (Place) INCHEON, KOREA	
Total Prepaid AS ARRANGED				Signature of Issuing Carrier or its Agent _____	
Total Collect 0				For Carrier's Use only at Destination	
Currency Conversion Rates				Charges at Destination	
CC Charges in Dest. Currency				Total Collect Charges	

PRINTED BY www.pnp114.co.kr

CASS-Korea



ORIGINAL 3 (FOR SHIPPER)

235-68303970

거래명세표								번호: 2023-05	
출고일: 2023년 08월 07일				공급자	등록번호	133-81-23355			
거래처: Vano Company					상호	(주)코미팜	대표이사	문성철(인)	
					주소	경기도 시흥시 정왕동 1236-6			
					전화	(031)498-2121~5			
합계금액₩:					176,417,670		일역철천육백사십일만칠천육백칠십원정		
No	분류코드	품번·품명	규격	수량	외화금액	공급가액	기준환율		
1							1,303.90		
2									
3	330383-01	PRO-VAC SALMO-GUARD	1000DOSE		15,000	19,558,500			
4									
5									
6									
7									
8									
계					US\$135,300.00	176,417,670			

이라크

202309-3

COMMERCIAL INVOICE

SHIPPER/ SELLER (L/C BENEFICIARY) KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA E-MAIL: Jason62@komipharm.com TEL.: +82-31-498-2121 • FAX.: 82-31-498-2120 • DIRECT:+82-70-7166-8728		INVOICE NO. & DATE HYM2302 & September 08, 2023 PURCHASE ORDER NUMBER & DATE																																													
CONSIGNEE <p style="text-align: center;">YEMEN</p>		BUYER (IF OTHER THAN CONSIGNEE) <p style="text-align: center;">SAME AS CONSIGNEE</p>																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">DATE OF FACTORY OUT September 12, 2023</td> <td style="width: 50%;">DEPARTURE DATE September 16, 2023</td> </tr> </table>		DATE OF FACTORY OUT September 12, 2023	DEPARTURE DATE September 16, 2023	OTHER REFERENCE <input checked="" type="checkbox"/> KEEP REFRIGERATED. DO NOT FREEZE. <input checked="" type="checkbox"/> MANUFACTURER/ EXPORTER: THE SAME <input checked="" type="checkbox"/> COUNTRY OF PRECEDENCE/ORIGIN/ACQUISITION: KOREA																																											
DATE OF FACTORY OUT September 12, 2023	DEPARTURE DATE September 16, 2023																																														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR) HYUNDAI BUSAN / 0149W</td> <td style="width: 50%;">FROM BUSAN PORT, SOUTH KOREA</td> </tr> </table>		VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR) HYUNDAI BUSAN / 0149W	FROM BUSAN PORT, SOUTH KOREA	TERMS OF DELIVERY AND PAYMENT <input checked="" type="checkbox"/> DELIVERY TERM: CIF HODEIDAH SEAPORT, YEMEN (INCOTERMS 2010) <input checked="" type="checkbox"/> PAYMENT TERM: 100% T/T IN ADVANCE BEFORE SHIPMENT																																											
VESSEL (OCEAN)/ FLIGHT (AIR) HYUNDAI BUSAN / 0149W	FROM BUSAN PORT, SOUTH KOREA																																														
TO HODEIDAH SEAPORT, YEMEN																																															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">SHIPPING MARK</th> <th style="width: 30%;">NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION</th> <th style="width: 10%;">QUANTITY</th> <th style="width: 10%;">PRICE</th> <th style="width: 10%;">AMOUNT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 100px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> Avian Pharm for Poultry </div> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="5">KEEP REFRIGERATED (2-8°C)</td> </tr> <tr> <td colspan="5">DO NOT FREEZE</td> </tr> <tr> <td colspan="5">MADE IN KOREA</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: right; padding-top: 20px;">PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)</td> <td style="text-align: right; vertical-align: bottom;">USD 56,000.00</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">GRAND TOTAL:</td> <td style="text-align: center;">12,800 BOTTLES</td> <td></td> <td style="text-align: right;">USD 279,000.00</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: right; border-top: 1px dashed black;">////////////////////////////////////</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: right;">TOTAL AMOUNT CIF HODEIDAH SEAPORT, YEMEN:</td> <td style="text-align: right;">USD 279,000.00</td> </tr> </tbody> </table>			SHIPPING MARK	NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION	QUANTITY	PRICE	AMOUNT	<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 100px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> Avian Pharm for Poultry </div>					KEEP REFRIGERATED (2-8°C)					DO NOT FREEZE					MADE IN KOREA					PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)				USD 56,000.00	GRAND TOTAL:		12,800 BOTTLES		USD 279,000.00	////////////////////////////////////					TOTAL AMOUNT CIF HODEIDAH SEAPORT, YEMEN:				USD 279,000.00
SHIPPING MARK	NO. & KINDS OF PKGS: GOODS DESCRIPTION	QUANTITY	PRICE	AMOUNT																																											
<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 100px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> Avian Pharm for Poultry </div>																																															
KEEP REFRIGERATED (2-8°C)																																															
DO NOT FREEZE																																															
MADE IN KOREA																																															
PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE)				USD 56,000.00																																											
GRAND TOTAL:		12,800 BOTTLES		USD 279,000.00																																											
////////////////////////////////////																																															
TOTAL AMOUNT CIF HODEIDAH SEAPORT, YEMEN:				USD 279,000.00																																											
• TELEPHONE NO.: 82-31-498-2121 • FACIMILE NO.: 82-31-498-2120		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Signed By : <div style="text-align: center; margin-top: 5px;"> Komipharm International Co., Ltd. <hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> K. H. YOU / SENIOR EXECUTIVE DIRECTOR </div> </div>																																													



USD1,326.02
USD1,326.02



수출신고필증(적재전, 갑지)

※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소 노민지	⑤ 신고번호 14081-23-800361X	⑥ 세관과 014-D9	⑦ 신고일자 2023-09-11	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A
② 수출대행자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 수출자구분 A 수출화주 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 (주소) 경기 시흥시 경제로 17 (주)코미팜 (대표자) 문성철 (소재지) 15094 (사업자등록번호) 133-81-23355		⑪ 거래구분 11 일반형태	⑫ 종류 A 일반수출	⑬ 결제방법 TT 단순송금방식	
		⑭ 목적국 YE YEMEN	⑮ 적재항 KRPUS 부산항	⑯ 선박회사 (항공사)	
		⑰ 선박명(항공편명)	⑱ 출항예정일자	⑲ 적재예정보세구역 03099999	
		⑳ 운송형태 10 FC	㉑ 검사희망일 2023/09/11		
		㉒ 물품소재지 15094 경기 시흥시 경제로 17 (주)코미팜 (주)코미팜 /			
③ 제조자 (주)코미팜 (통관고유부호) 코미팜**-1-72-1-01-1 제조장소 15094 산업단지부호 999		㉓ L/C번호		㉔ 물품상태 N	
		㉕ 사전입시개청통보여부 N		㉖ 반송 사유	
④ 구매자 (구매자부호)		㉗ 환급신청인 2 (1:수출대행자/수출화주, 2:제조자) 자동간이정액환급 NO			
● 품명·규격 (란번호/총란수 : 001/001)					
① 품명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE			② 상표명		
③ 거래품명 PRO-VAC CHECK ND					
④ 모델·규격		⑤ 성분	⑥ 수량(단위)	⑦ 단가(USD)	⑧ 금액(USD)
		1 란 을 지	계 속		
⑨ 세번부호 300242-9000	⑩ 순중량 5,756.0 (KG)	⑪ 수량 0 0	⑫ 신고가격(FOB) \$275,925	₩365,881,520	
⑬ 송품장부호 HYM2302	⑭ 수입신고번호	⑮ 원산지 KR--N	⑯ 포장갯수(종류) 18(PG)		
③ 수출요건확인 (발급서류명)					
⑰ 총중량 6,395.0 (KG)	⑱ 총포장갯수 18(PG)	⑲ 총신고가격(FOB) \$275,925	₩ 365,881,520		
⑳ 수입(W) 3,978,060	㉑ 보험료(W)	㉒ 100,000	㉓ 결제금액	CIF-USD-279,000.00	
㉔ 수입화물 관리번호		㉕ 컨테이너번호		N	
※신고인기재란 선적기간 : 2023-09-11 - 2023-10-11		㉖ 세관기재란 '20.7.1일부터 중소기업의 컨테이너 수출입하물에 대해 세관검사비용을 지원하고 있으니, 지원 대상여부를 확인하시어 신청하시기 바랍니다. (unipass.customs.go.kr)			
⑳ 운송(신고인) 기간 부터 까지		㉗ 적재의무기한 2023/10/11	㉘ 담당자	㉙ 신고수리일자 2023/09/11	



발행번호 : 2023446327430(2023.09.11)

Page : 1/2

(1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제251조 제277조) 또한 휴대박송 반출시에는 반드시 출국심사(부두초소공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(http://unipass.customs.go.kr)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시점확인필' 스텝으로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

USD1,326.02
USD 1,326.02



수출신고필증(적재전, 을지)



※ 처리기간 : 즉시

① 신고자 토탈 관세사무소	노민지	⑤ 신고번호 14081-23-800361X	⑥ 세관과 014-D9	⑦ 신고일자 2023-09-11	⑧ 신고구분 H 일반P/신고	⑨ C/S구분 A
●품명·규격 (란번호/총란수 : 001/001)						
② 품 명 VACCINES FOR VETERINARY MEDICINE			⑤ 상표명			
③ 거래품명 PRO-VAC CHECK ND						
⑩ 모델·규격	⑪ 성분	⑫ 수량(단위)	⑬ 단가(USD)	⑭ 금액(USD)		
(NO.01)						
(NO.02)						
(NO.03)						
(NO.04)						
(NO.05)						
(NO.06)						
(NO.07)						
(NO.08) PRO-VAC SALMO-GUARD (1,000 DOSE)				56,000		
(NO.09)						
		001란 이하	여백			

발행 번호 : 2023446327430(2023.09.11)

Page : 2/2

(1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소됨과 아울러 과태료가 부과될 수 있으므로 적재사실을 확인하시기 바랍니다.

(관세법 제253조 제273조) 또한 휴대탁송 반출시에는 반드시 출국심사(부두, 조소공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

(2) 수출신고필증의 진위여부는 수출입통관정보시스템에 조회하여 확인하시기 바랍니다.(<http://unipass.etsms.go.kr>)

* 본 신고필증은 전자문서(PDF파일)로 발급된 신고필증입니다.

* 출력된 신고필증의 진위여부 확인은 전자문서의 '시점확인필' 스텝으로 클릭하여 확인할 수 있습니다.

BILL OF LADING



Shipper / Exporter (Complete name and address) KOMIPHARM INTERNATIONAL CO., LTD. 17, GYEONGJE-RO, SIHEUNG-SI, GYEONGGI-DO, SOUTH KOREA E-MAIL: JASON62@KOMIPHARM.COM TEL: +82-31-498-2121 FAX: 82-31-498-2120 DIRECT:+82-70-7166-8728		Booking No. SELA21151600	B/L No. HDMU SELA21151600
Consignee (Complete name and address) YEMEN		Export References	
Notify Party (Complete name and address) YEMEN		Forwarding Agent References	
Pre-Carriage by		Place of Receipt* BUSAN PORT, SOUTH KOREA	Port of Discharge HODEIDAH SEAPORT, YEMEN
Ocean Vessel / Voyage / Flag HYUNDAI BUSAN V# 0149W		Port of Loading BUSAN PORT, SOUTH KOREA	Place of Delivery* HODEIDAH SEAPORT, YEMEN
Onward Inland Routing (For the Merchants Ref.)		For Transshipment to	Final Destination (For the Merchants Ref.)

PARTICULARS FURNISHED BY SHIPPER

Container No./Seal No. Marks and Numbers	No. of Containers or Other Pkgs	Description of Packages and Goods	Gross Weight	Measurement
AVIAN PHARM FOR POULTRY (IN DIA) KEEP REFRIGERATED (2-8'C) DO NO FREEZE MADE IN KOREA	"SHIPPER'S LOAD, COUNT, SEALED & WEIGHT S.T.C." 1 X 40'H RF CONTAINER 18 PALLETS 18 PALLETS OF	PRO-VAC SALMO-GUARD (1000 DOSE) 2,200 BOTTLES -INVOICE NO. & DATE HYM2302 & SEPTEMBER 08, 2023 CARGO IS STOWED IN REFRIGERATED CONTAINERS AT	6,395.000 KGS	29.5800 CBM
TEMU9677620 / 230636151		RF 4H CY / CY		

=FREIGHT PREPAID =
CY / CY



Total Number of Containers or Packages (in words) **ONE (1) CONTAINER ONLY**

Freight & Charges	Rate	Unit	Prepaid	Collect
FREIGHT ALL AS ARRANGED				

Declared Value (Optional) : US \$

(PACKAGE LIMITATION CLAUSE)
 Section 4. (5) of U. S. Carriage of Goods by Sea Act 1924: Neither the carrier nor the ship shall in any event be or become liable for any loss or damage to or in connection with the transportation of goods in an amount exceeding 1500 per package (or its equivalent in other units) unless the nature and value of such goods have been declared by the shipper before shipment and entered in the Bill of Lading and additional freight has been paid as required. This declaration, if embodied in the Bill of Lading, shall be prima facie evidence, but shall not be conclusive on the carrier. THIS LIMITATION OF LIABILITY SHALL APPLY TO ALL SHIPMENTS INVOLVING CARRIAGE OF THE GOODS TO OR FROM A PORT OF THE UNITED STATES, INCLUDING ALL STAGES OF MULTIMODAL TRANSPORTATION.

Number of Original B(s) / L **THREE (3)** On Board Date **SEP. 16, 2023**
 (OBD: SEPTEMBER SIXTEENTH, 2023)
 Dated at **SEOUL, KOREA** SEP. 16, 2023
HMM CO., LTD. AS CARRIER

By _____

거 래 명 세 표

번호: 2023-02

출 고 일: 2023년 09월 16일		공 급 자	등록번호	133-81-23355			
거 래 처: Avian Pharm For Poultry			상 호	(주)코미팜	대표이사	문 성 철(인)	
			주 소	경기도 시흥시 정왕동 1236-6			
			전 화	(031)498-2121 ~ 5			
		합계금액₩:	374,139,000 삼억칠천사백일십삼만구천원정				
No	분류코드	품 번 · 품 명	규격	수 량	외화금액	공급가액	기준환율
1							1,341.00
2							(04/11선수)
3							
4							
5	330383-01	PRO-VAC SALMO-GUARD	1.000DOSE		56,000	75,096,000	
계					\$279,000.00	374,139,000	

예 멘

임상시험계획서 제출

주식회사 코 미 팜

우 15094 경기도 시흥시 경제로 17 / 전화(031)498-6104(0193) / 전송(031)498-6220 담당:오 향

문서번호: 코미팜 제2023-0158호	선			지		
시행일자: 2023. 12. 29.	결			시		
수 신: 농림축산검역본부장	접	일자		결	채	
참 조: 동물약품관리과		시간				
		번호				
	처리과			공		
	담당자			람		

제 목: [PRO-VAC SSLMO-Ghost] 야외임상시험 계획서 제출에 관한 건

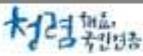
1. 귀 본부의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 당사는 [PRO-VAC SALMO-Ghost] 백신의 품목허가를 위한 야외임상시험을 실시하고자 야외임상시험계획서를 제출하오니, 검토 바랍니다.

- 첨부 1. [PRO-VAC SALMO-Ghost]야외임상시험계획서(전임상자료 포함)
- 첨부 2. [PRO-VAC SALMO-Ghost]예비 부표(공개)
- 첨부 3. [PRO-VAC SALMO-Ghost]예비 부표(비공개)
- 첨부 4. [PRO-VAC SALMO-Ghost]임상시험기관지정서
- 첨부 5. [PRO-VAC SALMO-Ghost]시험백신 제조지시기록서 및 자가시험성적서

맺음.

경기도 시흥시 경제로 17
 주식회사 코 미 팜
 대표이사 문 성



<h2 style="margin: 0;">4대 사회보험 사업장 가입자 명부</h2>						
확인용						
발급번호	20240116869473	발급일시	2024-01-16 08:38	사업장 관리번호	13381233550	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업자등록번호	133-81-23355	133-81-23355	133-81-23355	133-81-23355		
사업장 명칭	(주)코미팜	(주)코미팜	(주)코미팜	(주)코미팜		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 1						
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1		원현숙	2022.05.09	2022.05.09	2022.05.09	2022.05.09
이하 여백						
▷ 위 사업장 가입자 명부는 [확인용]으로 신청·발급된 것임을 알려드립니다. - [확인용]은 4대 사회보험의 업무목적을 위해서만 제공하는 것이므로 재직증명용, 경력증명용, 대출용 등 다른 용도로 사용시에는 발급 기관에 법적 책임이 없다는 점을 알려드립니다. - 타 기관 제출을 위한 용도로 발급을 원하시는 경우에는 각 공단 지사 창구로 신청하시기 바랍니다. ▷ 위 사업장 가입자 명부는 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계 받아 제공하는 것입니다. (문의전화: 국민연금 1355, 건강보험 1577-1000, 산재·고용보험 1588-0075) - 사업장 가입자 명부의 내용이 사실과 다를 경우에는 해당 공단으로 문의하시기 바랍니다. - 과거 가입내역은 해당 보험별 각 공단에 문의하여 발급받으시기 바랍니다. ▷ [산재보험]의 경우, '자격취득일'은 근로자 고용일을 뜻하며, 건설업 및 발목업 등 '자진신고 사업장'은 근로자 고용정보 신고 대상이 아니므로 '자격취득일(고용일)'은 표기되지 않습니다. ▷ 위 사업장 가입자 명부는 [사업장 관리번호]를 기준으로 작성되었습니다.						
위와 같이 국민연금 가입내역을 확인합니다.		위와 같이 건강보험 가입내역을 확인합니다.		위와 같이 산재보험 가입내역을 확인합니다.		위와 같이 고용보험 가입내역을 확인합니다.
국민연금 이 사 		국민건강보 이 사 		근로복지 안산지사 		근로복지 안산지사 
						

본	▷ 위 사업장 가입자 명부는 4대사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계받아 제공하는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일까지 4대사회보험 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 [발급사실확인] 메뉴에서 확인 가능합니다. *청렴한 정보연계서비스, 4대 사회보험이 함께 합니다.*
----------	--

제 2023 - M00783 호

졸업예정증명

성명	박성현
성도	별임
대학	수의과대학
학과	수의학과
입학년월일	2018년 3월 1일
졸업예정년월일	2024년 2월 22일
예정학위명	
부전	전
제2전	전
연계전	전
융합전	전
복수전	전

마이크로 디그리
위의 사실을 증명합니다.

2023년 11월 20일

전북대학교 총장



•우) 54896 전북 전주시 박제대로 567 전북대학교 학사관리과 (063) 270-2094
 • 이 증명서는 자동발급기로 발급한 것입니다.

2) 목표 달성 수준

- 1차년도

추진목표	달성내용	달성도(%)
○ 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 안전성 및 유효성 평가	○ 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 안전성 평가 완료	100
	○ 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 유효성 평가 완료	100
○ 연속 3 Lot 시험 백신의 방어 효능 평가	○ 최종 결정된 항원 함량이 함유된 연속 3 Lot 시험 백신 제조 완료	100
	○ 연속 3 Lot 시험 백신에 대한 독성 평가 완료	100
	○ 연속 3 Lot 시험 백신에 대한 닭을 대상으로 근육 접종 후 백신의 안전성 평가 완료	100
	○ 연속 3 Lot 시험 백신을 산란계를 대상으로 근육 접종 후 야외 독성 살모넬라 균주로 도전감염 하여 방어 효능 평가 완료	100
○ 살모넬라 3가 불활화 백신의 검정법 확립	○ 백신 완제품에 대한 각 Batch 별 품질검사를 위한 마우스에서의 품질 검사법 가능성 평가 완료	100
	○ 마우스에서 백신 근육 접종 후 항체 역가를 비교하여 백신의 품질 검사법 가능성 평가 및 확립 완료	100
○ 살모넬라 3가 불활화 오일 백신 시제품 제조	○ 백신주 3종에 대한 master seed stock 확보 및 증식성 확인 완료	100
	○ 뉴노멀 사균체 백신 제조 기술 기반 항원 함량별 3Lot 백신 제조완료	100
	○ 포르말린 불활화 사균체 백신 제조기술 기반 시험 백신 제조 완료	100
○ 연속 3 Lot 시험 백신 제조	○ 뉴노멀 사균체 백신기술 기반으로 최종 결정된 항원 함량이 함유된 연속 3 Lot 시험 백신 제조 완료	100
○ 연속 3 Lot 시험 백신에 대한 자가 검정시험	○ 확립된 자가 검정시험법에 따라 연속 3Lot 시험 백신에 대한 자가 검정시험 완료	100
○ 수출용 허가 취득 및 해외 수출	○ 2022년도에 수출용 허가 취득함	100
	○ 2022년도 160백만원 수출 2023년도 248백만원 수축 초과 달성	100
○ 임상 시험 신청 및 보완 사항 대응	○ 야외임상시험 계획서 제출	100

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 3개 농장 대상 야외 임상 시험	○ 시험백신 품목 허가를 위한 야외 임상시험 허가 후 3개의 닭 농장을 대상으로 야외 임상실험 수행하여 항체역가 및 산란율 측정 중(中).	90
	○ 백신 접종 군과 백신 미접종군에서의 살모넬라 병 발생 양상 비교 완료	100
	○ AIV, NDV, IBV, EDSV 등의 항체를 검사하여 살모넬라 외 다른 질병에 대한 모니터링 완료	100
○ 시판 백신과의 효능 비교 평가	○ 목적동물인 산란계를 대상으로 현재 판매되고 있는 약독화 생균 백신 SG9R을 피하접종하고, 제작된 시험백신은 근육접종 후 야외 독성 균주로 도전감염 후 도전감염 균주에 대한 방어 여부로 시판 백신과 시험 백신의 효능을 비교 평가 완료	100
○ 백신 접종 프로그램 연구	○ 시판 약독화 생균 백신만을 접종한 군, 시판 약독화 생균 백신 접종 후 추가 백신으로 시험 백신 접종군, 시험 백신 2회 접종 군을 각각 추천하는 방법에 따라 백신을 접종 한 후 항체 지속 기간 및 최종 백신 접종 후 일정 기간이 지난 후에 야외 독성 균주에 대한 방어 여부로 최적의 백신 프로그램 결정 완료	100
○ 백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 평가	○ 유효기간 24개월 확인하기 위해 제조된 3 Lot 시험 백신의 품목 허가 사항 중 유효기간 설정을 위해 제조된 시험 백신의 제조시점, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 18개월, 24개월 정기적인 안정성을 평가함, 현재까지 12개월까지 평가 완료	75
○ 품목허가 신청	○ 품목허가 신청하기 위한 야외 임상시험 계획 신청 완료	60
○ 해외 임상시험	○ 살모넬라 3가 불활화백신 수출하여 농장 사용평가 중	90

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

가. 2차년도 3개 농장 대상 야외 임상시험 (1) (주)코미팜에서 제조된 연속 3Lot 시험 백신을 3개 양계농장을 대상으로 한 야외 임상실험의 경우 시험백신에 대한 효능평가를 진행하기 위해 항체가 검사를 수행하였다. 계획상 예정되어있던 20 WPPI에 채혈하여 항체역가를 측정했어야 하지만 실험 일정상 20 WPPI의 채혈 예정일은 2024년 2월 29일으로, 결과보고서 제출일 이후에 계획되어 있어 최종 보고서에 그 결과를 첨부하고자 함. 마찬가지로 최초 산란 개시일 부터 10주차 까지 산란율 측정예정이며 최종관찰일은 2월 마지막 주 이므로 항체역가와 마찬가지로 최종 보고서에 그 결과를 첨부하고자 함.

나. 백신 유효기간은 통상 24개월로 설정하기 때문에 백신 제조일부터 12개월만 경과하여 안정성 평가 모두 적합한 결과 나왔으나 향후 18개월, 24개월 도래시 추가 시험 통해서 안정성 평가할 계획임

다.야외 임상 시험 계획서 신청 완료. 계획서 심사 결과 나오기 전 상태 임, 향후 심사 결과에 따라 보완 대응하거나, 야외 임상시험 결과 작성 및 제출 품목 허가 신청 계획
라. 수출 중인 제품으로 현재 해외 농장 평가를 위한 실험이 수행 중이며 현재 중동지역의 지정학적인 이유로 추가 협의가 필요함

2) 자체 보완활동

해당사항 없음

3) 연구개발 과정의 성실성

주관연구개발기관인 전북대학교 산학협력단과 협동연구개발기관인 (주)코미팜은 유기적인 협력을 통해 1차년도와 2차년도에 계획했던 세부 연구 목표를 성실히 수행하였으며 대부분 세부연구목표에 대해 100% 수행 완료 하였으나 시험 기간이 비교적 긴 일부 실험의 경우에는 2024년 2월 29일 마지막 채혈만을 남겨두고 있다. 더불어 2022년 해외 수출 전용 백신을 허가 받아 2022년도와 2023년도에 목표 이상의 매출을 달성하였다.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기술적 기대성과 및 파급효과

- 약독화 생균 같은 뉴노멀 불활화 사균체를 유도하여 인수공통감염 세균인 살모넬라 엔터라이트 디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸을 동시에 예방할 수 있는 맞춤형 백신을 개발하여 수출 활성화 기대
- 약독화 생균 백신 수준의 방어력을 확보한 세포 내 기생 세균에 대한 뉴노멀 불활화 사균체 백신 개발 기술을 확보하여 각 나라에 맞는 맞춤형 백신 제조 생산 및 판매 기대
- 대량 배양 세균에 대한 직접적인 첨가를 통한 신개념 사균체 제조 기술 구축을 통한 세포 내 기생 세균에 대한 방어력이 우수한 안전한 뉴노멀 불활화 사균체 백신의 제조 생산 원가 절감 효과 극대화 기대

○ 경제 산업적 기대효과 및 파급효과

- 제품의 산업화에 기반한 동물의약품의 수출을 통한 외화 획득 기대
 - 대량 배양된 세균에 대한 직접 첨가를 통한 제조기술의 확립을 통해 저렴하면서 효능이 우수한 뉴노멀 불활화 사균체 백신 제조에 따른 국가 경쟁력 향상 기대
 - 가금에서 백신에 의한 인수공통감염병 미연 방지에 따른 인체로의 감염 기회 감소에 따른 농가 피해 및 국민 안전에 기여 효과
 - 백신 수입 대체 효과 기대
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 가금에서 인수공통감염병의 원인균인 살모넬라 엔터라이티디스와 살모넬라 타이피뮤리움 그리고 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸에 의한 살모넬라증을 예방할 수 있는 제품의 상품화를 통해 국내 및 해외 수출 활용
2. 뉴노멀 형태의 백신 개발로 인한 수입 대체 효과 및 수출 활용
3. 안전하면서 효능이 우수한 약독화 생균 같은 뉴노멀 불활화 사균체의 새로운 형태의 백신 개발을 통한 양계 농가의 질병 해소에 따른 양계 농가에 경제적 도움
4. 주요 세균성 인수공통감염병인 살모넬라를 미연에 차단할 수 있어 안전한 먹거리 제공에 따른 국민 신뢰감 회복에 이은 계란 수급의 안정화에 활용
5. 가금에서 살모넬라균을 완벽하게 근절할 수 있는 기술을 확인하여 다음 연구 과제 신청 및 근절 기술의 특허 출원 및 등록 그리고 기술이전을 통한 국내외 살모넬라 근절 기술 홍보 및 판매에 활용

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시		1	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2.	1)
	2)

< 별첨 자료 >

참고문헌

- 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(4): 1734-1738.
- Alves Batista DF, Freitas Neto OC, Maria de Almeida A, Maboni G, Carvalho TF, Carvalho TP, Berchieri A. 2018. Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. *PloS one* 13(7): e0200585.
- 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(1): 101-106.
- Barrow PA, Lovell MA. 1991. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* enteritidis phage type 4. *Avian Pathol* 20: 335-348.
- 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(3): 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(3-4): 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(2-3): 167-179.
- Desin TS, Köster W, Potter AA. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 12(1): 87-96.
- Eng SK, Pusparajah P, Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8: 284-293.
- Feberwee A, de Vries TS, Elbers AR, de Jong WA. 2000. Results of a *Salmonella* enteritidis vaccination field trial in broilerbreeder flocks in the Netherlands. *Avian Dis* 44: 249-255.
- 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(12): 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(3): 381-388.
- Garmory HS, Brown KA, Titball RW. 2002. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26(4): 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(4): 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(4): 992-999.
- Helms M, Ethelberg S, Mølbak K, DT104 Study Group. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992 - 2001. *Emerg Infect Dis* 11(6): 859-867.
- Holt PS, Macri NP, Porter RE Jr. 1995. Microbiological analysis of the early *Salmonella* enteritidis

- infection in molted and unmolted hens. *Avian Dis* 39: 55-63.
- Holt PS. 1993. Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella* enteritidis infection. *Avian Dis* 37: 412-417.
- Howard ZR, Moore RW, Zabala-Diaz IB, Landers KL, Byrd JA, Kubena LF, Nisbet DJ, Birkhold SG, Ricke SC. 2005. Ovarian laying hen follicular maturation and in vitro *Salmonella* internalization. *Vet Microbiol* 108: 95-100.
- 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(2): 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(1): 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(50): 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(45): 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(3): 130-136.
- Jeong HJ, Shin EK, Park JS, Han JH, Kim JY, Yoo JE. 2022. Trends in Serotype Distribution of *Salmonella* enterica Isolated from Diarrheal Patients in Korea, 2019 to 2021. *PHWR* Vol 15, No 38: 2615-2624.
- 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(1-2): 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(11): 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(1): 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(2): 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(1): 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(1): 68-74.
- Kim YH, Kim KH, Woo YK, Chang YS, Cho MH, Kim SW. 1997. The variation of serological titers on the chickens infected pullorum disease from Kyongbuk provinces. *Korea J Vet Serv* 20(1): 19-26.
- Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. 2017. *Salmonella* infection: interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol Lett* 2017;190: 42-50.

- Kwon HJ, Cho SH. 2011. Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. *Vaccine* 29: 1311–1318.
- Lillehoj EP, Yun CH, Lillehoj HS. 2000. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Anim Health Res Rev* 1(1): 47–65.
- Lillehoj HS. 2018. Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. *Avian cellular immunology* 155–182.
- 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(2): 197–205.
- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. 2001. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 161(2): 132–164.
- McSorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK. 2000. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella* typhimurium. *J Immunol* 164(2): 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(4): 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(1): 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(4): 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(2): 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(1): 51–60.
- Nandre RM, Chaudhari AA, Matsuda K, Lee JH. 2011. Immunogenicity of a *Salmonella* Enteritidis mutant as vaccine candidate and its protective efficacy against salmonellosis in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 144(3–4): 299–311.
- Nauciel C. 1990. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella* Typhimurium infection. *J Immunol* 145(4): 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(5): 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(3–4): 193–201.
- Pascual DW, Trunkle T, Sura J. 2002. Fimbriated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium abates initial inflammatory responses by macrophages. *Infect Immun* 70(8): 4273–4281.
- Revolledo L. 2018. Vaccines and vaccination against fowl typhoid and pullorum disease: An overview and approaches in developing countries. *Journal of Applied Poultry Research* 27(3): 279–291.
- 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(5): 224–228.

- Ryu JY, Jun MH, Chang KS, Son HS, Kwak HK, Park KJ, Woo YK. 1999. Isolation of *Salmonella* from the layer chickens reacting in pullorum-typhoid agglutination test. Korean J Vet Serv 22(3): 221-237.
- 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(7): 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.
- Singh BR. 2009. *Salmonella* vaccines for animals and birds and their future perspective Open Vaccine J 2: 100-112.
- 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(5386): 121-125.
- Wigley P. 2017. *Salmonella* enterica serovar Gallinarum: addressing fundamental questions in bacteriology sixty years on from the 9R vaccine. Avian Pathology 46(2): 119-124.
- 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(2): 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 activates the adaptive immune response. J Vet Sci 19(4): 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(4): 784-792.
- Yang SY, Hong YH, Lee HJ, Song CS. 2010. Hygienic management for Salmonella-free chicken meat production. Korean J Poul Sci 37(3): 289-295.

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.