

119055-02

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종 보고서

발간등록번호  
11-1543000-003465-01

# 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발

2021. 04. 09

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단  
협동연구기관 / (주)카브

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

위  
한  
가  
금  
에  
서  
살  
모  
넬  
라  
저  
감  
화  
를  
위  
한  
총  
합  
방  
제  
대  
책  
법  
개  
발  
를  
위  
한  
2021  
농  
림  
축  
산  
식  
품  
부  
농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발”(개발기간 :  
2019. 05. 27~ 2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 04. 09.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

(대표자) 송 창 선 (인)



협동연구기관명 : ㈜카브

(대표자) 송 창 선 (인)



주관연구책임자 : 서 건 호

협동연구책임자 : 김 규 직

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

|                  |             |                              |   |                |   |
|------------------|-------------|------------------------------|---|----------------|---|
| 과제고유번호           | 119055-2    | 해 당 단 계<br>연 구 기 간           | 2019. 05. 27~<br>2020. 12. 31<br>(20개월) | 단 계 구 분        | 2/2   |
| 연구사업명            | 단 위 사 업     | 농식품기술개발사업                    |   |                |   |
|                  | 사 업 명       | 가축질병대응기술개발사업                 |   |                |   |
| 연구과제명            | 대 과 제 명     | (해당 없음)                      |   |                |   |
|                  | 세부 과제명      | 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발 |   |                |   |
| 연구책임자            | 서건호         | 해당단계<br>참여연구원<br>수           | 총: 25 명<br>내부: 25 명<br>외부: 0 명          | 해당단계<br>연구개발비  | 정부:450,000천원<br>민간:150,000천원<br>계:600,000천원 |
|                  |             | 총 연구기간<br>참여연구원<br>수         | 총: 25 명<br>내부: 25 명<br>외부: 0 명          | 총 연구개발<br>비    | 정부:450,000천원<br>민간:150,000천원<br>계:600,000천원 |
| 연구기관명 및<br>소속부서명 | 건국대학교 산학협력단 |                              |   | 참여기업명<br>(주)카브 |   |
| 국제공동연구           | 상대국명:       |                              |   | 상대국 연구기관명:     |   |
| 위탁연구             | 연구기관명:      |                              |   | 연구책임자:         |   |

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| 연구개발성과의<br>보안등급 및<br>사유 | 일반 과제 |
|-------------------------|-------|

9대 성과 등록·기탁번호

| 구분          | 논문 | 특허 | 보고서<br>원문 | 연구시설<br>·장비 | 기술요약<br>정보 | 소프트<br>웨어 | 화합물 | 생명자원     |          | 신품종 |    |
|-------------|----|----|-----------|-------------|------------|-----------|-----|----------|----------|-----|----|
|             |    |    |           |             |            |           |     | 생명<br>정보 | 생물<br>자원 | 정보  | 실물 |
| 등록·기탁<br>번호 | ✓  | ✓  |           |             |            |           |     |          |          |     |    |

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

| 구입기관 | 연구시설·<br>장비명 | 규격<br>(모델명) | 수량 | 구입연월일 | 구입가격<br>(천원) | 구입처<br>(전화) | 비고<br>(설치장소) | NTIS<br>등록번호 |
|------|--------------|-------------|----|-------|--------------|-------------|--------------|--------------|
|      |              |             |    |       |              |             |              |              |
|      |              |             |    |       |              |             |              |              |

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

- 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립
  - 가. 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구 조사 완료
  - 나. 효과적인 대응방법 선별 및 국내와의 유사도와 적용 가능성 분석 완료
  - 다. 국내 가금류 농장 내 살모넬라 발생 현황 조사
  - 라. 차단방역 시설 및 소독제의 농가 환경 내 효능 확인
- *Salmonella* Enteritidis (SE) 저감화 방법의 실험실 내 평가 및 농장 현장에서 농장별/사육형태별 효능 평가 및 시제품 제작
  - 가. 살모넬라 저감화방법 선별(유산균 및 박테리오파지 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험)을 통한 효과 확인
  - 나. 케피어 유래 유산균의 분리 확보 및 현장 적용을 통한 기술이전 실시 및 사료첨가제로써 시제품 제작 예정
  - 다. 살모넬라 혈청형 D그룹 균주[SE 및 *S. Gallinarum* (SG) 포함] 특이 신속 검출용 PCR 키트 제작 기술 확립
- 살모넬라 저감화 방법 선별 및 표준화
  - 가. 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출
  - 나. 살모넬라 저감화를 위한 방역 SOP 작성
  - 다. 살모넬라 저감화 방제사업에 활용한 유산균 균주 선별
  - 라. 선별된 유산균 균주에 대한 살모넬라 저감화 효능 확인
- 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화
  - 가. 선별된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 확인을 위한 양계 농장 투여 실험 완료
  - 나. 살모넬라 저감화에 효과가 있는 균주의 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 추가 계획 연구 수립
  - 다. 도출된 대응방법을 토대로 국가정책 도입을 위한 정책건의 실시

## <국문요약문>

|                           |  |      |        |     |     |
|---------------------------|--|------|--------|-----|-----|
| 연구의<br>목적 및 내용            | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립</li> <li>■ 살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화</li> <li>■ 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화</li> </ul>   |      |        |     |     |
| 연구개발성과                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사 완료</li> <li>나. 효과적인 대응방법 선발 및 국내와의 유사도와 적용 가능성 분석 완료</li> <li>다. 국내 가금류 농장 내 살모넬라 발생 현황 조사</li> <li>라. 차단방역 시설 및 소독제의 농가 환경 내 효능 확인</li> </ul> </li> <li>■ <b>Salmonella Enteritidis (SE) 저감화 방법의 실험실 내 평가 및 농장 현장에서 농장별/사육형태별 효능 평가 및 시제품 제작</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 살모넬라 저감화방법 선발(유산균 및 박테리오파지 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험)을 통한 효과 확인</li> <li>나. 케피어 유래 유산균의 분리 확보 및 현장 적용을 통한 기술이전 실시 및 사료첨가제로써 시제품 제작</li> <li>다. 살모넬라 혈청형 D그룹 균주[SE 및 S. Gallinarum (SG) 포함] 특이 신속 검출용 PCR 키트 제작 기술 확립</li> </ul> </li> <li>■ <b>살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출</li> <li>나. 살모넬라 저감화를 위한 방역 SOP 작성</li> <li>다. 살모넬라 저감화 방제사업에 활용할 유산균 균주 선발</li> <li>라. 선발된 유산균 균주에 대한 살모넬라 저감화 효능 확인</li> </ul> </li> <li>■ <b>표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 확인을 위한 양계 농장 투여 실험 완료</li> <li>나. 살모넬라 저감화에 효과가 있는 균주의 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 추가 계획 연구 수립</li> <li>다. 도출된 대응방법을 토대로 국가정책 도입을 위한 정책건의 실시</li> </ul> </li> </ul> |      |        |     |     |
| 연구개발성과의<br>활용계획<br>(기대효과) | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 방제 프로그램 개발 및 적용을 통한 가금에서의 질병 예방 체계 구축 및 안전축산물 생산 기여</li> <li>■ 야외감염 살모넬라균의 신속 감별 검출법 개발을 통한 효과적인 방제 및 검사체계 확립, 가금축산물 수출 토대 구축</li> <li>■ 국가 및 OIE 살모넬라 표준실험실과 공동연구로 균주 DB 구축과 국내 살모넬라의 체계적 조사 및 세계적 위상 확대에 기여</li> </ul>  |      |        |     |     |
| 국문핵심어<br>(5개 이내)          | 가금   | 살모넬라 | 인수공통질병 | 제어법 | 검출법 |

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## <SUMMARY>

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <p>Purpose and contents</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Establishment of control measures for reducing a zoonotic pathogen, <i>Salmonella</i> Enteritidis, in poultry</li> <li>■ Determination and standardization of control measures for reducing <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>■ Establishment of disease control and prevention system and maximization of management effectiveness by applying the standardized control measures for the pathogen reduction</li> </ul>   |
| <p>Results</p>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>Establishment of control measures for reducing a zoonotic pathogen, <i>Salmonella</i> Enteritidis, in poultry</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Information collection on the control measures for reducing <i>Salmonella</i> spp. in foreign countries including the US and EU</li> <li>– Determination of effective control measures and analysis of similarities with domestic control measures and applicability</li> <li>– Survey on the incidence of <i>Salmonella</i> infection in domestic chicken farms</li> <li>– Confirmation for the effectiveness of biosecurity facilities and disinfectants in chicken farms</li> </ul> </li> <li>■ <b><i>In vitro</i> assessment of the control measures and the effectiveness for reducing <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) at the farm level by the types of farm and management through the application of the products to reduce SE</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Confirmation of the effectiveness via determination of the control measures for reducing <i>Salmonella</i> spp. by using probiotics and bacteriophages</li> <li>– Isolation of probiotics derived from kefir, production of the probiotics as feed supplements, and technology transfer by applying the product at farm level</li> <li>– Development of a PCR Kit to detect rapidly and specifically <i>Salmonella</i> sero group D, including SE and <i>S. Gallinarum</i> (SG)</li> </ul> </li> <li>■ <b>Determination and standardization of control measures for reducing <i>Salmonella</i> spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– SOP development and standardization to reduce <i>Salmonella</i> spp. in chicken farms</li> <li>– Development of biosecurity SOP for reducing <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>– Isolation and selection of probiotic strains for the control measures to reduce <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>– Confirmation for the effectiveness of the selected probiotics reducing <i>Salmonella</i> spp.</li> </ul> </li> <li>■ <b>Establishment of the preventive control system and maximization of management effectiveness by applying the standardized control measures for the pathogen reduction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Confirmation of the effectiveness of the selected probiotics for controlling <i>Salmonella</i> spp. through field testing</li> <li>– Establishment of additional research plan for the control measures with the selected probiotics to reduce <i>Salmonella</i> spp. in broiler and layer chicken farms</li> <li>– Suggestion of policy proposal for the introduction of national policy based on the established control measures</li> </ul> </li> </ul> |
| <p>Expected contribution</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Contribution to the establishment of disease control and prevention system and the production of safe products in the poultry industry via</li> </ul>   |

|          |   |                   |          |                  |                   |
|----------|---|-------------------|----------|------------------|-------------------|
|          | <p>development and application of the preventive control measures to reduce <i>Salmonella</i> spp.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Establishment of the effective control measures, detection system, and foundation to export poultry products by developing rapid detection method for <i>Salmonella</i> spp. in farms</li> <li>■ Establishment of database of <i>Salmonella</i> spp. strains, systematic survey of <i>Salmonella</i> infection, and contribution to globalization through collaboration with National and OIE <i>Salmonella</i> reference laboratories</li> </ul> |                   |          |                  |                   |
| Keywords | Poultry   | <i>Salmonella</i> | Zoonosis | Control Measures | Detection Methods |

<본문목차>

< 목 차 >

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 제 1 장. 연구개발과제의 개요 .....         | 8   |
| 제 2 장. 연구수행 내용 및 결과 .....       | 36  |
| 제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ..... | 122 |
| 제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등 .....      | 149 |
| 붙임. 참고 문헌 .....                 | 150 |

- <별첨 1> 연구개발보고서 초록
- <별첨 2> 자체평가의견서
- <별첨 3> 연구성과 활용계획서



# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

### 1. 최종목표

- 가. 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 종합적 방제 대책 수립
- 나. 살모넬라 저감화를 위한 진단/검사/방제법 개발, 가이드라인의 설정, 현장 적용 및 산업화
- 다. 개발 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 “살모넬라 국가종합방제대책” 수립

### 2. 세부목표

- 가. 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립
  - (1) 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사
  - (2) 국내 가금류농장 내 살모넬라 발생 현황 조사

- 나. 살모넬라 저감화 방법 선별 및 표준화

- (1) 살모넬라 저감화 방법 선별 (유산균, 백신 및 박테리오파지의 개별 또는 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인)
- (2) 차단방역 시설 및 소독의 농가 환경 내 저감화 효과 확인 (계사 내 시설, 바닥, 음용수 및 환기시설 등)

- 다. 국내 농장에서 현장형 살모넬라 신속 정밀 진단/검사법 개발 연구

- (1) 국내 가금류 농가 내 주요 살모넬라 혈청형 오염도 조사
- (2) 주요 타겟 혈청형 균주에 대한 pan-genome 분석을 통한 특이 마커 진단
- (3) 살모넬라 주요 혈청형 동정 real-time PCR 신속 검출법 개발
- (4) 시제품 개발 및 현장적용 검증

- 라. 주요 혈청형 살모넬라 분리주 특성 분석

- (1) 병원성 유전자 분포 및 항생제 내성 프로파일링 분석
- (2) OIE 살모넬라 표준 실험실과 Data 상호교류를 통한 분자역학적 특성분석
  - (가) 주요 혈청형 genotyping을 통한 살모넬라 오염원 추적
  - (나) 지역별, 사육형태별, 농장별 분리 균주의 유전적 근연관계 조사

마. 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화

- (1) 도출된 대응방법 및 SOP를 활용한 닭 복지농장의 우선 적용을 통해 살모넬라 억제 효능 가능 여부를 확인함
- (2) 닭 복지농장으로부터 살모넬라 저감화 방제사업 효과를 통한 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 확대 계획 연구 수립
- (3) 현장 및 연구실 내 의견 수렴을 통해 효율적, 위생적, 그리고 안전한 가금류의 생산을 위한 최적의 SOP 수립
- (4) 살모넬라 억제용 제제 선발 및 산업화

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 개요

가. 연구 배경 및 필요성

#### (1) 살모넬라 식중독 발생 현황

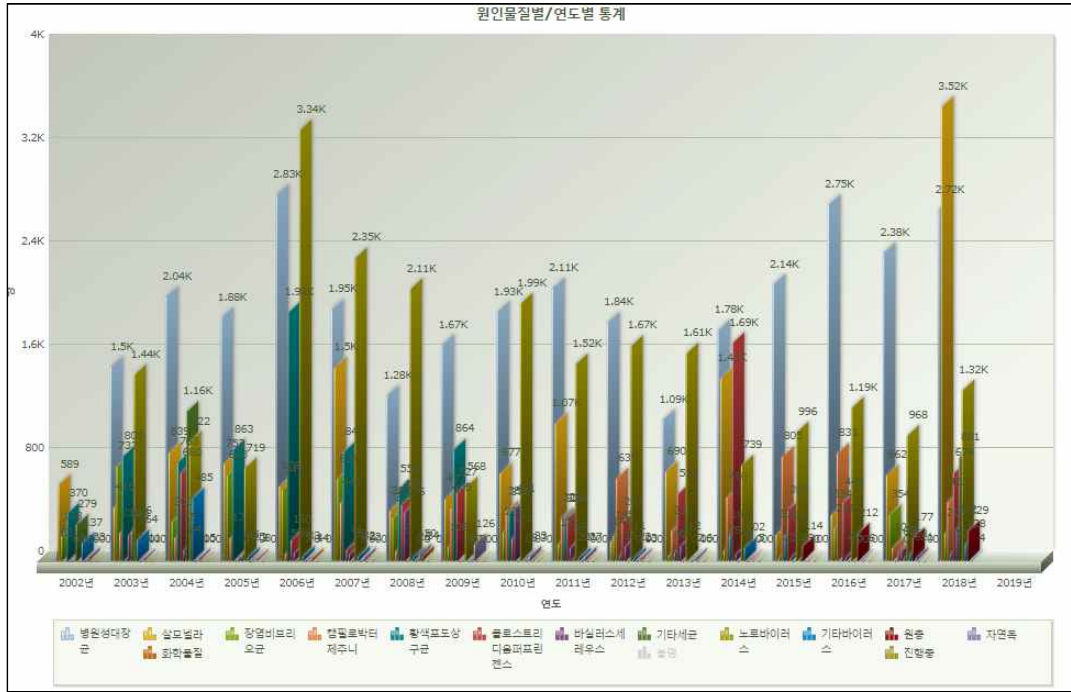
(가) 살모넬라균은 장내세균과의 그람음성 간균으로 2600개 이상의 혈청형이 보고되고 있음. 사람을 포함한 넓은 숙주영역을 가진 인수공통질병 원인체로서 주로 오염된 축산물을 통해 사람에게 감염됨. 주증상은 복통, 설사, 발열, 구토 등이며 심한 경우 패혈증을 보이기도 함. 국내에서는 세균성 식중독 발생 원인 2위이며 미국에서는 1위로 알려져 있음.

(나) 세균성 식중독의 발생이 증가하고 있으며 미국에서도 2009년 이후 2018년까지 매해 190건이 넘는 살모넬라 식중독이 발생되고 있으며 발생환자수는 점차 증가하고 있는 추세임.

(다) 2002년부터 2018년까지의 국내 식중독 발생 현황을 조사해보면 노로바이러스, 병원성대장균에 이어 살모넬라에 의한 식중독이 높은 비율로 발생하고 있음. 특히 2018년에는 초코 케이크 식중독 파동으로 인해 살모넬라에 의한 식중독 환자가 약 3,520명 정도로 굉장히 많은 환자가 발생하였음.



<그림 1. 미국 내 살모넬라 발생 현황, 출처: 미국 CDC, NORS>

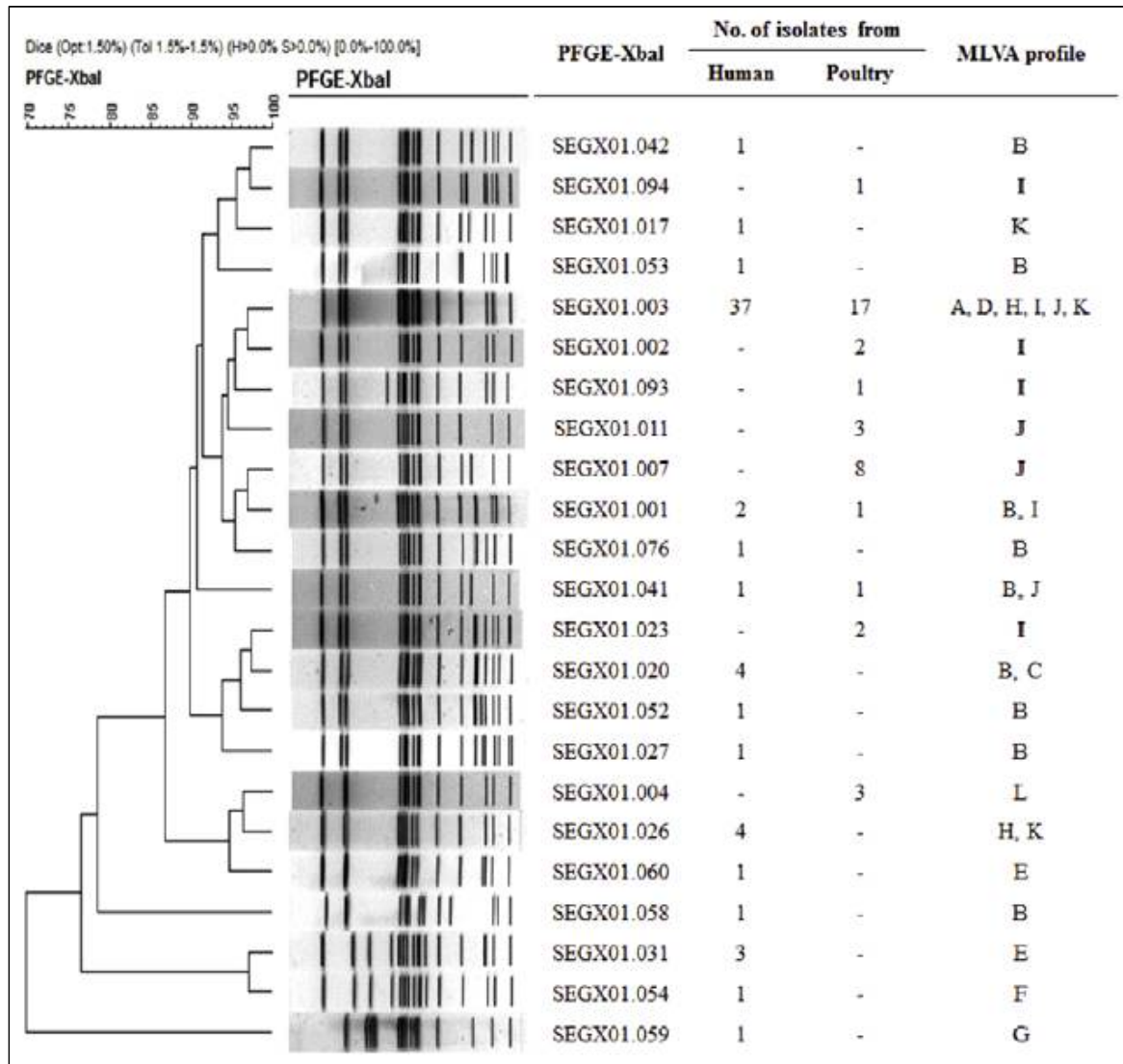


<그림 2. 국내 원인물질별/연도별 식중독 환자수 통계, 출처: 식품안전나라>

(라) 살모넬라감염증의 주원인 식품은 축산물로, 특히 가금유래 식품에 의한 살모넬라 감염 발병율이 가장 높은 것으로 알려져 있음. 미국 CDC 2005년 통계에 따르면, 살모넬라에 의한 식중독에 감염된 사람에서 분리한 살모넬라 중 9종의 살모넬라가 가금유래의 살모넬라와 일치하는 것으로 나타났음. 또한 국내 연구조사 결과 식중독에 감염된 사람에서 분리 빈도가 가장 높은 살모넬라와 육계에서 분리 빈도가 가장 높은 살모넬라가 일치하는 것이 확인되었으며 본 연구팀에서도 MLVA profiling을 통해 사람 및 가금류에서 분류되는 *Salmonella* Enteritidis가 유전적 상동성이 매우 높다는 것을 밝혀냄.

표 1. 국내 식중독 감염된 사람과 육계에서 분리된 살모넬라의 혈청형 종류 및 빈도, 출처: 2007, J Korean Med Sci, 22: 773-8.>

| Serotype                    | Human<br>isolates % (No.) | Broiler-chicken<br>isolates % (No.) | Sum<br>% (No.) |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| <i>S. enteritidis</i>       | 47.2 (17)                 | 21.9 (14)                           | 34.1 (31)      |
| <i>S. typhimurium</i>       | 22.2 (8)                  | 23.4 (15)                           | 25.3 (23)      |
| <i>S. istanbul</i>          | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. montevideo</i>        | 2.8 (1)                   | 9.4 (6)                             | 7.7 (7)        |
| <i>S. london</i>            | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. heidelberg</i>        | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. ohio</i>              | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. kambole</i>           | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. tennessee</i>         | 2.8 (1)                   | 20.3 (13)                           | 15.4 (14)      |
| <i>S. rissen</i>            | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. schwarzengrund</i>    | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. newport</i>           | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. brandenburg</i>       | 2.8 (1)                   |                                     |                |
| <i>S. salamae</i>           |                           | 14.1 (9)                            | 9.9 (9)        |
| <i>S. virginia</i>          |                           | 6.3 (4)                             | 4.4 (4)        |
| <i>S. bovis-morbificans</i> | 4.7 (3)                   | 3.3 (3)                             |                |
| Total                       | 100 (36)                  | 100 (64)                            | 100 (91)       |



<그림 3. 식중독을 일으킨 *Salmonella* Enteritidis와 가금류에서 분류된 *Salmonella* Enteritidis의 유전적 상동성 비교, 출처: Clin Microbiol Infect 2015; 21: e68 - e70>

(2) 국내외 non-typhoidal(인수공통전염 식중독) 살모넬라균 관리대책 현황

(가) 계육 및 계란 등 가금 유래 식품의 잠재적인 식중독 위험성을 감소하기 위하여 미국의 농무성에서는 사람에 식중독을 유발하는 살모넬라를 관리 대상으로 포함하는 NPIP(National Poultry Improvement Plan)을 1938년부터 실시하였음. 또한 유럽연합, 일본, 캐나다 등에서도 HACCP에 의한 축산식품 위생 관리가 제도적으로 마련되어 있는 상황임.

(나) 국내에서도 살모넬라에 대한 축산물 안전성 확보를 위하여 Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) 프로그램을 도입하여 2003년 7월 1일부터 모든 닭 도축장에 의무적용하고 있으며, 닭 사육 농가에 대해서도 신청 농장에 한하여 확대 적용 중임. 그러나 HACCP 인증 후 위생상태의 개선 등의 조치가 미흡한 현실임.

**살모넬라(*Salmonella enteritidis*) 검사 관리기준**

- 매 입추 시 병아리 박스 바닥의 분변과 폐사축, 약추 내부장기 중 간, 난황 등을 채취하여 살모넬라(*Salmonella enteritidis*) 검사를 검사기관에 의뢰
- 계군 및 시설환경, 식용란에 대한 살모넬라(SE) 검사를 연 2회 이상 실시
- ▶ 공인검사기관(식품 및 축산물 위생검사기관), 국가기관, 부설연구소(사료회사, 관련업체, 조합 및 학교) 직인이 날인된 검사성적서만 인정

| 구 분    | 검사주기   | 검사방법 | 시료채취                | 검사 샘플 수                | 비 고<br>(검사기관 등) |
|--------|--------|------|---------------------|------------------------|-----------------|
| 초생추 입추 | 매 입추 시 | 항원검사 | 분변                  | 계사당 5수 이상              |                 |
| 육추관리   | 연 2회   | 항원검사 | 분변                  | 계사당 5수 이상              |                 |
| 사육환경   | 연 2회   | 항원검사 | 자리깃, 급수기, 급이기, 깔짚 등 | 동당 3곳 이상에서 채취(pooling) |                 |
| 집란관리   | 연 2회   | 항원검사 | 식용란                 | 계군 당 5개 이상             |                 |

**■ 살모넬라 검출 시 조치방법**

- 입추 계군에 대한 검사결과 *Salmonella enteritidis*가 검출된 경우에는 부화장에 즉시 검출사실을 통보해야 하며, 수의사와 협의하여 대책을 수립함
- 살모넬라(SE) 검출 시 생산된 알은 감염계사를 별도 집란 후 폐기
- 사육환경 모니터링 검사 결과 계사 내 SE가 검출된 경우 해당 계사에 대한 청소 및 소독을 강화하고 작업자의 계사 내 출입절차 및 설치류, 해충 방제를 강화하며, 수의사와 협의하여 조치함

<그림 4. 현재 산란계 농장에 대한 HACCP 검사 시스템>

(다) 현재 산란계 농장의 살모넬라 검사에 대한 HACCP 시스템은 초생추 입추를 제외하고는 연 2회에 대한 항원검사로 특정 짓고 있으며 검사 샘플 수가 매우 적어 전체를 대표하지 못할 뿐만 아니라 살모넬라 유입 시 발견까지 매우 오랜 시간이 소요될 수 있음.

표 2. HACCP 기준 가금류도축장 사육 도계수 대비 채취 시료수

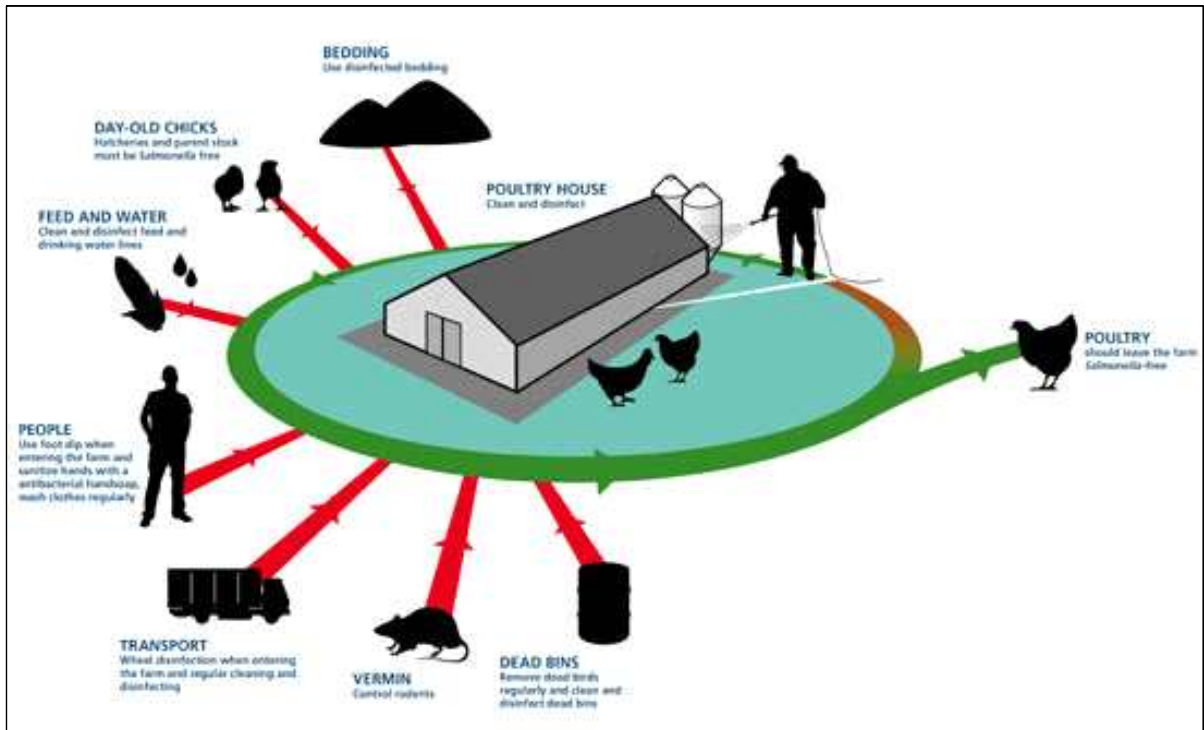
| 구 분 | 채취 시료수<br>(대규모) | 소규모 작업장    |  |
|-----|-----------------|------------|--|
|     |                 | 규모(년간 작업량) | 검사 회수  |
| 닭   | 1 건/22천도계       | 440천수 이하   | o 최소 13회 검사까지 매주 1회검사<br>- 6월에서 8월에 매주 1회 반복검사 |

(라) 또한 가금류도축장에서의 채취 시료수 규모는 22천도계당 1수로, 농장에서의 살모넬라 모니터링과 마찬가지로 검사 샘플 수가 매우 적어 전체를 대표하지 못함.

표 3. HACCP 기준 도축장 축종별 살모넬라 검출 허용기준

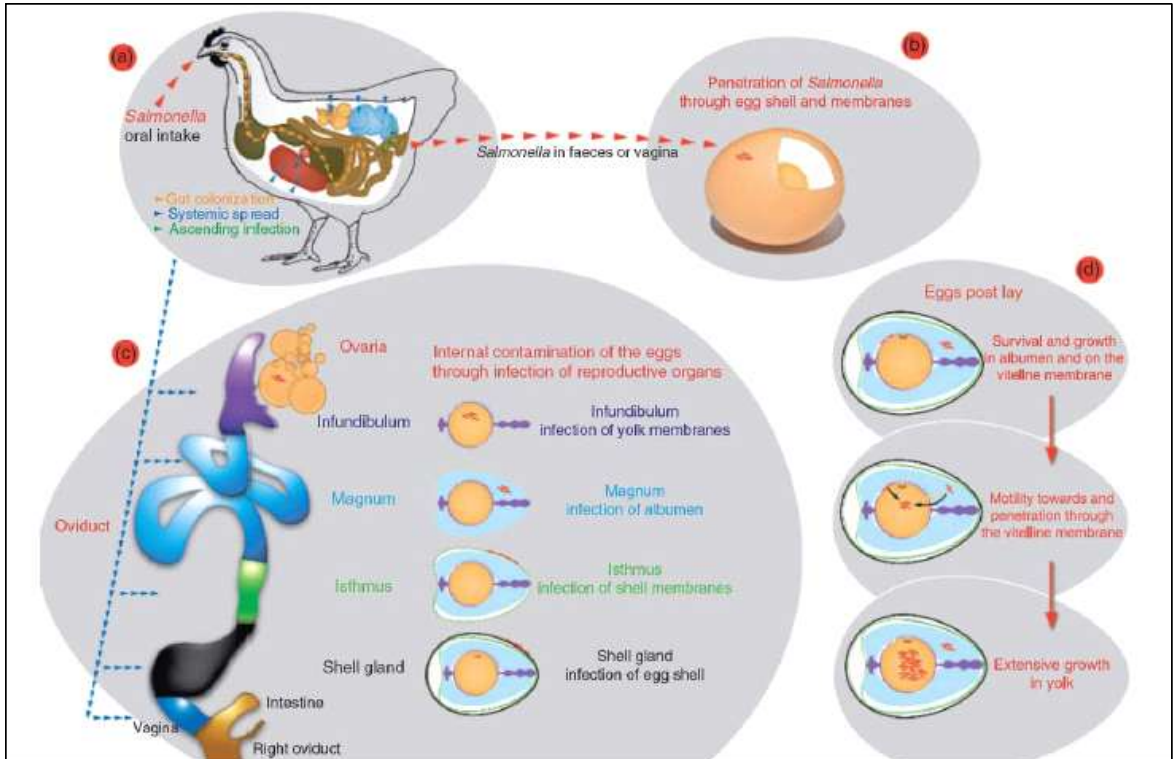
| 도축장   | 살모넬라균 검출 허용기준 |             | 살모넬라균 검출율 (년간) |
|-------|---------------|-------------|----------------|
|       | 검사시료수         | 최대허용 검출 시료수 |                |
| 소     | 26            | 1           | 2.5% 이내        |
| 돼지    | 26            | 2           | 7% 이내          |
| 닭, 오리 | 26            | 5           | 18% 이내         |

- (마) 도축장 축종별 살모넬라 검출 허용기준을 축종별로 비교해보았을 때, 소, 돼지에 비해 닭, 오리의 경우 살모넬라 검출 허용기준이 매우 높아 살모넬라균이 검출된다 하더라도 도축이 진행될 수 있음
- (바) 살모넬라는 주변 환경에 상시 존재하며 다양한 경로를 통해 계육 및 계란 생산 과정에 유입될 수 있으며, 수평 전파 외에도 난계대 전파가 가능함. 닭에 감염 시 불규칙적이고 지속적인 체외 배출을 일으켜 환경 내 잔류가 가능하므로, 체계적인 대응 프로그램을 통해 유입 방제 및 관리에 대한 필요성이 높음.



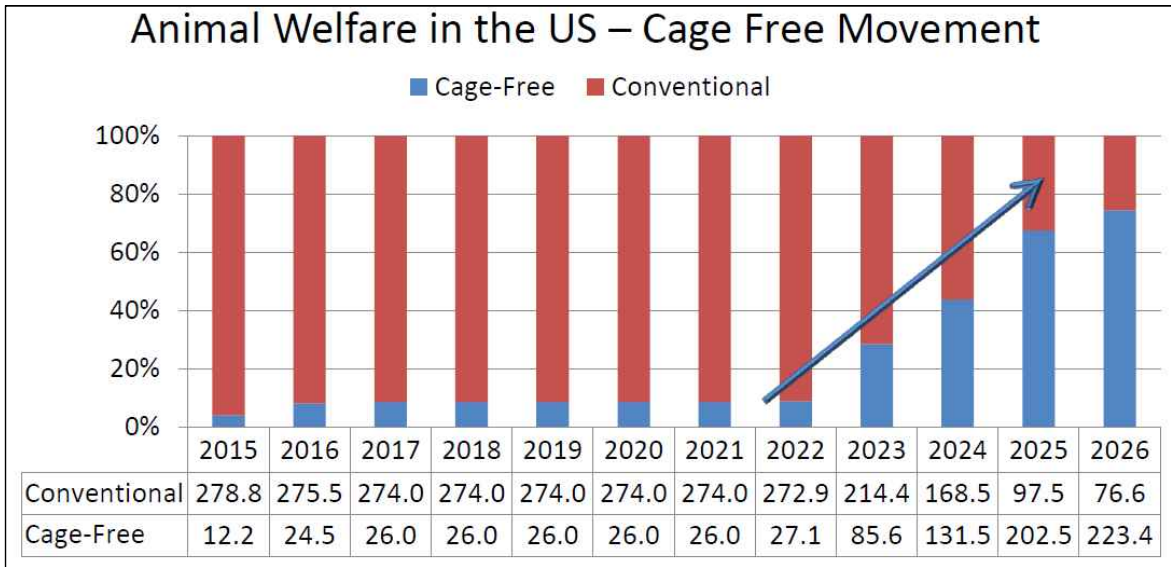
<그림 5. 다양한 경로를 통한 살모넬라의 육계 생산 과정으로의 살모넬라 유입>





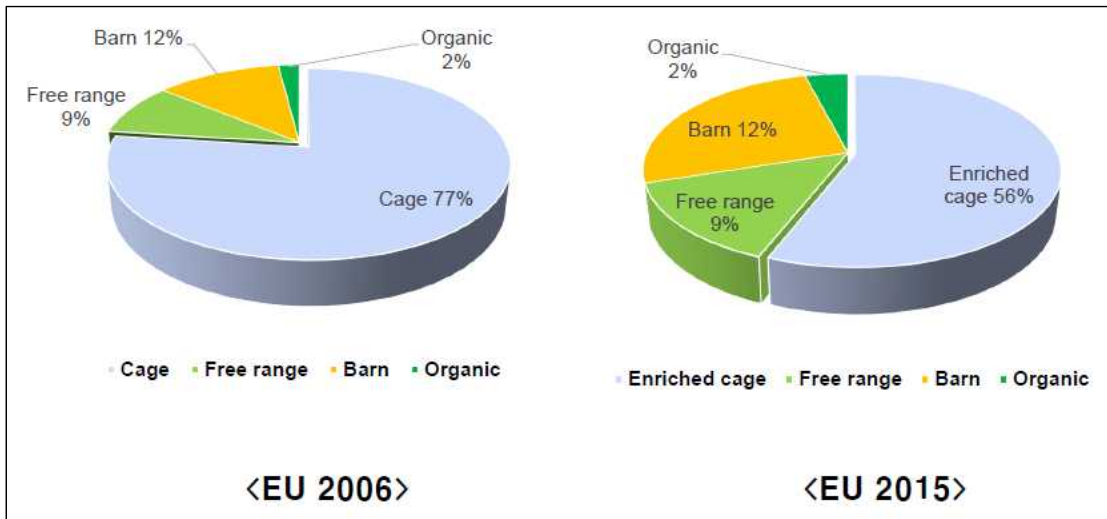
<그림 6. 살모넬라 감염시 계란으로의 살모넬라 난계대 감염 기전>

- (사) 살모넬라 유입 차단을 위하여 철저한 차단 방역과 소독이 필수적이며, 정기적인 모니터링을 통한 농장 내 살모넬라 존재 유무를 파악하는 것이 필요하고, 살모넬라에 대한 체계적인 대응을 통해 환경 잔류 농도와 기간을 낮추는 것이 필수적임.
- (아) 2012년부터 성장촉진용 항생제를 사료에 첨가하는 것이 전면 금지됨에 따라 다양한 세균성 질병의 발생 증가가 예상되고 있음. 일례로 닭 살모넬라 감염증인 가금티푸스의 경우 성장촉진용 항생제 사용전인 2011년에 23건이 발생하였으나, 2012년 50건이 발생이 보고되어 질병의 발생이 약 2배 증가하였음. 따라서 항생제의 사용을 통한 살모넬라의 제어가 아닌 선진국과 같이 유입과 전파를 차단하는 방법을 통한 제어 기술이 필요함.
- (자) 살모넬라의 경우, 아형(subtype)에 따라 한 종류의 아형에 대해 백신을 시행할 경우 다른 아형에 대한 교차방어(cross-protection)가 될 수 있어 효과적인 백신 사용 시 가금류와 사람 식중독 살모넬라에 대한 동시방어가 가능할 수 있음
- (3) 동물 복지 농가 살모넬라 검출 현황
  - (가) 전세계적으로 시민들의 윤리적 소비와 동물복지에 대한 기대치를 통해 동물복지 농가에 대한 관심과 수요가 날이 갈수록 높아지고 있으며 미국에서도 점차 동물복지 농장이 늘어나고 있는 추세임



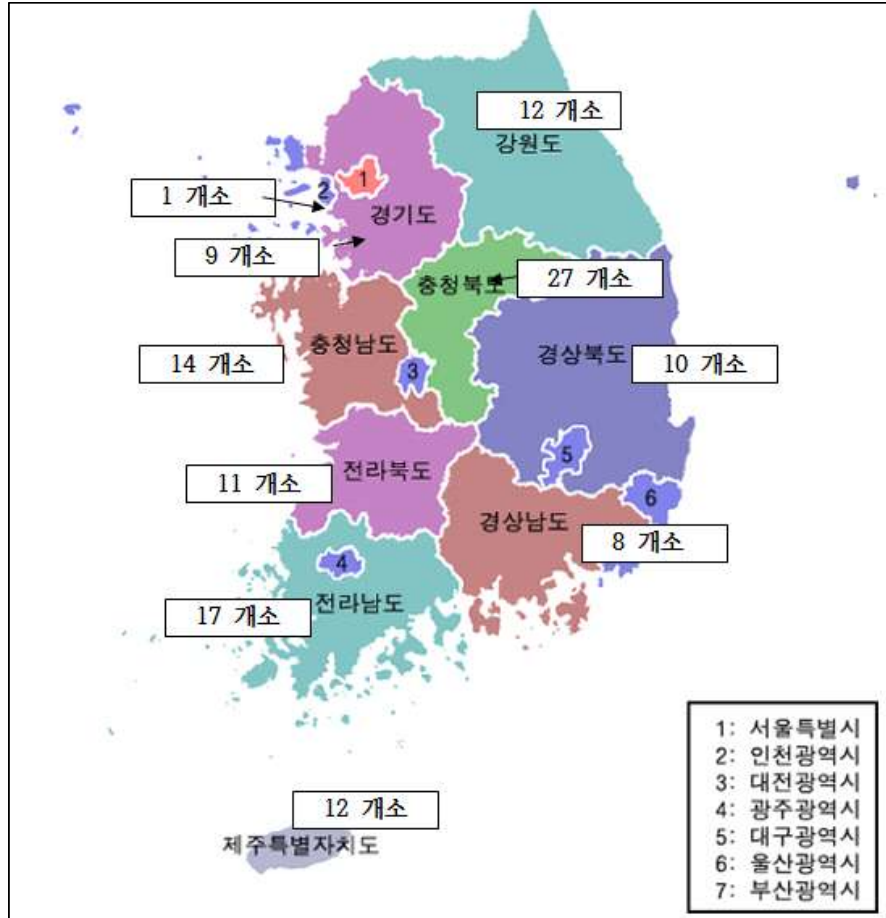
<그림 7. 미국 내 동물복지농가 사육 증가>

(나) 유럽에서도 동물복지 농가가 점차 증가하고 있으며, 그 수요 역시 증가하고 있는 실정임.



<그림 8. 유럽 내 사육방식 변화 및 동물복지농가 사육 증가>

(다) 우리나라 역시 동물복지 농가가 점차 증가하고 있는 추세로, 현재 전국에 총 111개소의 동물복지 인증을 받은 산란계 농장이 운영되고 있음. 2012년 인증제가 시작된 해에 인증받은 농장이 총 32개소로 제일 많으며, 2013년도에는 10개소, 2014년도에는 13개소, 2015년도에는 9개소, 2016년도에는 20개소, 2017년도에는 9개소, 2018년도에는 18개소가 인증을 받아 운영되고 있음.



<그림 9. 국내 산란계 동물복지인증 농장 분포도>

- (라) 실용계의 복지케이지 경우 관행적으로 사용되고 있는 일반케이지에 비해 사양관리가 힘들어 질병이나 계사 내 환경 통제에 더 많은 인력과 시간이 소모되며 아직 시행 초기로 질병 관리에 대한 체계적인 대응 프로그램 제작이 미흡함
- (마) 관행케이지부터 자유방목형 케이지는 각각의 장단점을 지니고 있으며, 이는 닭의 사육방법과 생산성에 큰 영향을 끼치고 있음.

표 4. 사육형태별 장단점

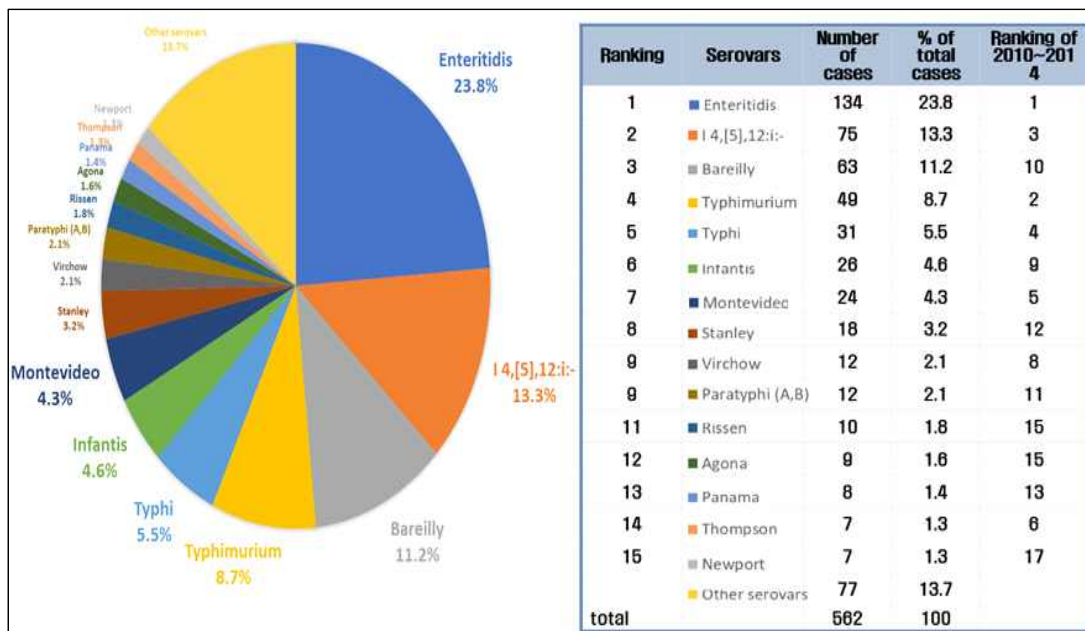
| 사육형태  | 장점   | 단점  |
|-------|--|---|
| 관행케이지 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 질병과 기생충 감염률이 낮음</li> <li>○ 폐사율이 비교적 낮음</li> <li>○ 깃털쫄기 또는 카니발리즘이 낮음</li> <li>○ 발의 지루성 피부염 발생을 낮음</li> <li>○ 약취와 분진의 감소</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수수 당 공간이 매우 제한적임</li> <li>○ 품종특이적 행동을 완전히 제한함</li> <li>○ 출하 시 골다공증으로 인한 골절률이 높음</li> <li>○ 이상 행동을 보이는 닭으로부터 피할 수 없음</li> </ul> |

|                                |   |  |
|--------------------------------|---|--|
| <p>Enriched cage<br/>(확장형)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 질병과 기생충 감염률이 낮음</li> <li>○ 폐사율이 비교적 낮음</li> <li>○ 품종특이적 행동패턴의 표현이 가능</li> <li>○ 골밀도가 좀 더 강함</li> <li>○ 발의 지루성 피부염 발생률이 낮음</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 계군에서 깃털쫄기와 카니발리즘 증가</li> <li>○ 장시간 횃대 이용으로 인한 흉골 손상</li> <li>○ 스크래치 매트와 깔짚 공급으로 인한 먼지발생 증가</li> <li>○ 큰 계군 계사에서 출하 시 골절률이 높음</li> </ul>   |
| <p>Aviary<br/>(평사형)</p>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 품종특이적 행동패턴 표현이 가능</li> <li>○ 골밀도의 증가</li> <li>○ 쪼는 개체로부터 피할 공간 확보</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배설물로 인한 기생충 및 감염성 질병발생률이 높음</li> <li>○ 젖은 깔짚으로 인한 지루성 피부염의 발병률이 높음</li> <li>○ 횃대, 산란상, 놀이시설과의 충돌로 골절률이 높음</li> <li>○ 깃털쫄기와 카니발리즘의 발생률 차이가 큼</li> <li>○ 쪼는 개체로 약한 개체는 사료, 물 접근이 제한적임</li> <li>○ 깔짚으로 인한 먼지발생 증가</li> </ul> |
| <p>Free range<br/>(자유방목)</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 평사형 계사와 동일</li> <li>○ 모이 찾기와 모래목욕이 가능</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 평사형 계사와 동일</li> <li>○ 포식동물로부터의 피해 발생률이 높음</li> <li>○ 내부기생충 감염률의 증가</li> <li>○ 야생조류와의 접촉으로 전염성 질병 발생률이 높음</li> </ul>   |

- (바) 국내의 경우 자유방목의 형태를 갖춘 농장은 총 22개소이며 자유방목장을 갖추고 있지 않은 농장은 89개소임.
- (사) 본 연구팀의 복지 육계농장 및 일반 육계농장 각 5개에 대한 예비 살모넬라 모니터링 결과 살모넬라 양성률은 복지농장에서 조금 높게 나타남 (복지육계 12/100, 일반육계 5/100)
- (아) 식품 안전에 대한 요구가 증가되고 있는 현 시점에서 복지농장의 살모넬라 모니터링과 살모넬라 저감 기술의 적용은 농가 소득 증대의 경제적 가치 외에도 안전한 먹거리 생산 기반 마련의 공중보건학적 가치가 높다고 할 수 있음.
- (자) 또한 소규모 복지농가에 살모넬라 저감 기술이 성공적으로 적용될 경우 대규모 사육이 실시되고 있는 종계, 산란계, 육계 및 오리로의 기술적용 확대가 가능하며, 이를 통해 가금류에 대한 전반적인 살모넬라 저감화 체계적 대응방안이 수립될 수 있을 것으로 기대됨
- (4) 주요 살모넬라 혈청형에 대한 현장형 신속 정밀 진단/검사법 개발의 필요성
- (가) 살모넬라는 혈청형에 따라 사람뿐만 아니라 포유류, 파충류, 그리고 조류까지 넓은 숙주영역을 가지고 있으며, 혈청형에 따라 감염 숙주범위 및 숙주에 대한 병원성이 결정됨. 살모넬라 outbreak에서 혈청형 검사는 역학조사 및 균 특성 분석의 첫 번째 step으로 간주되며, 살모넬라의 혈청형을 신속하고 정확하게 확인하는 방

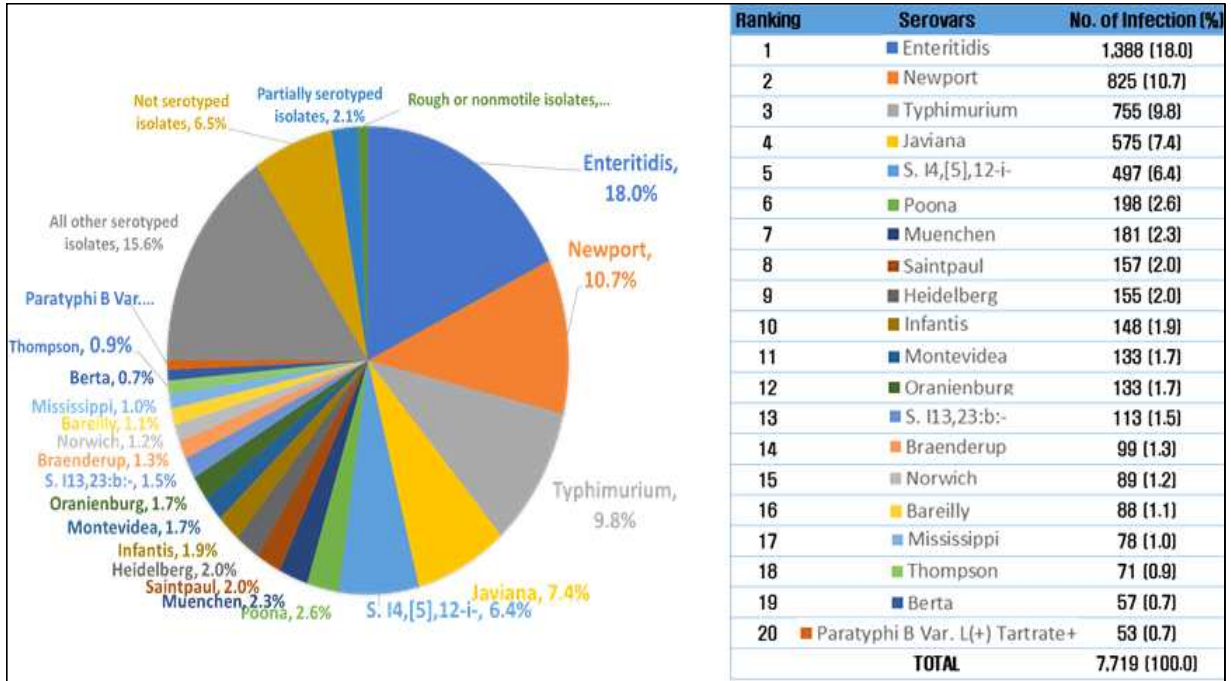
법이 공중보건학적으로 매우 중요함.

- (나) 살모넬라 속균은 *Salmonella enterica* (*S. enterica*)와 *Salmonella bongori* (*S. bongori*) 두 종으로 나뉘며, 이 중 *S. enterica*는 생화학적 특성에 따라 6종류의 아종 (subspecies)으로 분류됨: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) 및 *S. enterica* subsp. *indica* (VI).
- (다) 살모넬라 아종 (subspecies)은 균의 표면에 있는 균체항원 (O-antigen)과 두 종류의 편모항원 (H-antigen)의 면역학적 특성에 따라 serotyping을 통해 subtypes, serovars 등으로 나뉘며, 이에 살모넬라균은 46가지의 균체항원 (O-antigen)과 119가지의 편모항원 (H-antigen) 조합에 의해 약 2600여종의 혈청형으로 구분됨.
- (라) 인체 살모넬라 감염증의 주된 혈청형은 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*으로 나타나고 있으며, 최근 이들 주요 혈청형뿐만 아니라 다른 혈청형에 의한 감염으로 집단 발병이 보고되고 있음.
- (마) 2015년 한국 질병관리본부 국립보건연구원 연구자료에 따르면, 한국에서 살모넬라감염증에 이환된 환자에서 분리된 살모넬라균의 주요 혈청형은 *S. Enteritidis* (23.4%), *Salmonella* I 4,[5],12:i:-(12.7%), *S. Bareilly*(10.7%), *S. Typhimurium*(8.6%), *S. Montevideo*(5.6%)로 이들 다섯 혈청형이 전체 균수의 61%(360/591)를 차지하는 것으로 보고되었음.



<그림 10. 국내 살모넬라 혈청형별 식중독 발생 현황 (질병관리본부, 2015)>

- (바) 국내뿐만 아니라, 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서도 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 의한 식중독이 전체 살모넬라 식중독 중 높은 비율을 차지한다고 보고되어 있음.



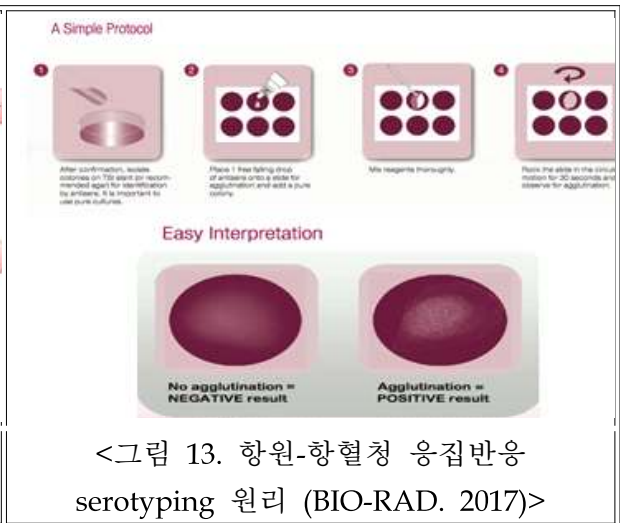
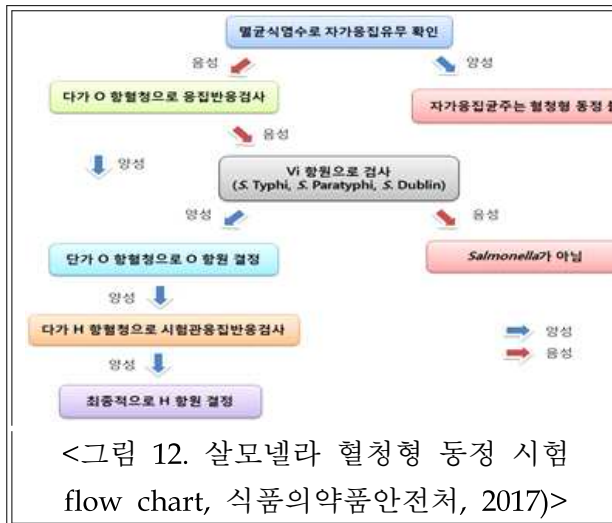
<그림 11. 국외 살모넬라 혈청형별 식중독 발생 현황 (미국 CDC, 2015)>

(사) 동물 살모넬라감염증의 주요 혈청형은 *S. Albany*, *S. Agona*, *S. Virchow*, *S. Typhimurium* 등으로 확인되었으며, 이 중 *S. Agona*, *S. Virchow*은 사람에서 병원성을 유발하며, 특히 *S. Typhimurium*는 국내 살모넬라 식중독 환자에서 많이 발견되는 혈청형임. 사람에서 가장 흔하게 확인되는 혈청형인 *S. Enteritidis*도 또한 가축에서 분리되는 주요 혈청형 안에 포함되는 것으로 확인되었음.

표 5. 도체에서 분리한 살모넬라의 혈청형 분포도(농림축산식품부, 2017)

| Ranking | 전체               | 닭                | 소           | 돼지          |
|---------|------------------|------------------|-------------|-------------|
| 1       | Typhimurium      | Albany           | Typhimurium | Typhimurium |
| 2       | Albany           | Enteritidis      | Agona       | Rissen      |
| 3       | Enteritidis      | Virchow          | -           | Panama      |
| 4       | Virchow          | Bareilly         | -           | Montevideo  |
| 5       | Rissen           | Hadar            | -           | Agona       |
| 6       | Montevideo       | Montevideo       | -           | Munenchen   |
| 7       | Bareilly         | Rissen           | -           | Mbandaka    |
| 8       | Infantis         | Gallinarum       | -           | Derby       |
| 9       | Westhampton      | Infantis         | -           | Infantis    |
| 10      | Agona            | Mbandaka         | -           | Oranienbarg |
| 11      | Gallinarum       | Oranienbarg      | -           | -           |
| 12      | Hadar            | Panama           | -           | -           |
| 13      | Panama           | Westhampton      | -           | -           |
| 14      | Oranienbarg      | Munenchen        | -           | -           |
| 15      | Newport          | Typhimurium      | -           | -           |
| 16      | Munenchen        | Zerifin          | -           | -           |
| 17      | Mbandaka         | Bovismorbificans | -           | -           |
| 18      | Bovismorbificans | Newport          | -           | -           |
| 19      | Derby            | -                | -           | -           |
| 20      | Indiana          | -                | -           | -           |
|         | Unidentified     |                  |             |             |

- (아) 현재 살모넬라에 대해 국제적으로 사용되는 gold standard 혈청형 검사법은 Kauffmann-White anti-sera serotyping 검사법으로, O (somatic)항원 및 H (flagella) 항원에 대한 항혈청 응집반응 여부를 확인하는 검사법임. 1단계 O polyvalent antisera를 사용하여 O항원 그룹을 결정한 후, 각 O형 antisera를 사용하여 O 항원을 최종 결정함. 2단계로 시험관 응집반응을 통해 H항원을 결정함. 이 방법은 전 세계적으로 gold standard 살모넬라 serotyping법으로 활용되고 있음.
- (자) 기존의 Kauffmann-White 항혈청 응집반응 분석법은 혈청형 결정까지 6-8일 이상 소요되며, 숙련된 기술자 및 high quality의 항혈청을 필요로 하여 노동집약적이고 시간 및 비용의 소모가 많다는 단점이 있음. 또한 일부 분리주의 경우 혈청형 항원을 발현하지 않아 이 방법의 사용이 제한되며, cross-reactivity에 대한 주관적인 해석으로 인해 이를 대체할 방법들이 고안되고 있음.
- (차) 현재 클로스트리디움균을 제어하기 위해 깔짚 등에 다양한 유기산이 사용되고 있으나 살모넬라균의 제어를 목적으로 평가된 결과는 부족하여 향후 이에 대한 연구가 필요함



## 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

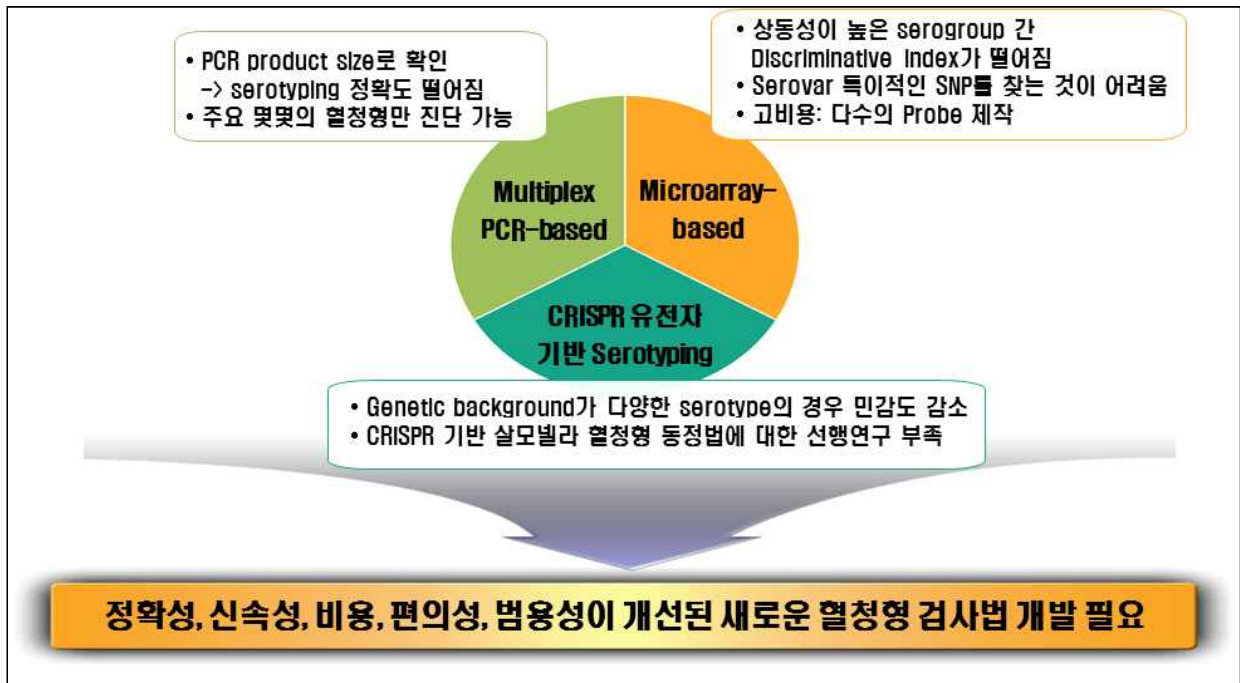
### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### (1) 기술현황

- (가) 국내 종계장, 부화장, 육계 등 생산단계별 체계적인 모니터링 프로그램이 부재하여 살모넬라 감염 종계군 관리 및 실용계로의 살모넬라 전파 차단 등 효과적인 살모넬라 관리가 이루어지지 않고 있음
- (나) 삼화원중에서 2003년부터 세계적인 영국 육종회사인 Aviagen Ltd의 살모넬라 모니터링 기법을 벤치마킹하여 자체 계군에 대한 살모넬라 모니터링 적용 중임
- (다) 국내에서 개발되고 있는 alternative serotyping 법은 multiplex PCR기반 serotyping에 국한되어 있어, PCR product size로만 확인될 수 있어 serotyping의 정확도가 떨어진다는 한계점이 있음
- (라) 최근 target DNA-specific probe와 sample DNA간의 hybridization 반응을 이용하는 microarray 기법도 살모넬라의 O 항원과 H 항원의 serotype-specific variable region DNA를 기반으로 제작한 probe를 microarray 기법에 적용하여 여러 살모넬라 혈청형을 동시에 분석하는 방법이 제시되고 있으나 serogroup A & D1과 같이 상동성이 높은 serogroup의 경우, DI (discriminative index)가 떨어져 추가적인 항혈청 test를 진행해야 하고, 다수의 probe 제작에 소요되는 비용이 많다는 한계점이 있음. 또한, serovar 특이적인 SNP (single polymorphism sequence)를 찾는 것이 어렵다는 한계도 있음.
- (마) 혈청형 특이적인 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 유전자 서열이 최근에 발표되면서 현재까지 총 28개 살모넬라 혈청형을 대상으로 혈청형 특이적인 CRISPR 유전자를 확인하였음. CRISPR 유전자에 기반한 molecular serotyping 방법은 재현성이 높으며, 주요 혈청형인 Enteritidis와 Typhimurium을 포함한 여러 혈청형에서 높은 정확도를 보임. 또한, 시간이나 비용면에서 경제적이며, 쉽게 할 수 있다는 장점이 있으나 유전적 배경이 다양한 일부 혈청형들의 경우, CRISPR 타겟 유전자를 이용한 serotyping 방법이 낮은 민감도를 보여 모든 혈청형에 적용하기에는 어려움이 있으며, CRISPR 기반 살모넬라



혈청형 동정법에 대한 선행 연구가 부족하여 추가적인 연구가 요구된다는 한계점이 있음.

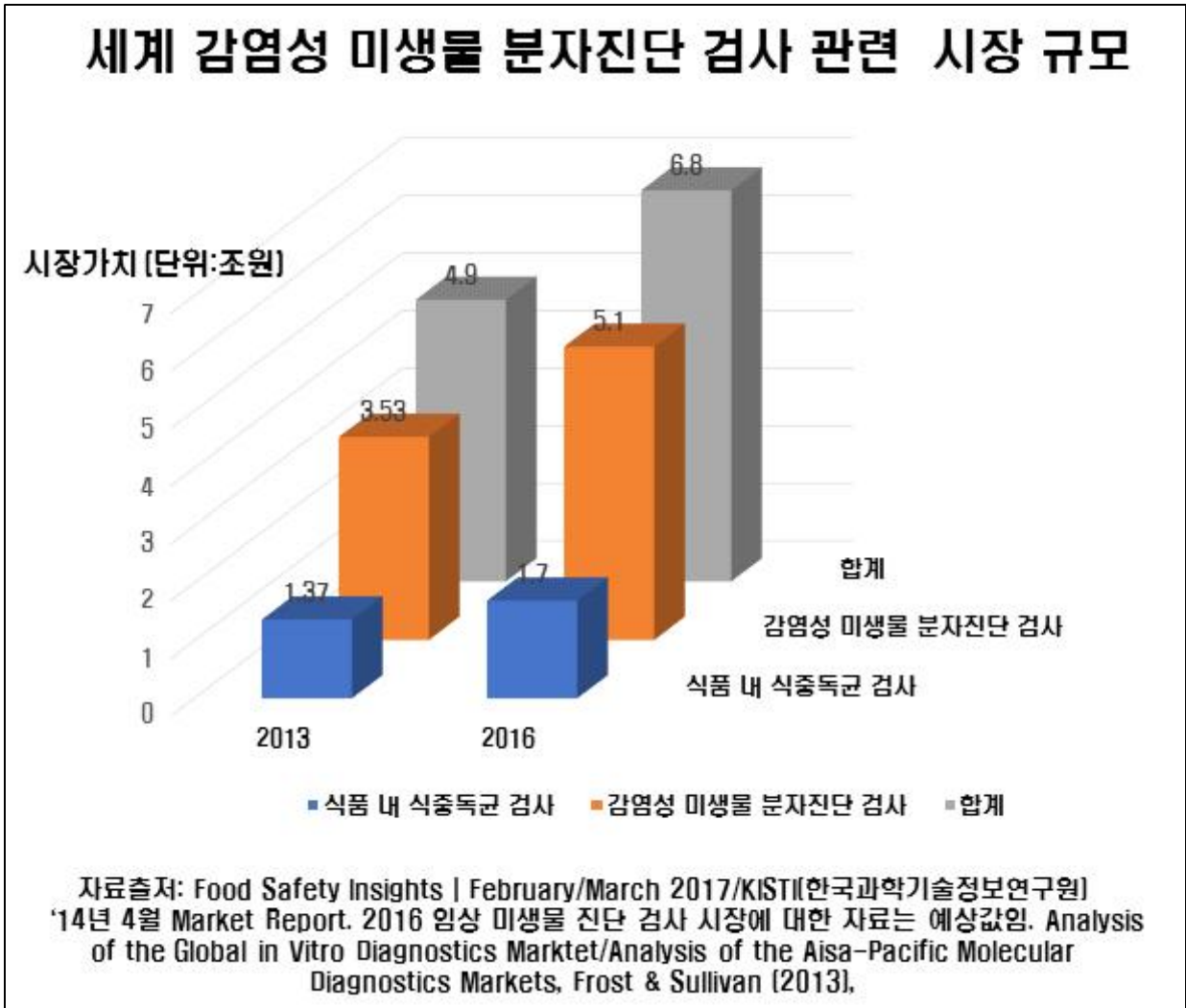


<그림 14. 새로운 혈청형 검사법 개발의 필요성 요약>

(2) 시장현황

- (가) 통계청 가축동향 조사 결과, 2018년 4/4 분기 기준 국내에 사육 중인 종계는 약 1,200만 마리, 산란계는 7,400만 마리, 육계는 약 8,500만 마리로, 3000수 이상 농가 기준, 산란계 농가는 약 1,000농가, 육계 농가는 약 1,500 농가가 있으며, 계란 생산량은 약 4,500만개 정도임.
- (나) 육계 및 계란을 생산하는 산란계에 대하여 살모넬라 오염 방지에 대한 체계적인 대응방법과 주요 혈청형에 대한 신속 정밀 진단/검사법이 개발될 경우 매우 적용범위가 넓음.
- (다) 아래 그림에서와 같이, 2016년 전 세계 감염성 미생물 분자진단 검사와 관련된 시장 규모는 약 5.1조원 (PCR기반 검사-30% 이상)규모로 예상됨. 인간이나 동물에 있어서 지속적인 세균성 감염 질병의 증가로 인한 피해에 따라 최근에는 신속 정확한 검사법의 수요가 급격히 늘어나고 있는 실정임.
- (라) 국내의 감염 미생물에 대한 분자진단 검사는 주로 PCR을 기반으로 하는 다중진단 (multiplex), 동시진단(real-time PCR) 및 동시 다중 실시간 진단(multiplex real-time PCR) 기술 등의 독점적 지위를 통해 bioMerieux, Siemens Healthcare와 Thermofisher와 같은 3개의 초대형 다국적 기업들에 의해 이루어져 오고 있음.
- (마) 국내 시장 PCR 기반 분자진단과 관련된 정확한 정보자료는 불충분하나, 몇 몇 통계분석 자료에 의하면 2017년 동안 분자진단을 통한 국내 병원성 감염체 검사 시장만으로도 최소 600억원 이상의 시장이 형성되었을 것이라고 추정함 (한국과학기술정보연구원, 2014). 따라서, 주요 병원성 미생물인 살모넬라균의 진단 및 검사와

관련된 시장도 수백억 원에 이를 것이라고 추정함.



<그림 15. 세계 감염성 미생물 분자진단 검사 관련 시장 규모>

(3) 경쟁기관현황

(가) 종계농장, 부화장, 육계농장 등에 대한 살모넬라 모니터링 및 저감기법 연구개발은 진행되었지만 현재까지 체계적인 대응 프로그램이 개발되지 않았음.

(4) 지식재산권현황

(가) 닭에 대한 *S. Gallinarum*(SG) 및 *S. Enteritidis*(SE)에 대한 다양한 생독백신 및 사독백신이 특허 등록되어있음.

(나) 해외에서는 본 살모넬라 백신들이 사용되고 있으며, 살모넬라균이 발견되었을 때 도태 작업이 진행되고 있음. 하지만 국내에서는 살모넬라 감염에 대해 혈청 항체 검사법을 사용하고 있으며 종계의 경우 산란을 시작하기 전 1달 전 3% 이상의 계군에서 항체 양성이 확인될 경우 도태를 시키도록 규정되어 있음.

(5) 표준화현황

(가) 위해 방지를 위한 사전 예방적 식품안전관리체계로서 식품을 만드는 과정에서 생물학적, 화학적, 물리적 위해요인들이 발생할 수 있는 상황을 과학적으로 분석하고 사

전에 위해요인의 발생여건들을 차단하여 소비자에게 안전하고 깨끗한 제품을 공급하기 위한 시스템적인 규정을 적용한 HACCP 인증 시스템이 존재함.

- (나) 하지만 HACCP 시스템이 있음에도 불구하고 2018년 9월 초코 케이크 살모넬라 식중독 사건이 발생하면서, 사전 예고 평가제를 전면 불시평가제로 바꾸며 '즉시 인증 취소'가 가능토록 하여 상시적으로 HACCP 기준을 준수토록 유도할 계획임.
- (다) 국내의 경우 가금티푸스와 추백리의 원인체인 SG와 *S. Pullorum*(SP)에 대한 혈청학적 모니터링 외에는 식중독 유발 살모넬라균에 대한 모니터링 체제는 구축되어있지 않은 상황임.

#### (6) 기타현황

- (가) *S. Gallinarum* 및 *S. Enteritidis*는 같은 혈청형인 serogroup D에 속하며, 항체 검사 시 특정 균에 대한 감염 여부 구분이 쉽지 않음.
- (나) 현재 SE와는 달리 국내 SG에 대한 백신 접종은 거의 100% 이루어져 오고 있음.
- (다) SG백신(SG9R)은 SE와 같은 상동성이 높은 균주에 대해 교차 방어(cross-protection) 능이 있을 것이라고 예상되었으나, 실험실 내 또는 현장 환경에서의 SE에 대한 방어능은 없는 것으로 보임.
- (라) 현재까지는 R-type인 약독균주가 병원성의 S-type로 회복한 사례는 없음.
- (마) 따라서 국내에서는 살모넬라 엔테리타이디스에 대한 백신을 시행하고 있지 않고 있으므로 효과적인 살모넬라 저감화를 위해서는 주요 감염 혈청형에 대한 백신의 적용이 가능해져야 하며, 이에 따라 항체 검사에서 항원 검사로의 규정 변경이 필요한 상황임.

### 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

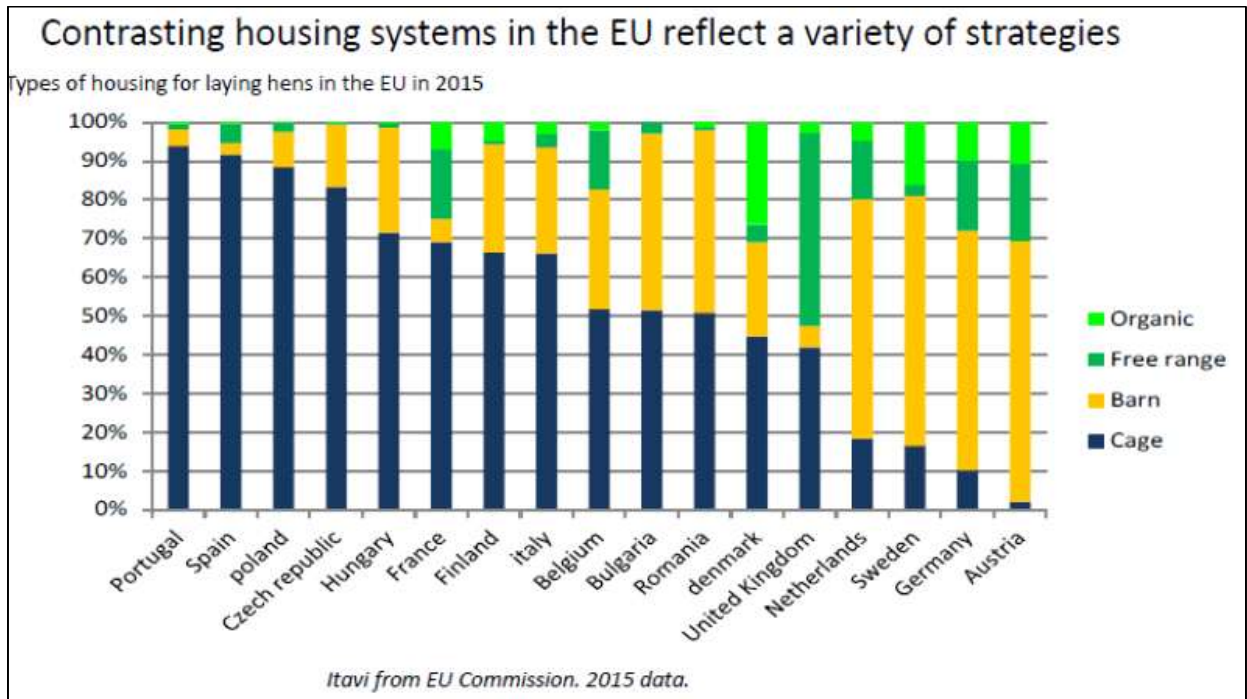
#### (1) 기술현황

- (가) 유럽 및 미국 등에서는 종계장 및 부화장 국가 살모넬라 방제프로그램이 가동중이며 이에 따른 실효성이 폭 넓게 인식되어 있음.
- (나) 유럽연합(EU) 소속국 중 영국의 경우, 살모넬라 중 가금티푸스와 추백리의 원인체가 되는 SG와 SP에 대해서는 계군 감염확인 즉시 도태시키고 있으며, 식중독의 원인체가 되는 SE와 ST에 대해서는 농가의 자발적인 모니터링과 정부에서 직접적인 모니터링을 진행하여 높은 기준치로 살모넬라 방제를 진행함.
- (다) 미국에서는 양계 농가에서 자발적으로 가입하여 그 규정에 따라 농장을 운영하도록 유도하는 미국 가금위생발전계획(NPIP, National Poultry Improvement Plan)을 시행하여, 음성이 확인된 농가에 대해 Clean 마크를 부여하는 방법으로 살모넬라 방제를 진행함.
- (라) 유럽 및 미국에서는 환경 모니터링을 통한 가금 산물에서의 살모넬라 오염 현황을 조사하여, 매년 발표하고 있으며, 사람 식중독 유발 균과의 연관성을 비교 조사하고 있음.

#### (2) 시장현황

- (가) 동물 복지 케이지 비율이 높은 EU에서는 주변 경쟁국에 비해 계란 생산 비용에서 더 높은 가격이 소요되지만 더 비싼 가격으로 거래되고 있음.

(나) 동물복지 계속 및 식용란에 대해 시장수요가 상당히 높으며 이에 따라 살모넬라에 대한 체계적 대응 프로그램이 도입될 경우 굉장히 큰 경제적 가치를 지닐 수 있음.



<그림 16. 유럽 각국의 복지 케이지 비율 >

(3) 경쟁기관현황

(가) 현재까지 체계적인 대응 프로그램이 개발되지 않았음.

(4) 지식재산권현황

(가) 국내와 마찬가지로 닭에 대한 SG 및 SE에 대한 다양한 생독백신 및 사독백신이 특허 등록되어있음.

(나) 살모넬라 백신 사용 및 균 발견 시 도태 작업이 진행되고 있음.

(5) 표준화현황

(가) 미국의 경우 양계 농가에서 자발적으로 가입하여 그 규정에 따라 농장을 운영하도록 유도하는 미국가금위생발전계획(NPIP, National Poultry Improvement Plan)을 시행하여 대표적인 가금의 난계대질병(살모넬라 감염증 및 마이코플라즈마 감염증 등)을 컨트롤하기 위한 프로그램을 시행 중임.

(나) 추백리 및 가금 티푸스의 원인체인 SP 및 SG 외에도 대표적인 식중독 원인체인 SE에 대한 종계균의 관리를 중점적으로 시행하며 음성이 확인된 농가에서 SE Clean 마크를 부여.



<그림 17. SE 부재 종계 농장에 부여되는 SE Clean 마크>

(다) 육용 종계군의 경우 입추 4개월 이후 매월 Boot swab 시료를 채취하여 공인된 실험실로 보낸 뒤 SE에 대한 세균 분리를 실시하도록 되어 있으며 SE 양성으로 판단되는 경우에는 즉시 SE Clean 자격을 상실하게 됨.

(6) 기타현황

(가) 1990년대에 살모넬라에 오염된 계육으로 인한 식중독 발병 사례가 많이 보고되었던 덴마크는 1996년 12월에 국가적인 살모넬라 대응 프로그램(National *Salmonella* Control Program)을 실시함.

(나) 다른 국가의 살모넬라 대응 프로그램과 달리, 덴마크의 경우 발견되는 살모넬라의 혈청형에 관계 없이 살모넬라 양성이 확인 되면 육계의 출하 가격 감소 등의 실질적인 규제가 시행됨.

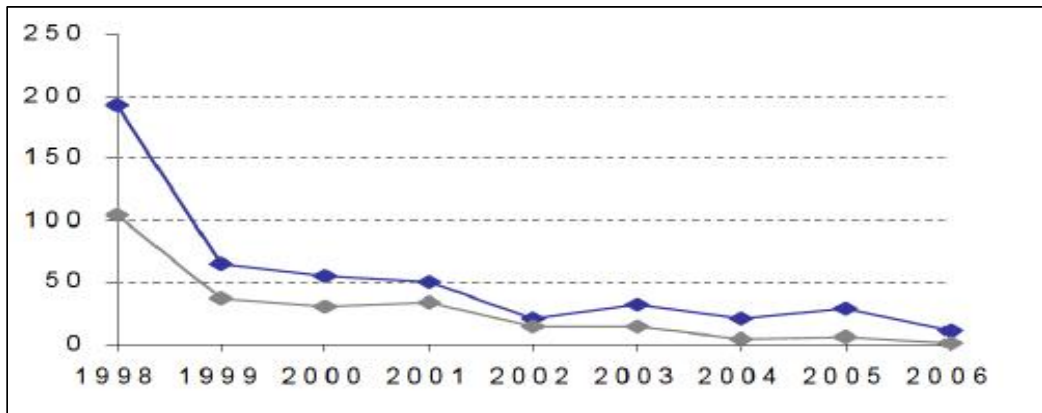
표 6. 덴마크의 육계 및 계란제품에서의 *Salmonella* surveillance, 2000

| Stage of production                                       | Age or frequency      | Samples taken  | Method                   |
|---|-----------------------|--|--------------------------|
|   | Day-old chickens      | 10 samples of crate material, 20 dead or destroyed chickens <sup>a</sup>             | Bacteriologic            |
|   | 1 wk                  | 40 dead chickens   | Bacteriologic            |
|   | 2 wks                 | 2 pairs of sock samples  | Bacteriologic            |
|   | 4 wks                 | 60 fecal samples <sup>a</sup>  | Bacteriologic            |
|   | 8 wks                 | 2 pairs of sock samples  | Bacteriologic            |
| Central rearing stations, broiler and egg sector          | 2 weeks before moving | 60 fecal samples and 60 blood samples <sup>ab</sup>                                  | Bacteriologic, serologic |
| Breeders (hatching egg production)-broiler and egg sector | Every 2 wks           | 50 dead chickens or meconium from 250 chickens taken from the hatchery <sup>ac</sup> | Bacteriologic            |
|   | Every wk              | 2 pairs of sock samples <sup>d</sup>   | Bacteriologic            |
| Hatchery  | After each hatching   | Wet dust   | Bacteriologic            |

(다) Top-down eradication 원칙을 적용, 실용계군보다 종계군의 살모넬라 박멸을 우선으로 하며, 종계군에서는 육성기 동안 수시로 환경 시료를 채취하고, 산란을 시작한 이후로도 매주 시료를 채취해 살모넬라균 오염 여부를 판단함.

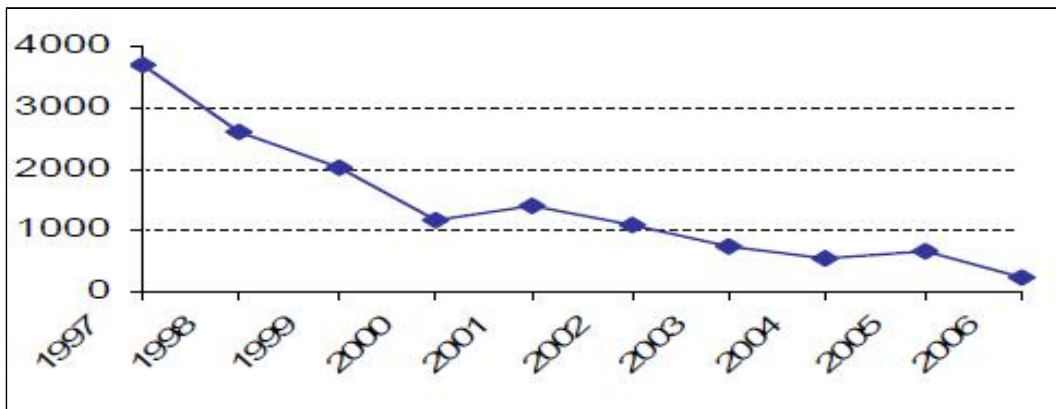
(라) 이와 같은 엄격한 살모넬라 컨트롤 프로그램의 도입한 결과, 80년대 후반에 65% 이

상이던 육계군의 살모넬라 양성률이 2000년 초반엔 5% 미만으로 감소하는 결과를 보임



<그림 18. 덴마크의 살모넬라 양성 농가 수 (출처 : The Danish Poultry Council)>

(마) 살모넬라 양성 육계군이 감소하면서 살모넬라 식중독 발병 사례도 비슷한 경향으로 감소한 것을 미루어 볼 때 살모넬라에 대한 체계적인 대응 프로그램의 도입으로 살모넬라 식중독에 대한 공중보건학적 위해 요소를 감소시킨 사례라고 판단됨.



<그림 19. 덴마크의 살모넬라성 식중독 발병 보고 건수 (출처 : The Danish Poultry Council)>

### 제 3 절 연구개발 범위

#### 1. 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립

가. 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사

(1) 효과적인 대응방법 선별 및 국내와의 유사도 및 적용 가능성 분석

(가) 국내 가금류 농장 내 살모넬라 발생 현황 조사

(2) 국내 복지농장 환경에서의 살모넬라 양성률 검사를 통해 전반적인 살모넬라 양성률을 심층파악함.

: 국내 및 외국의 살모넬라 분리 배양법으로 적용되고 있는 증균배양 → 선택증균배양 → 분리배양 → 생화학적검사 → 혈청학적 확인시험 순서로 실험을 진행할 예정

입.

- (가) 육계 복지농장의 경우 전국적으로 5개 이상의 농장에 대해 샘플링을 진행하며, 팬 5개, 횃대 2개, 벽 6개, 문틈, 음수기 3개, 모이통 3개를 기본으로 20개를 샘플링하며 농장 형태에 따라 횃대가 없는 경우 온풍기, 경계철, 음수기, 모이통에 대하여 추가적으로 샘플링을 진행함.
- (나) 산란계 복지농장의 경우 전국적으로 5개 이상의 농장에 대해 샘플링을 진행하며, 각 농장마다 10개씩 샘플링을 진행함. 샘플링 장소는 알을 낳는 난상 2개, 횃대 2개, 사료통 2개, 음수대 2개, 슬릿 2개를 기본으로 진행함.
- (다) 일반 농장에 살모넬라 샘플링을 진행하게 될 경우, 육계농장은 횃대가 없는 육계 복지농장에 준하여 진행하며, 산란계 농장은 케이지 형태이므로 계란벨트, 계분벨트, 팬, 바닥, 사료통에 대하여 2개씩 샘플링을 진행할 예정임.
- (라) 가금에서 질병을 일으키는 SG, SP 및 인체에 식중독을 일으키는 SE에 대하여 혈청형을 상세 분석함.
- (마) 분리된 살모넬라에 대해 항생제 내성 여부를 조사 분석함.
- (바) 계군의 살모넬라 감염여부 확인을 위한 혈청검사 실시.
  - 국내에서는 현재 살모넬라에 대한 백신을 시행하고 있지 않으므로, 혈청검사에서의 양성 반응이 확인될 경우 살모넬라 감염을 확인할 수 있음.
  - OIE에서 명시한 살모넬라 혈청검사법으로는 rapid whole blood test, rapid serum agglutination test, microagglutination test, standard tube agglutination test, ELISA 등이 있음.
  - 살모넬라에 이미 감염되어 살모넬라를 분비하고 있는 개체라고 하더라도 혈청반전이 이루어지지 않아 혈청검사에서의 살모넬라 음성으로 확인이 될 수 있음. 따라서 살모넬라 항원을 검출하기 위한 모니터링을 병행하여 확실하게 감염계군을 선별할 예정임.

## 2. 살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화

### 가. 살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화

- (1) 살모넬라 저감화 방법 선발 (유산균, 백신 및 박테리오파지의 개별 또는 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인)
  - (가) 농장 내 살모넬라 저감화를 위하여 농장에서 분리된 살모넬라에 대하여 *in vitro* 실험실적 검사를 통하여 유산균 및 박테리오파지의 살모넬라 억제능을 확인함.
  - (나) 대표적인 살모넬라 분리종에 대하여 *in vivo* 실험실적 검사를 통하여 유산균 생균제, 사균제 배양액, 살모넬라 백신 및 박테리오파지의 살모넬라 억제능을 단독 또는 병합 요법으로 확인함.
- (2) 차단방역 시설 및 소독의 농가 환경 내 저감화 효과 확인 (계사 내 시설, 바닥, 음용수 및 환기시설 등)
  - (가) 농장 내 살모넬라 관리뿐만 아니라 농장 외부에서 농장 내로의 살모넬라 유입을 막기 위한 차단방역 시설의 세균에 대한 소독제 효능 검사 실시.
- (3) 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP를 도출

(가) 살모넬라 부재 사육 계열화 회사 모니터링 및 대응방법 조사.

(나) 살모넬라 모니터링 샘플 및 모니터링 횟수에 따른 살모넬라 조사율 및 오염원 파악 가능 여부 분석.

### 3. 국내 농장에서 현장형 살모넬라 신속 정밀 진단/검사법 개발 연구

가. 국내 가금류 농가 내 주요 살모넬라 혈청형 오염도 조사

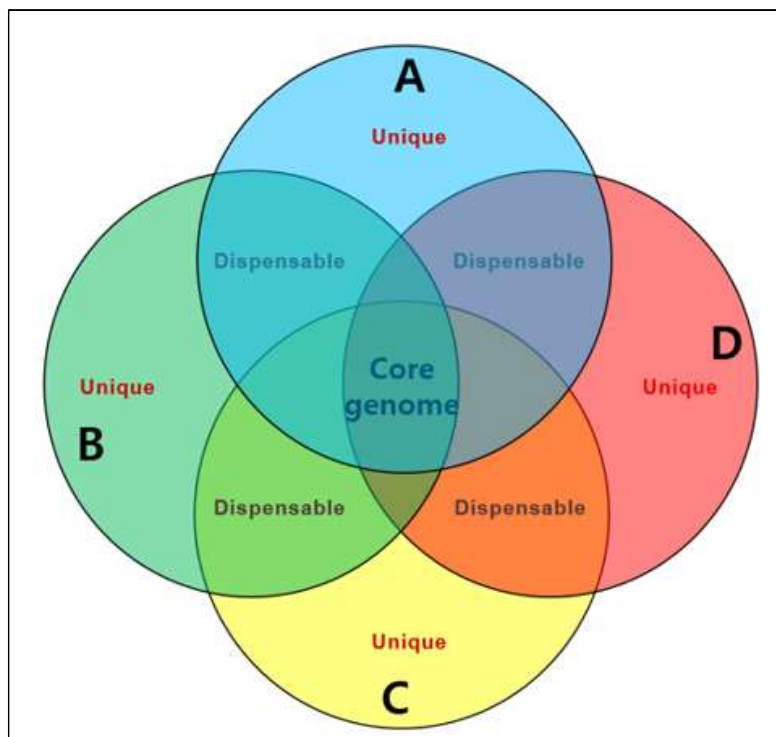
(1) 국내 가금류 농가에서 분리되는 주요 발생 살모넬라 혈청형을 분석하기 위하여 지역 별/ 사육형태 별/ 농가 별 가금 복지농가와 일반농가에서 환경샘플을 채취하여 균 동정 및 혈청형 분석을 진행.

나. 주요 타겟 혈청형 균주에 대한 pan-genome 분석을 통한 특이 마커 진단

(1) Pan-genome 분석

(가) Next-generation sequencing (NGS) 기술의 발달과 더불어 시퀀싱 비용 감소로 인해 discriminative power가 높은 whole genome sequencing (WGS)를 기반으로 하는 pan-genome 분석기술은 미생물의 일부 항원 부분 특징만을 반영하는 기존 gold-standard 분석법과 비교하여, 다양한 유전자에 대한 분석을 동시에 실시할 수 있다는 장점을 가지고 있으며, Salmonella 및 다른 장 병원균에 대한 역학 연구와 발생 모니터링 연구에서 그 파급효과가 충분히 입증되었음.

(나) Pan-genome은 species 내 모든 균주에 의해 공유되는 유전자 집합인 핵심 유전체 (core genome)과 일부 균주에 의해 공유되는 유전체(dispensable genome) 및 특정 species에서만 확인되는 유전체(unique genome)들의 집합인 부속 유전체 (accessory genome)으로 구성됨.



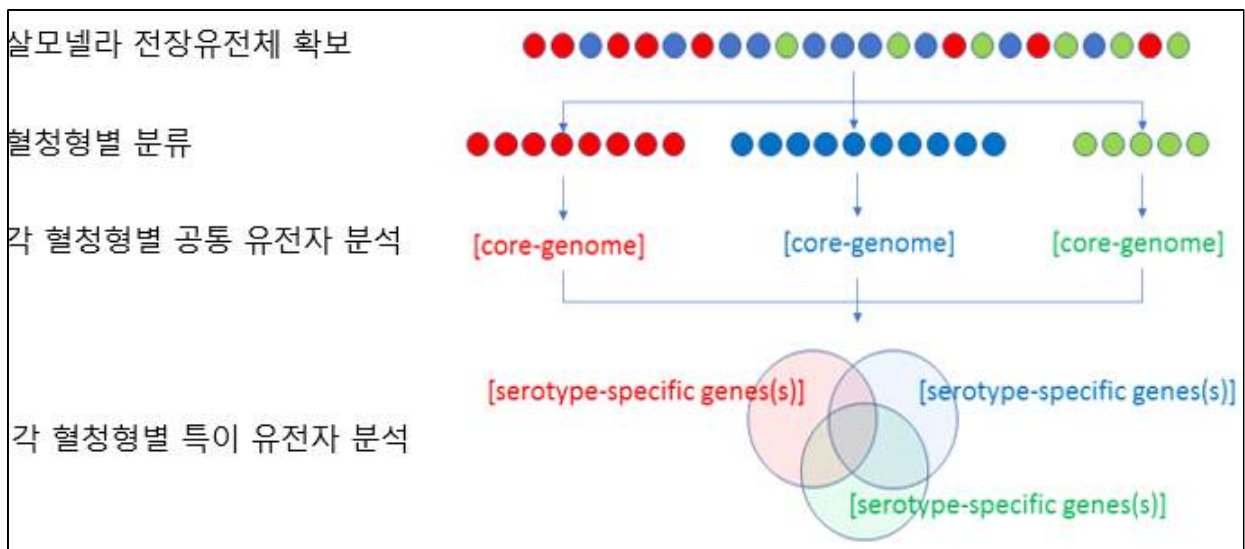


<그림 20. core gene 과 accessory gene)>

- Jacobsen et al. (2011)는 35개의 *Salmonella* 균주들의 pan-genome과 core-genome을 분석한 결과, 살모넬라 혈청형에 따라 pan-genome과 core-genome의 유전자 수의 증감이 각각의 혈청형에 따라 다름을 확인하였음.
- Pan-genome 분석을 통해 각 혈청형에 특이적인 unique genes을 확인 후 그에 대한 마커를 제작하여 살모넬라 혈청형 동정에 적용가능성을 제시함.

(2) Two-step pan-genome 분석

- (가) 본 팀은 현 과제에서 시도하고자 하는 two-step pan-genome analysis를 통해 혈청형 특이 유전자 탐침을 위해 아래와 같은 방법으로 선행 조사한 바 있음.
- (나) 본 선행조사를 위해 살모넬라 혈청형 및 균주들에 대한 완전전장유전체 서열에 대한 library를 확보하였고, 이 DB 중에서 세 가지 혈청형을 대상으로 40개의 *S. Enteritidis*, 27개의 *S. Heidelberg*, 43개의 *S. Paratyphi* CGS를 가지고 각 serovar에 대해서 1st pan-genome 분석을 통해 각각의 혈청형으로부터 core genome 들을 추출하였음.
- (다) *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Paratyphi*의 core-genome들을 가지고 다시 2차 pan-genome 분석을 통해 27 개, 중간 서로 부분적으로 공유하는 dispensable 유전자는 14, 41, 그리고 66개의 유전자들이 선별되었음. 여기서 우리가 목표로 하는 혈청형별 특이 유전자는 *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, 와 *S. Paratyphi*에서 각각 340, 2,126, 그리고 2,379 개임을 보여 주었음. 따라서, 이용 가능한 많은 종류의 살모넬라 혈청형 및 전장유전체(complete genome sequence, CGS)의 수가 많아질 수록 살모넬라 혈청형 특이 마커를 찾을 수 있는 가능성이 커짐.

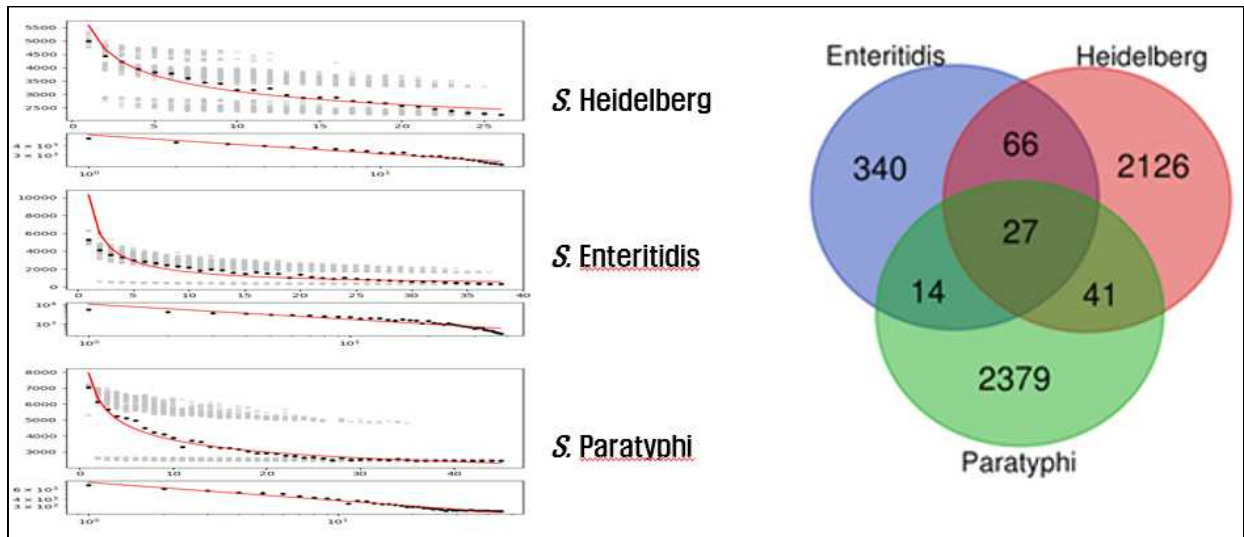


<그림 21. Two-step pan-genome 분석 과정>

- (라) 전장유전체 DB로부터 수집된 *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*와 *S. Paratyphi*의 CGS

들을 이용하여 pan-genome 분석을 통해 closed core-genome, 즉 안정된 혈청형별 특이유전자는 살모넬라 감염증의 주요 오염원인 *S. Enteritidis*에서는 보여지나 *S. Heidelberg*와 *S. Paratyphi*에서는 open core-genome 형태의 그래프를 보이므로 serotype-specific genes을 얻기 위해서는 충분한 수의 CGS가 필요함.

(마) 분석 결과 아래와 같이 세가지 혈청형 그룹이 보유하고 있는 27개의 core gene이 확인되었으며 우리가 목표로 하는 혈청형별 특이 유전자는 *S. Enteritidis*에서 340개, *S. Heidelberg*에서 2,126개와 *S. Paratyphi*에서 2,379개를 보여줌.



<그림 22. Two-step pan-genome 분석 결과>

#### 다. 살모넬라 주요 혈청형 동정 real-time PCR 신속 검출법 개발

(1) Two-step pan-genome 분석을 통해 살모넬라의 주요 혈청형별 특이유전자는 현재 이용 가능한 살모넬라균의 방대한 빅데이터로부터 프라이머 제작을 위한 후보 유전자들이 확보될 것으로 예상함. 혈청형별 유전적 차이를 이용해 그들 유전자들 중에서도 특히, 민감성과 특이성이 뛰어난 프라이머를 제작함으로써 살모넬라 혈청형 동시분석을 위한 키트 개발이 가능할 것으로 보임.

(가) 주요 혈청형 살모넬라 분리주 특성 분석

- 병원성 유전자 분포 및 항생제 내성 프로파일링 분석
- OIE 살모넬라 표준 실험실과 Data 상호교류를 통한 분자역학적 특성분석
  - 주요 혈청형 genotyping을 통한 살모넬라 오염원 추적
  - 지역별, 사육형태별, 농장별 분리 균주의 유전적 근연관계 조사

(나) 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화

- 도출된 대응방법 및 SOP를 활용한 닭 복지농장의 우선 적용을 통해 살모넬라 억제 효능 가능 여부를 확인함.
- 닭 복지농장으로부터 살모넬라 저감화 방제사업 효과를 통한 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 확대 계획 연구 수립

- 현장 및 연구실 내 의견 수렴을 통해 효율적, 위생적, 그리고 안전한 가금류의 생산을 위한 최적의 SOP 수립
- 살모넬라 억제용 제제 선발 및 산업화

라. 시제품 개발 및 현장적용 검증


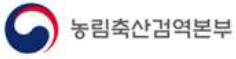
(1) 살모넬라 혈청형 real-time PCR법을 기초로 한 개발된 분석키트의 유효성 검증은 OIE 국제공인실험실로 승인된 농림축산검역본부와의 협업을 통해서 수행되어질 예정이다. 현재 본 연구팀이 보유하고 있는 다양한 살모넬라 표준 및 가금류농장 분리균주, 임상, 또는 식품유래 분리균주들을 이용해 살모넬라 혈청형 검사용 RT-PCR법에 대한 유효성 검증을 실시함과 동시에 아래 그림에서 보여주고 있는 것처럼 기존의 표준 혈청법인 항혈청 시험법과 비교 검증도 할 예정이다. 현재 국내외 진단키트의 상용화 업체 (바이오니아, Thermo Fisher Scientific 사) 등에서 주요 목적 살모넬라균 혈청형 검사용 kit 주문제작을 통해 시제품 완성 및 현장적용 검정을 실시할 예정이다.

▪ 기존에 사용되는 시판 항혈청을 이용한 serotyping KIT와의 **Sensitivity (민감도)와 specificity (특이도) 검증 실시**

✓ **OIE 국제공인실험실-농림축산검역본부 등 공인 연구소 검증 실시 후 실제 현장검증 단계 진행**

|                |          | 기존의 O:H1:H2 혈청학적 검사법           |                               |
|----------------|----------|--------------------------------|-------------------------------|
|                |          | Positive                       | Negative                      |
| 혈청형 RT-PCR용 키트 | Positive | True Positive                  | False Positive (Type I error) |
|                | Negative | False negative (Type II error) | True Negative                 |

✓ **정확성외 추가적으로 비용 [cost], 시간소요 [time to result], 장비 [equipment] 등과 관련하여 기존의 혈청학적 방법과 장단점 비교 검사 실시**

<그림 23. 신규 혈청형 감별을 위한 RT-PCR 키트의 검증 실험>

4. 국내 육계/산란계 일반농가 및 복지농가 살모넬라균의 분포 확인 및 주요 혈청군 선별에 필요한 시험법 확립

- 가. 국내 복지농장 환경에서의 살모넬라 양성률 검사를 통해 전반적인 살모넬라 양성률을 심층파악함.
- 나. 육계 복지농장의 경우 전국적으로 5개 이상의 농장에 대해 샘플링을 진행하며, 팬 5개, 횃대 2개, 벽 6개, 문틈, 음수기 3개, 모이통 3개를 기본으로 20개를 샘플링하며 농장 형태에 따라 횃대가 없는 경우 온풍기, 경계철, 음수기, 모이통에 대하여 추가적

으로 샘플링을 진행함.

- 다. 산란계 복지농장의 경우 전국적으로 5개 이상의 농장에 대해 샘플링을 진행하며, 각 농장마다 10개씩 샘플링을 진행함. 샘플링 장소는 알을 낳는 난상 2개, 횃대 2개, 사료통 2개, 음수대 2개, 슬릿 2개를 기본으로 진행함.
- 라. 일반 농장에 살모넬라 샘플링을 진행하게 될 경우, 육계농장은 횃대가 없는 육계 복지농장에 준하여 진행하며, 산란계 농장은 케이지 형태이므로 계란벨트, 계분벨트, 팬, 바닥, 사료통에 대하여 2개씩 샘플링을 진행할 예정임.
- 마. 가금에서 질병을 일으키는 SG, SP 및 인체에 식중독을 일으키는 SE에 대하여 혈청형을 상세 분석함.
- 바. 분리된 살모넬라에 대해 항생제 내성 여부를 조사 분석함.
- 사. 계군의 살모넬라 감염여부 확인을 위한 혈청검사 실시.
  - (1) 국내에서는 현재 살모넬라에 대한 백신을 시행하고 있지 않으므로, 혈청검사에서의 양성 반응이 확인될 경우 살모넬라 감염을 확인할 수 있음.
  - (2) OIE에서 명시한 살모넬라 혈청검사법으로는 rapid whole blood test, rapid serum agglutination test, microagglutination test, standard tube agglutination test, ELISA 등이 있음.
  - (3) 살모넬라에 이미 감염되어 살모넬라를 분비하고 있는 개체라고 하더라도 혈청반전이 이루어지지 않아 혈청검사에서 살모넬라 음성으로 확인이 될 수 있음. 따라서 살모넬라 항원을 검출하기 위한 모니터링을 병행하여 확실하게 감염계군을 선별할 예정임.

## 5. 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화

- 가. 살모넬라 저감화 방법 선별 (유산균, 백신 및 박테리오파지의 개별 또는 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인)
  - (1) 농장 내 살모넬라 저감화를 위하여 농장에서 분리된 살모넬라에 대하여 *in vitro* 실험실적 검사를 통하여 유산균 및 박테리오파지의 살모넬라 억제능을 확인함.
  - (2) 대표적인 살모넬라 분리종에 대하여 *in vivo* 실험실적 검사를 통하여 유산균 생균제, 사균제 배양액, 살모넬라 백신 및 박테리오파지의 살모넬라 억제능을 단독 또는 병합 요법으로 확인함.
- 나. 차단방역 시설 및 소독의 농가 환경 내 저감화 효과 확인 (계사 내 시설, 바닥, 음용수 및 환기시설 등)
  - (1) 농장 내 살모넬라 관리뿐만 아니라 농장 외부에서 농장 내로의 살모넬라 유입을 막기 위한 차단방역 시설의 세균에 대한 소독제 효능 검사 실시.
- 다. 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP를 도출
  - (1) 살모넬라 부재 사육 계열화 회사 모니터링 및 대응방법 조사.

- (2) 살모넬라 모니터링 샘플 및 모니터링 횟수에 따른 살모넬라 조사율 및 오염원 파악 가능 여부 분석.

## 제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용 및 연구수행방법

#### 1. 연구내용

- 가. 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립
- 나. 살모넬라 저감화 방법 선별 및 표준화
- 다. 국내 농장에서 현장형 살모넬라 신속 정밀 진단/검사법 개발 연구
- 라. 주요 혈청형 살모넬라 분리주 특성 분석
- 마. 도출된 대응방법 및 SOP에 대한 닭 복지농장 적용
- 바. 살모넬라 대응 프로그램 정책 제시

#### 2. 연구수행방법

- 가. 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립
  - (1) 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사
  - (2) 국내 가금류농장 내 살모넬라 발생 현황 조사
- 나. 살모넬라 저감화 방법 선별 및 표준화
  - (1) 살모넬라 저감화 방법 선별 (유산균, 백신 및 박테리오파지의 개별 또는 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인)
  - (2) 차단방역 시설 및 소독의 농가 환경 내 저감화 효과 확인 (계사 내 시설, 바닥, 음용수 및 환기시설 등)
- 다. 국내 농장에서 현장형 살모넬라 신속 정밀 진단/검사법 개발 연구
  - (1) 국내 가금류 농가 내 주요 살모넬라 혈청형 오염도 조사
  - (2) 주요 타겟 혈청형 균주에 대한 pan-genome 분석을 통한 특이 마커 진단
  - (3) 살모넬라 주요 혈청형 동정 real-time PCR 신속 검출법 개발
  - (4) 시제품 개발 및 현장적용 검증
- 라. 주요 혈청형 살모넬라 분리주 특성 분석
  - (1) 병원성 유전자 분포 및 항생제 내성 프로파일링 분석
  - (2) OIE 살모넬라 표준 실험실과 Data 상호교류를 통한 분자역학적 특성분석
    - (가) 주요 혈청형 genotyping을 통한 살모넬라 오염원 추적
    - (나) 지역별, 사육형태별, 농장별 분리 균주의 유전적 근연관계 조사

마. 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화

- (1) 도출된 대응방법 및 SOP를 활용한 닭 복지농장의 우선 적용을 통해 살모넬라 억제 효능 가능 여부를 확인함
- (2) 닭 복지농장으로부터 살모넬라 저감화 방제사업 효과를 통한 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 확대 계획 연구 수립
- (3) 현장 및 연구실 내 의견 수렴을 통해 효율적, 위생적, 그리고 안전한 가금류의 생산을 위한 최적의 SOP 수립
- (4) 살모넬라 억제용 제제 선발 및 산업화
- (5) 본 과제를 위한 추진전략 체계 및 추진 일정



< 그림 24. 연구계획 추진전략 및 체계 >

표 7. 연구계획 추진 일정

| 연구내용 |                        | 1차년도     |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|------|------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|      |                        | 월별 추진 일정 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| 1    | SE 저감화 방법의 실험실 내 효능 평가 | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|      |                        |          |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

|      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 2    | Pan-genome 분석을 통한 SE 혈청형 특이 마커 발굴              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3    | 국내 및 해외 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4    | 살모넬라 저감화 방법 선별 및 효과 확인                         |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5    | 가금류 농가 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2차년도 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1    | 살모넬라 SE 혈청형에 대한 real-time PCR 신속진단 키트 개발 및 상용화 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2    | 시제품 개발 및 현장적용 검증                               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3    | SE 저감화 방법의 농장 현장에서 농장별/사육형태별 효능 평가             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4    | SE 저감화 제제의 시제품 제작                              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5    | 도출된 대응방법 및 SOP에 대한 닭 복지농장 적용                   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 6    | 살모넬라 대응 프로그램 정책 제시                             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

## 제 2 절 연구내용 결과

1. 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립  
 <협동 연구 기관: (주)카브>

가. 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사

(1) 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사

(가) EU 살모넬라 저감화 방안 연구조사

- ① EU에서는 유럽 연합의 규정 ‘COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R2073-20140601>)’ 등에 의해 살모넬라의 식품 내 존재에 대해 매우 엄격한 기준을 세우고 있음
- ② 내용을 일부 살펴보면 식품의 안전성에 대한 기준을 통과하기 위해 간 고기류에 대해서는 10g 검사 시 살모넬라 미검출, 가금류 유래 고기의 경우 25g 내에 살모넬라 미검출의 조건을 충족해야 함
- ③ 많은 유럽 국가에서 살모넬라 예방접종이 실시되고 있으며, CEESA 발표 자료에 따르면 2018년 유럽 가금류 백신 매출액을 살펴보았을 때, Elanco 사의 *Salmonella* Enteritidis 및 *Salmonella* Typhimurium에 대한 백신인 Avipro *Salmonella* duo가 214억(CAGR 43.5%), *S. Enteritidis*에 대한 백신인 Avipro *Salmonella* vac e가 104억으로 각각 5위, 14위를 차지할 정도로 *Salmonella*에 대한 방제전략이 적극적으로 이루어지고 있음
- ④ 독일 등 많은 유럽 국가의 산란계 대상 백신 프로그램에 15주령까지 3회의 살모넬라 백신 접종이 포함되어 있어, *Salmonella*로 인한 식중독 방지에 대해 많은 노력이 이루어지고 있음

표 8. 유럽 연합 살모넬라 관련 규정 중 일부 발췌

| ▼M1   |                   |   |   |                 |             |   |
|---|-------------------|---|---|-----------------|-------------|---|
| 1.6 Minced meat and meat preparations made from other species than poultry intended to be eaten cooked  | <i>Salmonella</i> | 5 | 0 | Absence in 10 g | EN/ISO 6579 | Products placed on the market during their shelf-life |
| 1.7 Mechanically separated meat (MSM) <sup>(9)</sup>  | <i>Salmonella</i> | 5 | 0 | Absence in 10 g | EN/ISO 6579 | Products placed on the market during their shelf-life |
| 1.8 Meat products intended to be eaten raw, excluding products where the manufacturing process or the composition of the product will eliminate the salmonella risk | <i>Salmonella</i> | 5 | 0 | Absence in 25 g | EN/ISO 6579 | Products placed on the market during their shelf-life |
| ▼M2   |                   |   |   |                 |             |   |
| 1.9 Meat products made from poultry meat intended to be eaten cooked  | <i>Salmonella</i> | 5 | 0 | Absence in 25 g | EN/ISO 6579 | Products placed on the market during their shelf-life |



표 9. 2018년 유럽 시장 백신 매출액 순위, CEESA 기준

| 순위        | 백신명                              | 매출액 (KRW, 단위<br>천원) | CAGR<br>(%) |
|-----------|----------------------------------|---------------------|-------------|
| 1         | IB 4/91                          | 42,308,260          | 0.8         |
| 2         | Vaxxitek hvt+ibd                 | 27,532,153          | 13.6        |
| 3         | Cevac ibird                      | 22,662,341          | 14.4        |
| 4         | Transmune                        | 22,426,167          | 11.7        |
| <b>5</b>  | <b>Avipro salmonella duo</b>     | <b>21,411,452</b>   | <b>43.5</b> |
| 6         | Vectomune nd                     | 20,930,979          | 6.5         |
| 7         | Rt+ib+multi+nd+eds               | 17,248,113          | 8           |
| 8         | Paracox 8                        | 16,079,859          | -9.6        |
| 9         | Poulvac ib primer                | 15,580,905          | 12.6        |
| 10        | Gumboro 228e                     | 14,332,162          | 7.3         |
| 11        | Rt+ib+multi+g+nd                 | 13,230,022          | 8.8         |
| 12        | Salenvac-t                       | 12,064,907          | 4.6         |
| 13        | Innovax-ilt                      | 11,514,212          | 6           |
| <b>14</b> | <b>Avipro salmonella vaccine</b> | <b>10,456,400</b>   | <b>-9.4</b> |

| 시기   | 접종      | 사용된 접종의 종류               |
|------|---------|--------------------------|
| 1일령  | 마렉      | Marek                    |
| 1일령  | IB      | Poulvac IB Primer Zoetis |
| 1일령  | 콕시디아    | Paracox 8 MSD            |
| 4일령  | 살모넬라    | Avipro Salmonella vac E  |
| 13일령 | IB      | Nobilis IB4/91 MSD       |
| 18일령 | ND      | Avipro ND LS, Elanco     |
| 4주령  | Gumboro | Avipro Gumboro Elanco    |
| 5주령  | IB      | Nobilis IB Ma5           |
| 6주령  | ND      | Avipro ND LS, Elanco     |
| 7주령  | 살모넬라    | Avipro Salmonella vac E  |
| 9주령  | ILT     | Nobilis ILT, MSD         |
| 11주령 | AE      | Poulvac AE               |
| 13주령 | IB      | Poulvac IB China QX      |
| 14주령 | ND      | Avipro ND LS, Elanco     |
| 15주령 | 살모넬라    | Avipro Salmonella vac E  |

### Erst- und Trinkwasserimpfungen

| Datum      | Fälligkeit | Impfung       | Impfstoff                | Chargen-Nr  |
|------------|------------|---------------|--------------------------|---|
| 25.05.2017 | 1. LT      | Marek         | Marek                    | in der Brüterei   |
| 25.05.2017 | 1. LT      | IB            | Poulvac IB Primer Zoetis | in der Brüterei   |
| 25.05.2017 | 1. LT      | Kokzidien     | Paracox 8 MSD            | in der Brüterei   |
| 29.05.2017 | 4. LT      | 1. Salm       | Avipro Salmonella vac E  | G 009 700 (02/18)<br>G 024 100 (08/18)                            |
| 07.06.2017 | 13. Tag    | 1. IB         | Nobilis IB 4/91 MSD      | A 228 B1N02 (09/17)<br>A 218 B2N01 (06/17)<br>A 229 B1J04 (02/19) |
| 12.06.2016 | 18. Tag    | 1. ND         | Avipro ND LS, Elanco     | G 031 211 (08/17)   |
| 18.06.2017 | 4. Woche   | Gumboro       | Avipro Gumboro Elanco    | F 018 011 (04/18)   |
| 29.06.2017 | 5. Woche   | 2. IB         | Nobilis IB Ma5           | A 190C 1N01 (11/18)   |
| 06.07.2017 | 6. Woche   | 2. ND         | Avipro ND, LS Elanco     | G 031 211 A (08/17)   |
| 13.07.2017 | 7. Woche   | 2. Salm       | Avipro Salmonella vac E  | G 033 600 (06/18)<br>G 039 000 (08/18)                            |
| 27.07.2017 | 9. Woche   | ILT (2xDs TW) | Nobilis ILT, MSD         | A 069 AM01 (04/19)  |
| 10.08.2017 | 11. Woche  | AE            | Poulvac AE               | E 4473 K (10/17)  |
| 24.08.2017 | 13. Woche  | 3. IB         | Poulvac IB China QX      | 20 46 51 (05/18)<br>20 46 46 (05/18)                              |
| 31.08.2017 | 14. Woche  | 3. ND         | Avipro ND LS, Elanco     | E 4475 A (09/17)  |
| 07.09.2017 | 15. Woche  | 3. Salm       | Avipro Salmonella vac E  | E 4744 A (10/18)<br>G 023 700 (05/18)                             |

(Dr. H. Salisch, FTA für Geflügel)  
 Tiergesundheitsdienst  
 Bayern e.V.  
 Fachabteilung Geflügelgesundheitsdienst  
 Senator-Gebäude, Straße 23  
 85586 Poing  
 Tel. 089 / 90 91 - 0, Fax 089 / 90 91 - 202  
 2019. 11

표 10. 독일에서의 예방접종 사례

| Alter        | Impfung               | Alter  | Impfung               |
|--------------|-----------------------|--------|-----------------------|
| Schlupftag   | Marek                 | 7. LW  | 2. Impf. Salmonellose |
| 1. Lebenstag | 1. Impf. Salmonellose | 8. LW  | 1. Impf. ILT          |
| 2. LW        | 1. Impf. IB           | 10. LW | 3. Impf. Newcastle    |
| 3. LW        | 1. Impf. Newcastle    | 11. LW | 1. Impf. AE           |
| 4. LW        | 1. Impf. Gumboro      | 13. LW | 3. Impf. IB           |
| 5. LW        | 2. Impf. Newcastle    | 14. LW | 4. Impf. Newcastle    |
| 6. LW        | 2. Impf. IB           | 15. LW | 3. Impf. Salmonellose |

(나) 효과적인 대응방법 선별 및 국내와의 유사도 및 적용 가능성 분석

- ① 반면 국내 산란계 프로그램의 경우, 12-13주령까지 살모넬라에 대해 2번의 백신이 진행되지만 식중독균인 *S. Enteritidis* 또는 *S. Typhimurium*가 아닌, 양계 산업에 큰 피해를 미치는 가금티푸스에 대한 백신이 진행되고 있음.
- ② 이에 대해 가금류의 질병 이외에 인체 식중독균인 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*에 대한 추가적인 백신이 필요하며, 백신이 진행될 시 복지농장에 대해 사육 동물의 복지만을 강조하는 것이 아닌 사육 동물 및 사람에게 대한 질병 발생률 감소에 대한 부분도 강조할 수 있을 것으로 판단됨.

표 11. 국내 산란계 예방접종 사례

| 시기   | 접종              | 사용된 접종의 종류   |
|------|-----------------|--------------|
| 1일령  | 마렙              | HVT+Risponse |
| 1일령  | ND              |              |
| 14일령 | ND+IB           | Ma5+clone30  |
| 17일령 | IBD             |              |
| 20일령 | Fowl pox        |              |
| 31일령 | Fowl adenovirus |              |
| 34일령 | IBD             |              |
| 37일령 | ND+IB           | QX           |
| 42일령 | 살모넬라            | SG9R         |
| 49일령 | ILT             |              |
| 56일령 | AEP             |              |
| 60일령 | 대장균             |              |
| 67일령 | IB              | Ma5          |
| 70일령 | ABBN            |              |
| 80일령 | 살모넬라            | SG9R         |

| 시기   | 접종              | 사용된 접종의 종류   |
|------|-----------------|--------------|
| 1일령  | 마렉              | HVT+Risponse |
| 1일령  | ND              |              |
| 11일령 | ND+IB           | Ma5+clone30  |
| 15일령 | IBD             | 228E         |
| 21일령 | IB              | K2           |
| 25일령 | IBD             | 228E         |
| 30일령 | ND+IB           | Ma5+clone30  |
| 35일령 | Fowl adenovirus |              |
| 42일령 | AEP             |              |
| 49일령 | ILT             |              |
| 56일령 | 살모넬라            | SG9R         |
| 60일령 | IB              | K2           |
| 65일령 | ABBN            | QX           |
| 78일령 | APV             | 갈리문          |
| 90일령 | 살모넬라            | SG9R         |

나. 국내 가금류농장 내 살모넬라 발생 현황 조사

- (1) 국내 복지농장 및 일반농장 환경에서의 살모넬라 양성률 검사를 통해 전반적인 살모넬라 양성률을 심층파악함.
  - (가) 국내 및 외국의 살모넬라 분리 배양법으로 적용되고 있는 증균배양 → 선택증균 배양 → 분리배양 → 생화학적검사 → 혈청학적 확인시험 순서로 실험을 진행함.
- (2) 육계 복지농장의 경우 5개 농장에 대해 2회에 걸쳐 샘플링을 진행하였으며, 팬, 횃대, 벽, 문틈, 음수기, 모이통에 대해 20개를 샘플링하며 농장 형태에 따라 횃대가 없는 경우 온풍기, 경계철, 음수기, 모이통에 대하여 추가적으로 샘플링을 진행함.
- (3) 일반 농장의 경우, 마찬가지로 2회에 걸쳐 샘플링을 진행하였으며, 횃대가 없는 육계 복지농장에 준하여 샘플링을 진행함.
- (4) 육계 동물복지 인증 농장의 환경 내 살모넬라 모니터링 검사 결과
  - (가) 1차 방문과 2차 방문 시 동일하게 총 7곳(음수대, 사료관, 팬, 온풍기, 벽, 문틈, 횃대)으로부터 환경 모니터링을 실시하였음.
  - (나) 시험 결과, 총 200개의 샘플 중 21개의 살모넬라가 확인되었음. (양성률 10.5%) 또한, 특정한 지점이 아닌 음수대, 사료관, 팬, 온풍기, 벽, 횃대에 걸쳐 대부분의 장소에서 검출되는 특징을 가지고 있으며, 혈청형 확인 결과 *S. Grampian* 또는 *S. Virchow*으로 확인되었음.

표 12. 동물복지 인증 육계 농장 살모넬라 검출 결과

| 번호 |      | 음수대  | 사료관  | 팬    | 온풍기  | 벽    | 문틈   | 횃대   | 합계     |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| 1  | 1차시기 | 1/3  | 1/3  | 0/2  | 1/2  | 3/7  | 0/1  | 0/2  | 6/20   |
|    | 2차시기 | 1/3  | 2/3  | 1/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 4/20   |
| 2  | 1차시기 | 0/3  | 1/3  | 2/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 2/2  | 5/20   |
|    | 2차시기 | 0/3  | 1/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 1/20   |
| 3  | 1차시기 | 0/3  | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 0/20   |
|    | 2차시기 | 1/3  | 1/3  | 1/2  | 0/2  | 1/7  | 0/1  | 0/2  | 4/20   |
| 4  | 1차시기 | 0/3  | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 0/20   |
|    | 2차시기 | 0/3  | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 0/20   |
| 5  | 1차시기 | 0/3  | 1/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 1/20   |
|    | 2차시기 | 0/3  | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2  | 0/20   |
| 합계 |      | 3/30 | 7/30 | 4/20 | 1/20 | 4/70 | 0/10 | 2/20 | 21/200 |

(5) 일반 육계 사육 농장의 환경 내 살모넬라 모니터링 검사 결과

(가) 1차 방문과 2차 방문 시 동일하게 총 6곳(음수대, 사료관, 팬, 온풍기, 벽, 문틈)으로부터 환경 모니터링을 실시하였음.

(나) 시험 결과, 총 200개의 샘플 중 7개의 살모넬라가 확인되었음. (양성률 3.5%) 또한, 살모넬라가 음수대, 온풍기와 벽에서 검출되었으며 상대적으로 사료관 및 팬에서는 분리되지 않는 특징을 지니고 있음. 양성률은 복지 인증 농장에 비해 낮았던 데에 비해 분리된 살모넬라에 대한 혈청형 확인 결과 대표적인 식중독 균인 S. Enteritidis로 확인됨.

표 13. 일반 육계 사육 농장 살모넬라 검출 결과

| 번호 | 음수대  | 사료관  | 팬    | 온풍기  | 벽    | 문틈   | 합계    |
|----|------|------|------|------|------|------|-------|
| 6  | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 1/6  | 0/1  | 1/20  |
| 7  | 1/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 1/6  | 0/1  | 2/20  |
| 8  | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 1/6  | 0/1  | 1/20  |
| 9  | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 1/2  | 0/6  | 0/1  | 1/20  |
| 10 | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | 0/20  |
| 11 | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | 0/20  |
| 12 | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | 0/20  |
| 13 | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | 0/20  |
| 14 | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | 0/20  |
| 15 | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 1/2  | 1/6  | 0/1  | 2/20  |
| 합계 | 1/40 | 0/40 | 0/30 | 2/20 | 4/60 | 0/10 | 7/200 |

(6) 육계 동물복지 인증 농장 및 일반 사육 농장 살모넬라 검출 결과 비교

(가) 동물복지 인증 농장은 200개의 샘플 중 21개가 양성으로 확인되었으며, 일반 육계 사육 농장에서는 200개의 샘플 중 7개가 양성으로 확인되었음.

(나) 샘플에 대한 혈청형 검사 결과 동물복지 인증 농가에서는 *Salmonella* Virchow 또는 *Salmonella* Grampian로 확인되었으며, 일반 사육 농장에서는 *Salmonella* Enteritidis가 분리되어 식중독 균이 검출됨을 확인함.

(다) S. Virchow 및 S. Grampian 혈청형은 *Salmonella* Enteritidis와 비교해 사람에게 높은 병원성을 나타내지는 않지만 최근 연구에 따르면 S. Virchow 역시 식중독을 유발한다는 결과가 있어 지속적으로 모니터링 및 관리해야할 필요가 있음.

(7) 산란계의 경우 복지농장에 대해 전국 5개 농장에 대해 샘플링을 진행하며, 각 농장마다 10개씩 샘플링을 진행함. 샘플링 장소는 알을 낳는 난상, 횃대, 사료통, 음수대, 슬릿을 기본으로 진행함.

(8) 일반 산란계농장의 경우, 케이지 형태에 맞추어 계란벨트, 계분벨트, 팬, 바닥, 사료통에 대하여 샘플링을 진행함.

(9) 산란계 동물복지 인증 농장의 환경 내 살모넬라 모니터링 검사 결과

(가) 1차 방문 시 총 5곳(난상, 횃대, 사료통, 음수대, 슬릿)으로부터 환경 모니터링을 실시하였으며, 2차 방문 시에는 팬이 추가되어 총 6곳으로부터 모니터링을 실시하였음.

(나) 시험 결과, 총 130개의 샘플 중 1개의 살모넬라가 확인되었음. (양성률 0.77%) 그 중, 2번 농장 1차 방문 시 음수대로부터 검출된 살모넬라의 혈청형 확인 결과 SE(*Salmonella* Enteritidis)로 확인되었음.

표 14. 동물복지 인증 산란계 농장 살모넬라 검출 결과

| 번호 |      | 난상   | 횃대   | 사료통  | 음수대  | 슬릿   | 팬   | 합계    |
|----|------|------|------|------|------|------|-----|-------|
| 1  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 2  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 1/2  | 0/2  | -   | 1/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 3  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 4  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -     |
| 5  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 합계 |      | 0/26 | 0/26 | 0/26 | 1/26 | 0/18 | 0/8 | 1/130 |

(10) 일반 산란계 사육 농장의 환경 내 살모넬라 모니터링 검사 결과

(가) 동물복지 인증 산란계 농장과 마찬가지로, 1차 방문 시 총 5곳 (사료통, 계란벨트, 바닥, 팬, 계군벨트)으로부터 환경 모니터링을 실시하였으며, 2차 방문 시에는 팬이 추가되어 총 6곳으로부터 모니터링을 실시하였음.

(나) 시험 결과, 총 110개의 샘플 모두 음성으로 확인되었음.

표 15. 일반 산란계 사육 농장 살모넬라 검출 결과

| 번호 |      | 사료통  | 계란벨트 | 바닥   | 팬    | 계군벨트 | 팬   | 합계    |
|----|------|------|------|------|------|------|-----|-------|
| 6  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -     |
| 7  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -     |
| 8  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 9  | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 10 | 1차시기 | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -   | 0/10  |
|    | 2차시기 | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2 | 0/20  |
| 합계 |      | 0/22 | 0/22 | 0/22 | 0/22 | 0/16 | 0/6 | 0/110 |



- (11) 산란계 동물복지 인증 농장 및 일반 사육 농장 살모넬라 검출 결과 비교
- (가) 산란계 동물복지 인증 농장과 관행케이지 사용 농장에서의 살모넬라 검출 결과  
동물복지 인증 농장은 130개의 샘플 중 1개가 양성으로 확인되었으며, 관행케이지 사용 농장에서는 110개의 샘플 모두 음성으로 확인되었음.
- (나) 그러나 동물복지 인증 농장에서 분리된 살모넬라는 혈청형 검사 결과 사람 식중독 최대 발생 원인균인 *S. Enteritidis*로 확인되었음. 이는 높은 병원성을 나타내며 난계대 역시 가능한 원인균으로 동물복지 인증 농장 사육 산란계에서 생산되는 계란에도 질병 전파의 위험성이 높은 것으로 사료됨.
- (다) 일반 산란계 사육 농가의 경우 가금티푸스에 대한 백신이라도 실시하고 있지만, 복지 인증 농가의 경우 전혀 살모넬라에 대한 백신이 시행되고 있지 않은 것도 검출율에 영향을 줄 수 있는 원인으로 사료됨.
- (12) 계군의 살모넬라 감염여부 확인을 위한 혈청검사 실시.
- (가) 국내에서는 현재 살모넬라에 대한 백신을 시행하고 있지 않으므로, 혈청검사서 양성 반응이 확인될 경우 살모넬라 감염을 확인할 수 있음.
- (나) OIE에서 제시한 살모넬라 혈청검사법(rapid whole blood test, rapid serum agglutination test, microagglutination test, standard tube agglutination test, ELISA 등) 중 가장 일반적으로 사용되는 ELISA를 이용하여 양성률을 판정할 계획으로 주령별로 혈청을 확보 중에 있음.

## 2. 살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화

### <주관 연구 기관: 건국대학교 산학협력단>

가. 살모넬라 저감화 방법 선발 (유산균, 백신 및 박테리오파지의 개별 또는 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인)

(1) Kefir로부터 유산균의 선발 및 살모넬라 억제능 시험을 통한 효과 확인

: 먼저 락토바실러스 케피아노파시엔스 DN1 (*Lactobacillus kefiranofaciens*) DN1 (KCCM11869P) 균주를 케피어에서 분리하였음. 이 유산균은 닭과 같은 가금류에서 살모넬라 균주의 감염을 효과적으로 예방하고 저감화함으로써, 항생제를 대체하는 수단으로 사용 가능함을 보여 주었음.

(가) *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1을 활용한 닭 맹장 내 살모넬라 저감화 실험

① 유산균주(락토바실러스 케피아노파시엔스 DN1 균주(KCCM11869P))가 닭에서 살모넬라 저감화 효과를 발휘할 수 있는지를 증명하기 위해 두 가지 종류의 동물실험을 실시하였음.

② 첫 번째 실험은 부화 직후 살모넬라 방어효과를 확인하기 위하여 1일령 병아리에서 실시되었다. 실험은 총 3개의 동물군으로 나누어 실시됨. 각 군별로 병아리는 총 6 마리였음. 양성대조군에는 살모넬라 공격접종, 음성 대조군에는 saline만 접종하였으며, 유산균주 투여군의 경우 1일령 병아리에 유산균주를 투여

하고 하루 뒤 *Salmonella* Enteritidis RR-SE (Rifampicin resistant strain)를 공

격접종하였음. 유산균의 경우 두당  $1.22 \times 10^7$  cfu씩 경구 투여해줌. *Salmonella* Enteritidis RR-SE 균주의 경우 두당  $3.2 \times 10^7$  cfu씩 경구 투여해주었음.

살모넬라를

공격 접종한 다음날 부검을 통하여 병아리의 맹장으로부터 살모넬라를 계수하였음.

- ③ 두 번째 실험은 부화 10일 후의 살모넬라 방어효과를 확인하기 위해 실시되었음. 실험은 총 3개의 동물군으로 나누어 실시되었음. 각 군별로 병아리는 총 6마리였음. 양성대조군에는 살모넬라 공격접종, 음성 대조군에는 saline만 접종하였

으며, 프로바이오틱 효모주 투여군의 경우 1일령 병아리에 유산균을 투여하고 하루

뒤 *Salmonella* Enteritidis RR-SE를 공격접종 하였음. 유산균의 경우 두당  $1.22 \times 10^7$

cfu 씩 효모를 경구 투여해주었음. *Salmonella* Enteritidis RR-SE 균주의 경우 두당  $3.2 \times 10^7$  cfu씩 경구투여 해주었음. 살모넬라를 공격 접종한 다음날 부검을 통하여 병아리의 맹장으로부터 살모넬라를 계수하였음.

- ④ 살모넬라의 계수에는 본 실험에서 공격접종에 사용된 RR-SE 균주만 계수 될 수 있도록 Rifampicin-supplemented XLD 선택배지를 사용하였음.
- ⑤ 락토바실러스 케피아노파시엔스 DN1 유산균을 이용하여 1일령 병아리에서 부화 직후 살모넬라 공격접종시 방어능을 평가한 결과를 표 1에 나타내었음. *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1를 투여한 그룹에서 양성대조군에 비하여 통계적으로 유의한 수준으로 맹장 내 살모넬라균이 적게 존재함을 확인할 수 있었음.

| 부검 시점           | 맹장 내 살모넬라 수의 평균값 (cfu/g) |                      |  |
|-----------------|--------------------------|----------------------|--|
|                 | 음성대조군                    | 양성대조군                | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> DN1 투여군 |
| 살모넬라 공격접종 1일 후  | 검출되지 않음                  | $124.70 \times 10^5$ | $12.60 \times 10^5$                          |
| 살모넬라 공격접종 6일 후  | 검출되지 않음                  | $15.73 \times 10^5$  | $3.00 \times 10^5$                           |
| 살모넬라 공격접종 10일 후 | 검출되지 않음                  | $5.72 \times 10^5$   | $2.58 \times 10^5$                           |

- ⑥ 락토바실러스 케피아노파시엔스 DN1 유산균은 부화 10일 후 병아리에서도 살모넬라 저감화 효과를 발휘하였음.

| 부검 시점          | 맹장 내 살모넬라 수의 평균값 (cfu/g) |                      |  |
|----------------|--------------------------|----------------------|--|
|                | 음성대조군                    | 양성대조군                | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> DN1 투여군 |
| 살모넬라 공격접종 1일 후 | 검출되지 않음                  | $266.10 \times 10^4$ | $33.70 \times 10^4$                          |

- ⑦ 이와 같이, 살모넬라 감염 예방능을 가진 프로바이오틱 유산균 락토바실러스

케피아노파시엔스 DN1 유산균를 활용함으로써 닭에서 효율적으로 살모넬라를 저감화하였다. 본 개발에서 활용한 유산균주를 기반으로 하여 양계용 프로바이오틱스

제품을 생산하면 양계농가의 살모넬라로 인한 피해 저감화뿐만 아니라 농장 환경으

로 배출되는 살모넬라의 양을 저감화함으로써 결과적으로 사람에서의 살모넬라

로 인한 식중독 예방에 까지도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대됨.

(2) *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1과 *Kluyveromyces marxianus* KI140723-05와의 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인

(가) 실험디자인

- ① 실험 1: 108수의 SPF 산란계 병아리 (Hy-Line Brown)를 6그룹 [1)음성 및 2)양성대조구, 3)유산균 *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1, 4)효모균 *Kluyveromyces marxianus* KU140723-05, 5) 유산균+효모균 혼합, 6)상업용 복합유산균]으로 나눔. 실험 1에서는 부화 후 (외부의 공기노출 전) 직접 probiotics를 이틀 연속 접종 후 그 다음 날 rifampicin에 저항성을 가지는 살모넬라균을 다시 접종함. 그 다음날과 그 이후로 5일째 되는 날에 6수 씩 희생시켜 맹장 내 접종한 살모넬라균수를 측정함
- ② 실험 2: 실험 1과 같은 실험조건으로 부화 후 10, 11일째 되는 날에 probiotics를 접종한 후 그 다음날에 다시 살모넬라를 접종한 후 13일째 날에 맹장 내 살모넬라균수를 측정.
- ③ 실험 3: 실험 1과 같은 실험조건으로 부화 후 9일째 되는 날에 살모넬라균을 먼저 접종하고 10, 11일째 날에 probiotics를 접종, 12일째 날에 맹장 내 살모넬라균수를 측정.

표 16. 실험 그룹에 사용된 유산균, 효모균, 살모넬라균주

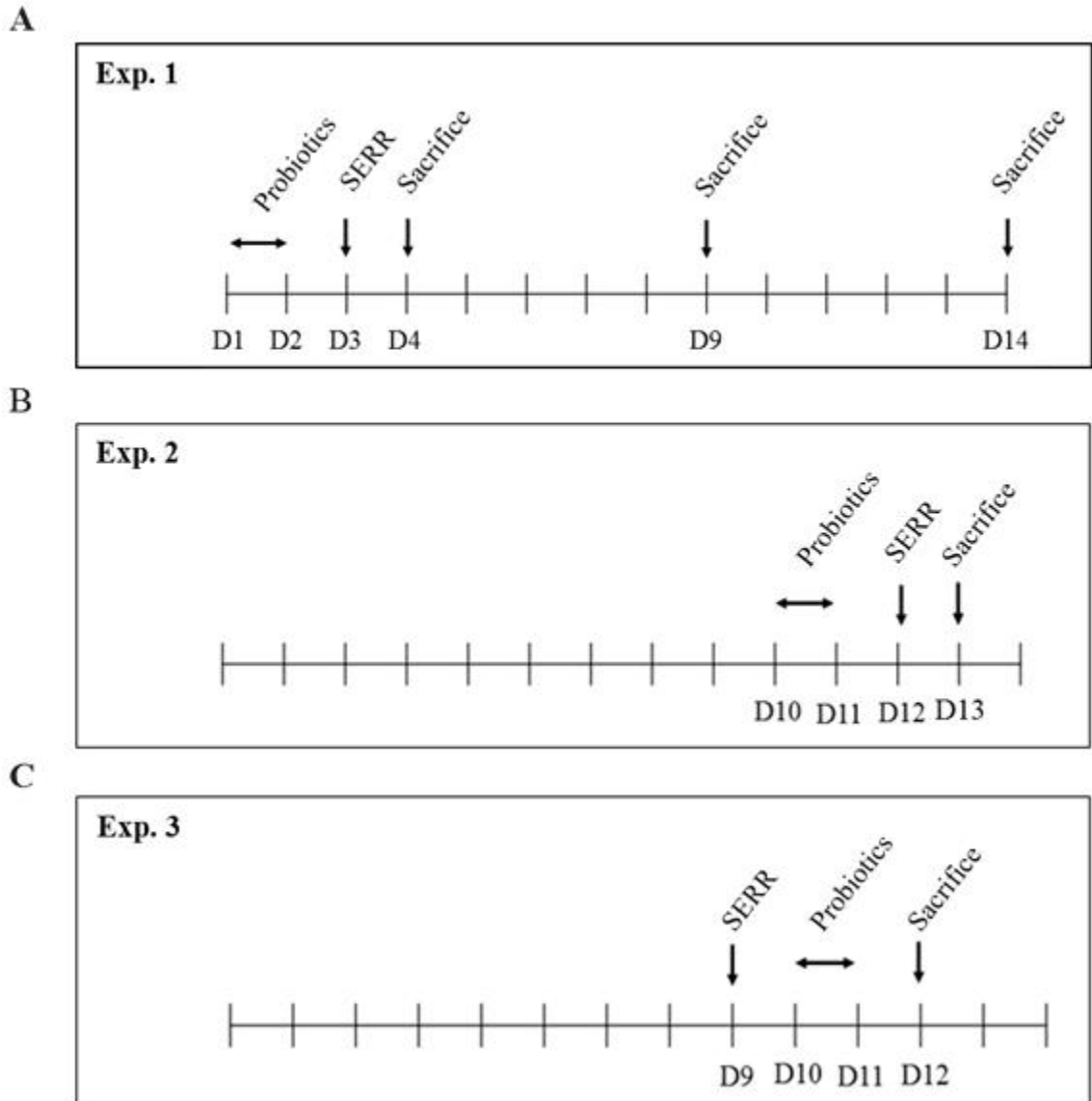
| Group           | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> DN1 (LKF_DN1) | <i>Kluyveromyces marxianus</i> KU140723-05 (KMA5) | IDF-7 <sup>4</sup> | S. Enteritidis resistant to rifampicin (SERR) |
|-----------------|--|---|--------------------|---|
| <sup>2</sup> NC | -  | -   | -                  | -   |
| <sup>3</sup> PC | -  | -   | -                  | +   |
| PG1             | +  | -   | -                  | +   |
| PG2             | -  | +   | -                  | +   |
| PG3             | +  | +   | -                  | +   |
| PG4             | -  | -   | +                  | +   |

<sup>1</sup>Three of 6 chicks in NC and PC groups were orally administered 200 µL of MRS corresponding LKF DN1 culture medium, and the other three chicks were administered 200 µL of PDB corresponding KMA5 culture medium. Chicks in NC group were orally administered 200 µL of TSB corresponding SERR.

<sup>2</sup>NC = negative control

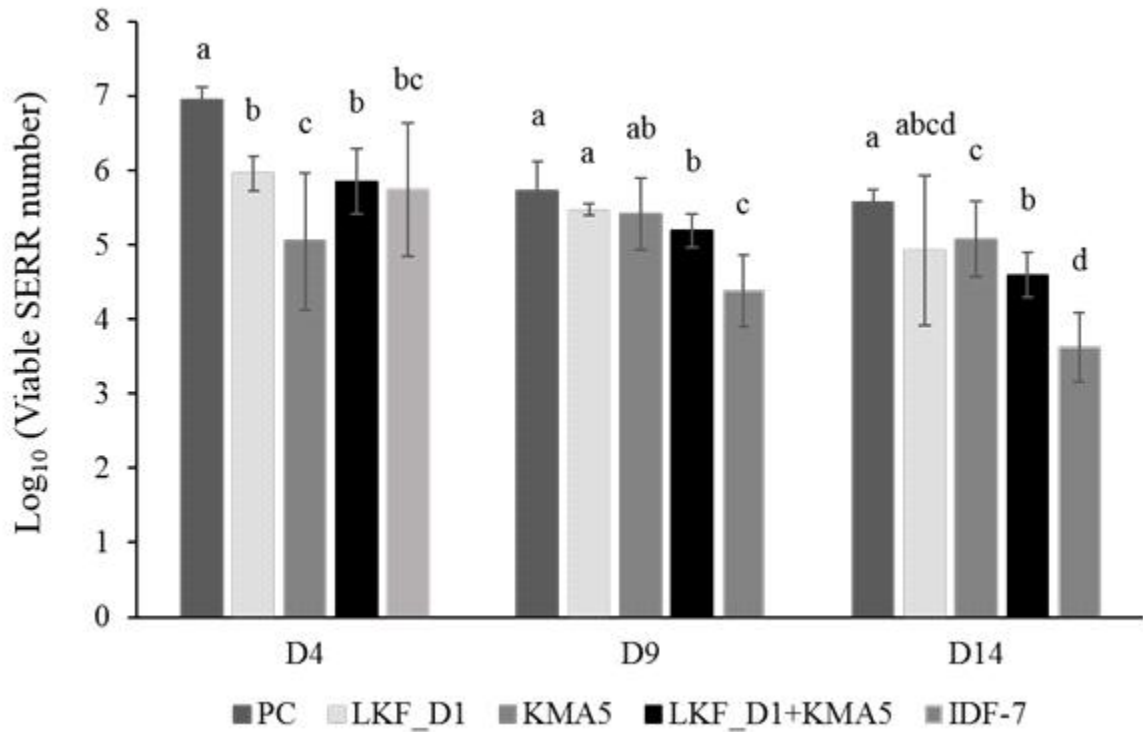
<sup>3</sup>PC = positive control

<sup>4</sup>IDF-7, a commercial product containing *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium breve*, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

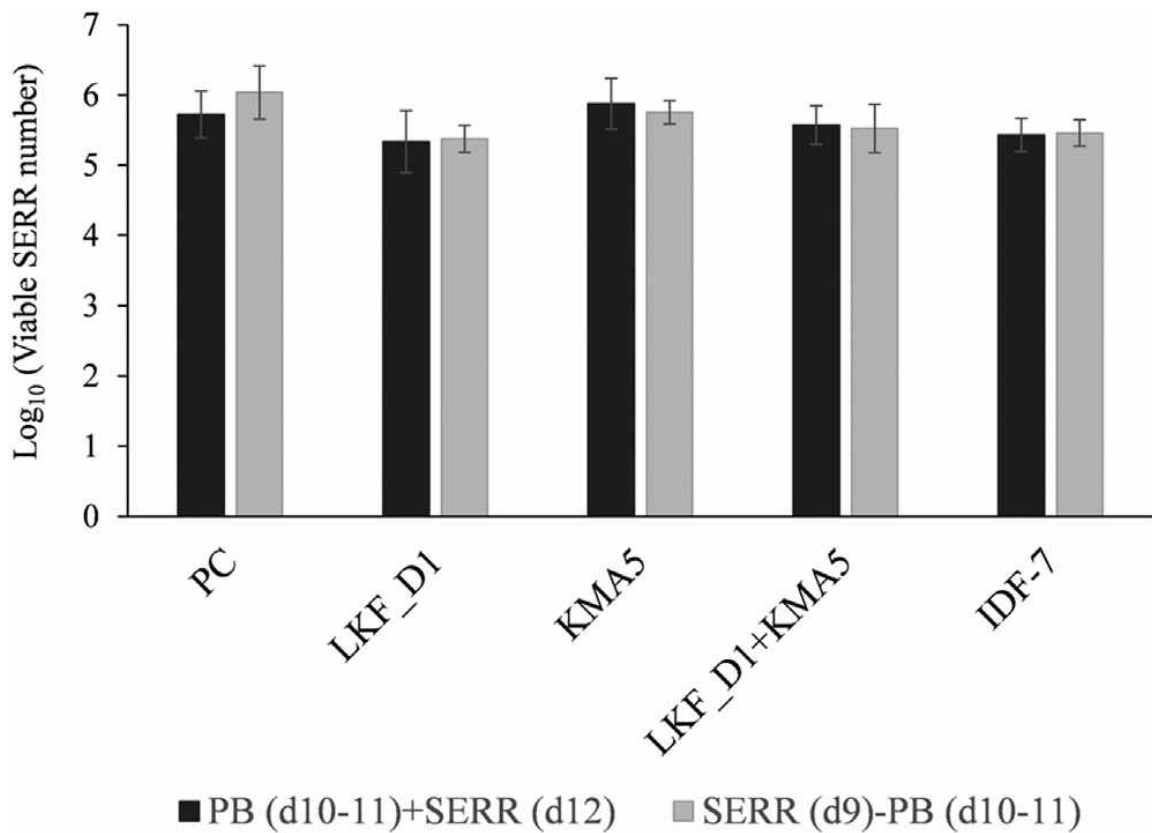


<그림 25. 실험에 사용된 설계>

(나) 결과



<그림 26. 부화직전 probiotics를 접종한 그룹별, 시간별 맹장 내 살모넬라균 수>



<그림 27. 부화 후 약 10일 경에 probiotics를 접종한 그룹별, 시간별 맹장 내 살모넬라균 수>

(다) 결론

: 부화 직후 병아리에게 케피어에서 분리한 유산균 및 효모균과 같은 probiotics의 접종 또는 급여는 실험동물 닭의 장내건강 증진과 항균효과를 보여주고 있음. 따라서 본 실험을 통해서 닭을 포함한 동물들은 probiotics와 같은 유익균에 대한 노출의 우선이 장내 유해균의 부착을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주고 있음.

(3) Bacteriophage를 이용한 육계의 괴사성장염 (necrotic enteritis)의 저해 효과.

: 닭을 포함한 조류동물에 있어서 빈번한 대사성장염의 발병과 치사율은 클로스트리디움 퍼프린전스와 아이메리아 원충에 의해서 주로 발생함. 오늘날 동물의 질병에 대한 예방적 차원에서 사료 내 항생제의 첨가는 금지되어 오고 있음. 이에 따라 육계산업에 있어서 닭의 대사성장염의 증가로 인해 경제적으로 크나큰 손실이 발생하고 있음. 따라서, 새로운 항생제 대체제의 개발이 절실히 요구됨.

(가) 실험 설계

: 본 연구에서는 항생제 대체제로써 닭의 분변을 포함한 육계사 주위 환경으로부터 닭의 대사성질환을 유발하는 클로스트리디움 퍼프린전스에 특이적으로 결합, 침입하여 이 세균들을 효과적으로 사멸시키는 박테리오파지를 선별하였음. 이 박테리오파지를 닭사료에 3그룹[1)low-phage, LP; 2)medium-phage, MP; 3)high-phage, HP concentrations]으로 나눠 첨가하여 35일 간 급여를 실시한 후 실험동물 닭의 생산성, 대사성장염의 발생률과 장내 클로스트리디움 퍼프린전스의 수와 병변을 확인함. 부화 후 9일째 날에 아이메리아 원충을 접종. 실험 14일에서 16일 3일 연속 클로스트리디움 퍼프린전스를 접종. 다음 이틀 연속 실험동물의 장내 병변을 확인함. 매주 체중과 사료 섭취량을 측정함.

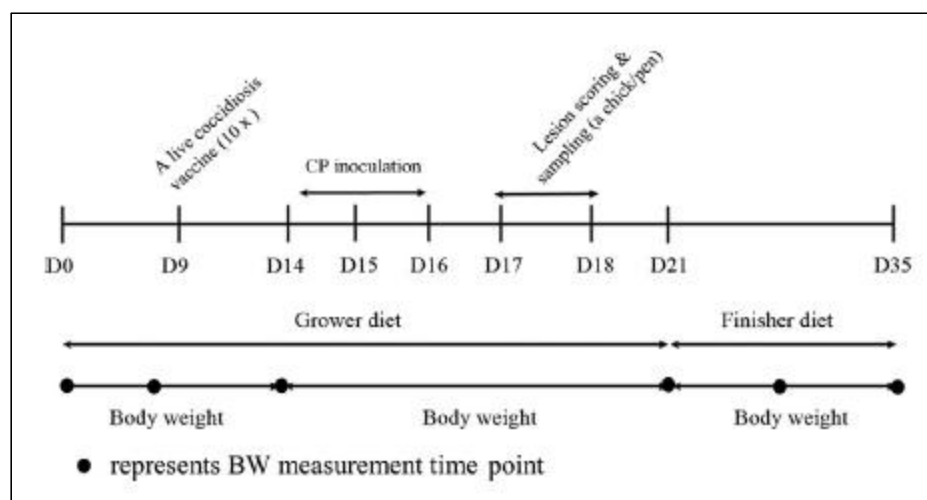
표 17. 실험에 사용된 사료의 재료 및 성분 조성

| Ingredients, %                          | Grower diet (0–21 d) | Finisher diet (22–35 d) |
|---|----------------------|-------------------------|
| Corn                                    | 26.50                | 44.88                   |
| Wheat                                   | 30.05                | 15.00                   |
| De-fatted rice bran                     | —                    | 3.00                    |
| Distiller's dried grains with solubles  | 5.00                 | 1.10                    |
| Soybean meal 44% CP                     | 22.80                | 15.00                   |
| Rapeseed meal                           | 3.00                 | 5.00                    |
| Corn gluten meal                        | —                    | 3.50                    |
| Meat and bone meal                      | 6.45                 | 6.50                    |
| Tallow                                  | 3.70                 | 3.70                    |
| Lysine, 55%                             | 0.47                 | 0.53                    |
| Methionine, 90%                         | 0.30                 | 0.25                    |
| Limestone                               | 0.90                 | 0.87                    |
| Monocalcium phosphate                   | 0.33                 | 0.20                    |
| Salt                                    | 0.28                 | 0.25                    |
| Vitamin and mineral premix <sup>1</sup> | 0.22                 | 0.22                    |
| Total                                   | 100.00               | 100.00                  |
| Calculated nutrient composition, %      |                      |                         |
| AMEn (kcal/kg) <sup>2</sup>             | 2,829.02             | 2,996.82                |
| Dry matter                              | 89.21                | 89.00                   |
| Crude protein                           | 22.56                | 21.17                   |
| Crude fat                               | 6.92                 | 7.40                    |
| Ash                                     | 5.36                 | 4.91                    |
| Total phosphorus                        | 0.63                 | 0.64                    |
| Available phosphorus                    | 0.21                 | 0.21                    |
| Digestible lysine                       | 1.15                 | 1.05                    |
| Digestible methionine                   | 0.56                 | 0.53                    |
| Digestible Met + Cys                    | 0.84                 | 0.80                    |

Vitamin A, 20,000 IU; vitamin D3, 5,000 IU; vitamin E, 30,000 ppm; vitamin K, 4,000 ppm; vitamin B1, 40,000 ppm; vitamin B2, 10,000 ppm; niacin, 70,000 ppm; pantothenic acid, 20,000 ppm; biotin 200 ppm; folic acid, 1,200 ppm, vitamin B12, 30,000 ug, Zn, 54,000 ppm; Fe, 54,000 ppm; Mn, 78,000 ppm; Cu, 8,000 ppm; Iodine, 1,200 ppm; Se, 180 ppm.

<sup>1</sup>Vitamin and mineral premix per kg.

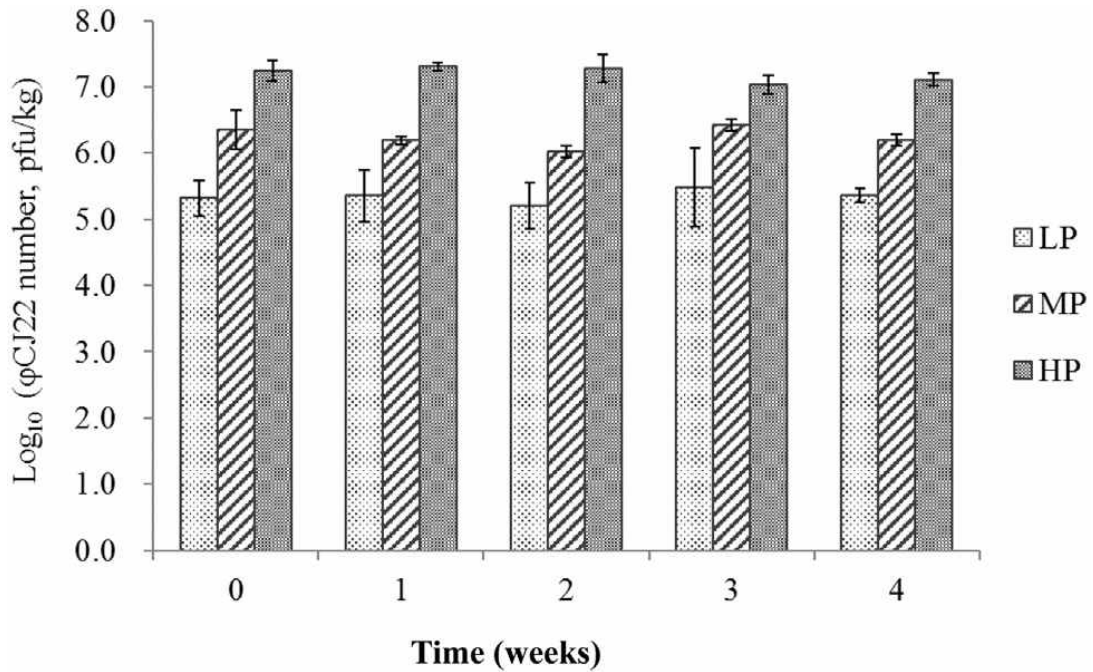
<sup>2</sup>AMEn, nitrogen-corrected apparent metabolizable energy.



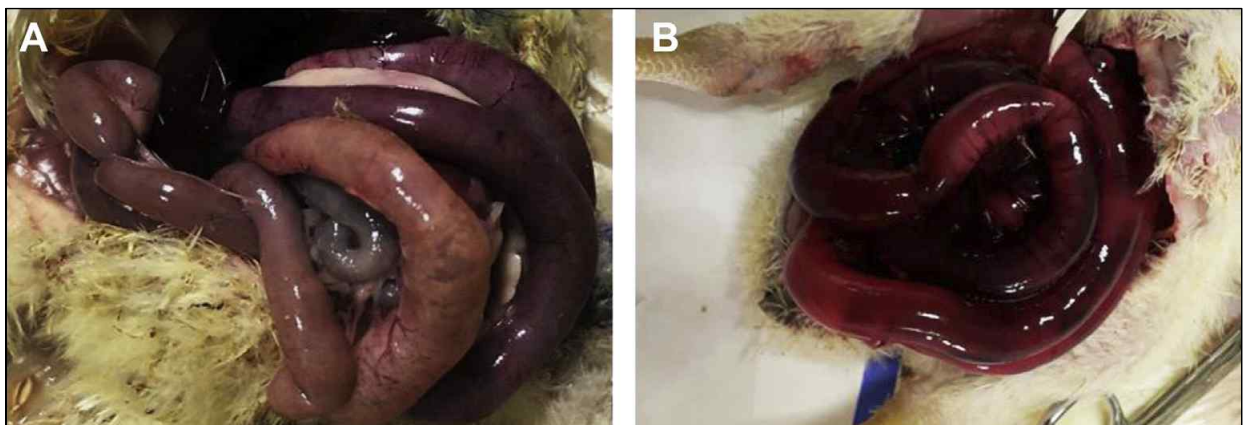
<그림 28. 본 실험의 설계>

(나) 결과

: 사료로부터 파지의 회수율을 통해서 사료 내 파지의 안전성을 보여줌. 다양한 환경과 동물에서 분리된 45개의 클로스트리디움 퍼프린전스를 이용해 이들의 사멸효과를 바탕으로 선발된 박테리오파지는 장내 클로스트리디움 퍼프린전스의 감소를 통해 닭의 생산효율을 증가시켰으며 닭의 대사성장염 발생률과 치사율을 감소시켰음.



<그림 29. 사료로부터 파지의 회수율>



<그림 30. 클로스트리디움 퍼프린전스와 아이메리야 원충에 의한 닭의 장벽이 얇아지고 장내 가스 발생(A)하고 장내 용해성 병변이 발생함(B)>

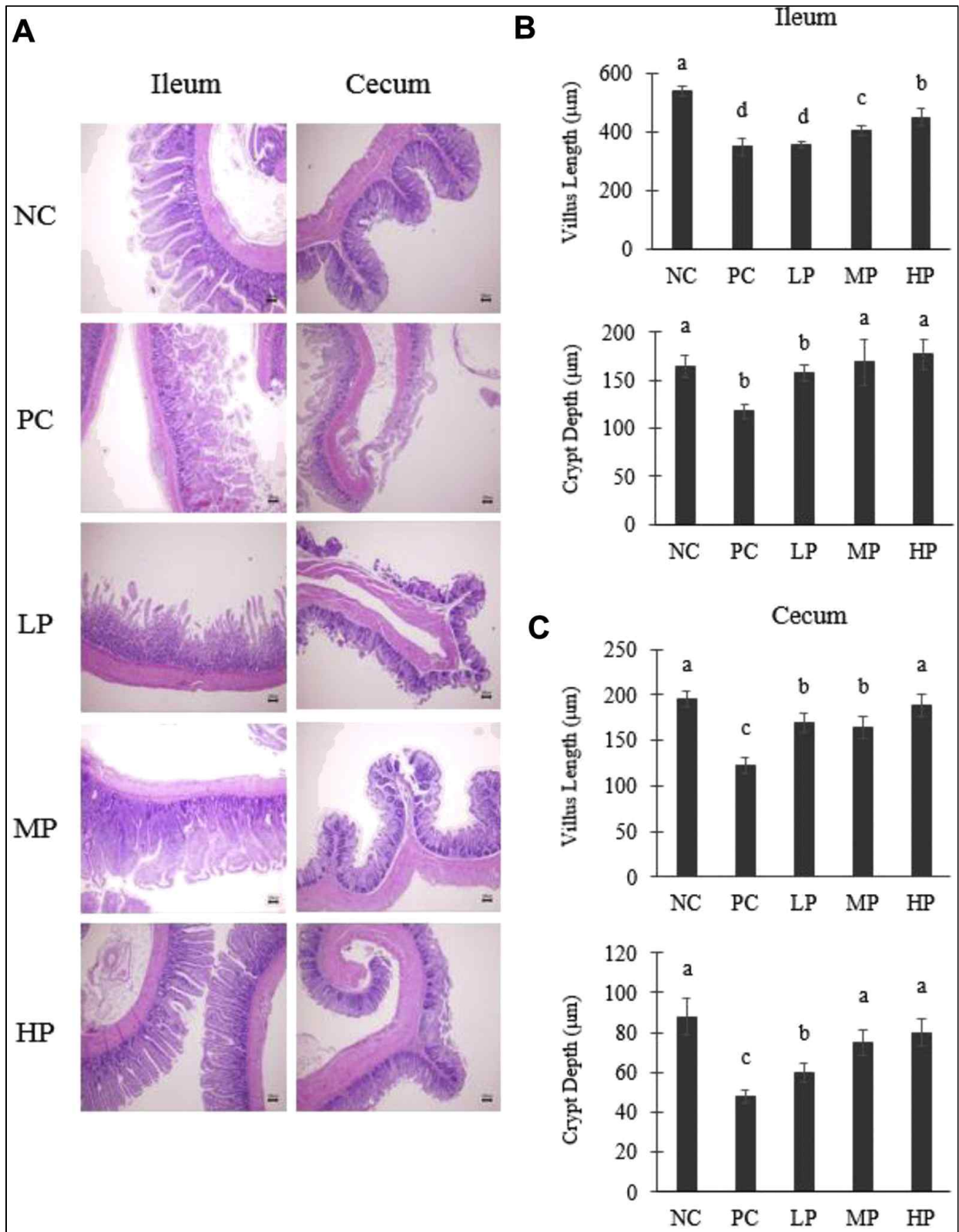
표 18. 파지에 의한 대사성장염을 가진 육계와의 대사효율 및 성장 효과 비교



| Item   | NC                 | PC                 | Bacteriophage (pfu/kg) |                      |                      | SEM   | <i>P</i> |
|--|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-------|----------|
|  |                    |                    | 10 <sup>5</sup>        | 10 <sup>6</sup>      | 10 <sup>7</sup>      |       |          |
|  |                    |                    | LP                     | MP                   | HP                   |       |          |
| BW, g/bird                                   |                    |                    |                        |                      |                      |       |          |
| D1   | 41.05              | 41.14              | 40.92                  | 40.87                | 40.99                | 0.142 | 0.691    |
| D7   | 147.3              | 143.0              | 140.6                  | 142.2                | 143.3                | 1.628 | 0.065    |
| D14  | 312.0              | 308.5              | 319.5                  | 328.0                | 315.5                | 6.504 | 0.281    |
| D21  | 688.9 <sup>a</sup> | 592.7 <sup>c</sup> | 634.2 <sup>b</sup>     | 655.0 <sup>a,b</sup> | 642.7 <sup>b</sup>   | 14.41 | 0.001    |
| D35  | 1,826 <sup>a</sup> | 1,686 <sup>b</sup> | 1,737 <sup>b</sup>     | 1,750 <sup>a,b</sup> | 1,747 <sup>a,b</sup> | 27.75 | 0.021    |
| At a week after CP challenge (days 17 to 21) |                    |                    |                        |                      |                      |       |          |
| BWG, g/d/bird                                | 53.84 <sup>a</sup> | 40.60 <sup>c</sup> | 44.96 <sup>b</sup>     | 46.72 <sup>b</sup>   | 46.74 <sup>b</sup>   | 1.472 | <0.0001  |
| FI, g/d/bird                                 | 89.32 <sup>a</sup> | 77.40 <sup>b</sup> | 72.15 <sup>b</sup>     | 73.62 <sup>b</sup>   | 71.73 <sup>b</sup>   | 2.057 | <0.0001  |
| FCR, g/g                                     | 1.661 <sup>b</sup> | 1.913 <sup>a</sup> | 1.614 <sup>b</sup>     | 1.582 <sup>b</sup>   | 1.545 <sup>b</sup>   | 0.037 | <0.0001  |

Abbreviations: BWG, body weight gain; FCR, feed conversion ratio; FI, feed intake; HP, high-phage concentration (10<sup>7</sup> pfu/kg); LP, low-phage concentration (10<sup>5</sup> pfu/kg); MP, medium-phage concentration (10<sup>6</sup> pfu/kg); NC, CP-uninfected negative control; PC, CP-infected positive control.

<sup>a</sup>Values are least square means of 12 replicates. Means within a row not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).



<그림 31. 각각의 실험 그룹으로부터 육계의 회장과 맹장의 변화된 구조. 장의 조직병리학적 사진(A)과 Villus와 crypt 길이의 측정(B) 비율을 나타냄>

(다) 결론

: 본 실험은 *C. perfringens* 특이 bacteriophage가 육계의 괴사성 장염을 예방할 수 있

음을 보여주었음. 실험기간 생산성, 병변, 휘발성 지방산 등과, 실험 35일차에 회장 소화율을 측정하였다. 괴사성 장염 대조구는 미 접종 대조구와 비교하여 생체중, 증체량, 사료섭취량이 감소하였으며, 사료요구율은 증가하였다. 사료 내 bacteriophage를  $10^6$ pfu/kg으로 공급하였을 때 괴사성 장염에 따른 생체중과 증체량 감소를 완화하였음. 괴사성 장염 (NE) 폐사율은 괴사성 장염 대조구와 비교하여 bacteriophage 처리구에서 감소하는 경향을 나타냈었으며, 특히  $10^7$ pfu/kg처리구에서 NE 폐사율이 유의적으로 감소하였다. NE 병변은 *C. perfringens* 접종 후 1일차에는 차이가 없었으나, 접종 후 2일차에는 모든 bacteriophage 처리구에서 유의적으로 감소하였음. H&E 염색을 통한 조직학적 분석 결과에 의하면, bacteriophage는 *Eimeria* spp. 또는 CP에 의한 장내조직의 괴사 또는 장점막의 소실에 대한 예방적 효과가 있음을 나타내었음. 게다가 사료내 CP에 대한 특이 bacteriophage의 첨가는 육계의 소장 내용물 또는 분변의 CP수를 감소시켰음. 공장 내 휘발성 지방산의 함량은 처리간 차이가 발견되지 않았음. 간의 지표인 GOT 및 GPT는 처리간 차이가 발견되지 않았음. 하지만, total cholesterol과 nitric oxide 함량은 NE 대조구에서 미 접종 대조구와 비교하여 유의적으로 감소하였음. Total cholesterol은 bacteriophage 고 수준 첨가 또는 혼합처리구에서 NE 대조구와 비교하여 유의적으로 증가하였음. Nitric oxide는 유의적이지는 않았지만 bacteriophage 저 수준 첨가 또는 혼합처리구에서 다소 증가하는 경향이 나타났었음. 결론적으로 본 연구결과 사료 내 bacteriophage 첨가시 괴사성 장염에 따른 생산성 감소를 억제하고 장내 CP수를 감소시키는 것으로 조사되었음. 특히 bacteriophage 처리구에서는 괴사성 장염 대조구와 비교하여 사료섭취량은 감소하였으나 증체량이 증가하였는데, 이는 bacteriophage  $\phi$ CJ22의 첨가로 육계의 장내 환경이 개선되어 사료 영양소의 이용률 향상과 CP수의 감소에 따른 결과를 통해 육계의 생산성 증가와 품질에 대해 큰 기여를 할 것으로 사료됨. 향후 이 박테리오파지는 항생제 대체제로써 육계산업에 큰 기여를 할 것으로 예상된다.

### <협동 연구 기관: (주)카브>

(4) 발효식품으로부터 유산균의 선발 및 살모넬라 억제능 시험을 통한 효과 확인

: 살모넬라 저감화 방법의 선택을 폭을 넓히기 위해서 추가적으로 42종류의 유산균을 김치, 버섯, 된장, 깍두기, 물김치에서 분리하였음.

### 3. 국내 농장에서 현장형 살모넬라 신속 정밀 진단/검사법 개발 연구

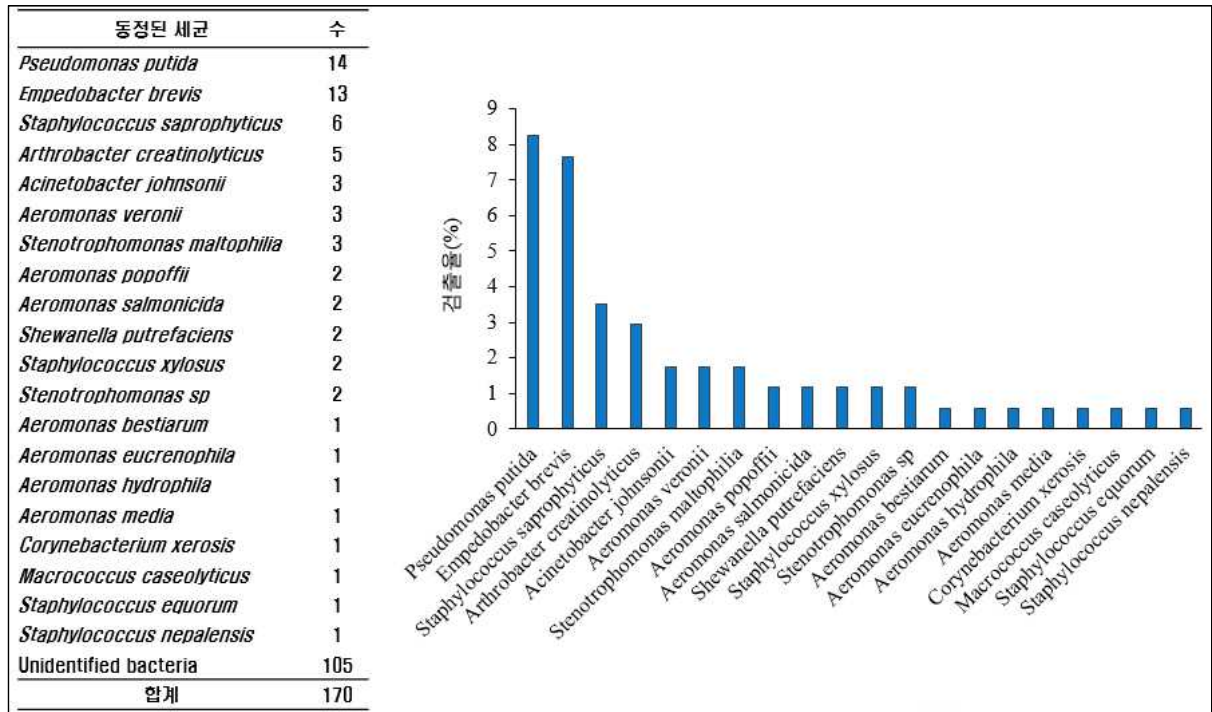
가. 국내 가금류 농가 내 주요 살모넬라 혈청형 오염도 조사

(협동연구기관: (주)카브)

| 구분  | 살모넬라<br>(검출수/샘플수) | 검출율 (%) | 혈청형  |                         |
|-----|-------------------|---------|------|-------------------------|
| 육계  | 동물복지 인증           | 21/200  | 10.5 | S. Grampian, S. Virchow |
|     | 일반                | 7/200   | 3.5  | S. Enteritidis          |
| 산란계 | 동물복지 인증           | 1/131   | 0.77 | S. Enteritidis          |
|     | 일반                | 0/110   | 0    | -                       |

(주관연구기관: 건국대학교 산학협력단)

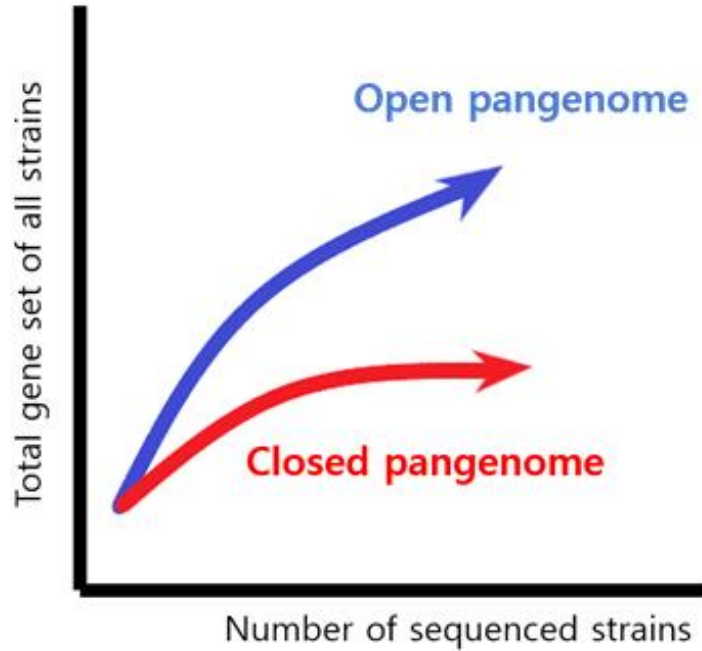
: 2020년 5월부터 8월 사이 6군데의 산란계 및 육계 농장으로부터 계사 내 생산 시설, 사료 및 환경으로부터 샘플링을 실시하여 살모넬라균 검출을 실시하였으나 살모넬라균 불검출이었음. 아래 표는 살모넬라균 외 산란계 및 육계 농장 내 생산 단계에서 분리된 세균을 보여주고 있음. 추가적으로 국내 경기, 충북, 충남, 전북, 전남, 제주 지역에 위치한 가금류 작업장 샘플에서 분리한 *S. Enteritidis* 14주와 *S. Typhimurium* 5주를 분리하였음.



<그림 32. MALDI-ToF를 이용한 국내 가금농가에서 분리된 미생물균 동정>

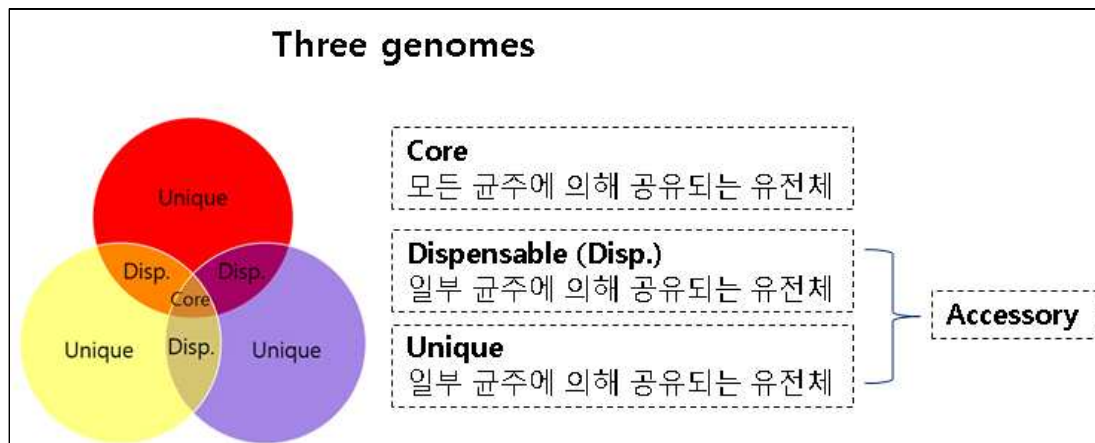
나. 주요 타겟 혈청형 균주에 대한 pan-genome 분석을 통한 특이 마커 진단

- (1) Next generation sequencing (NGS) 기술의 발달과 더불어 시퀀싱 비용 감소로 인해 discriminative power가 높은 whole genome sequencing (WGS)를 기반으로 하는 pan-genome 분석과 single nucleotide polymorphism (SNP) 분석 등을 통한 strain 동정, 병원성 분석 및 항생제 저항성 마커 분석 등의 연구들이 활발히 진행되고 있음. WGS 기반 분석 기술은 미생물의 일부 항원 부분 특징만을 반영하는 기존 gold-standard 분석법과 비교하여, 다양한 유전자에 대한 분석을 동시에 실시할 수 있다는 장점을 가지고 있으며, *Salmonella* 및 다른 장 병원균에 대한 역학 연구와 발생 모니터링 연구에서 그 과급효과가 충분히 입증되었음.
- (2) Pangenome은 Tettelin et al. (2005)에 의해 처음 개념이 발표되었으며, 한 종 (species)에 속한 대부분의 개체가 보유한 총 유전체로 정의됨. Pan-genome은 크게 open pan-genome과 closed pan-genome으로 분류됨. Open pan-genome은 다양한 미생물들이 존재하는 환경에 노출된 한 미생물종이, 다른 미생물 종들로부터 새로운 유전자들을 받아들여 끊임없이 pan-genome의 수가 증가하는 경우를 의미하며, 예로 장관계에 존재하는 *E. coli*를 들 수 있음. Closed pan-genome은 다른 미생물



<그림 33. Open pan-genome과 closed pan-genome (Vemikos et al. 2015)>  
 종에 대한 접근이 제한된 환경에서 새로운 유전자들을 받아들이지 않고 비교적 일정한 pan-genome 수를 유지하는 경우를 의미하며, 예로는 절대혐기성균인 *B. anthracis*를 들 수 있음 (Vemikos et al., 2015).

- (3) Pan-genome은 species 내 모든 균주에 의해 공유되는 유전자 집합인 핵심 유전체 (core genome)과 일부 균주에 의해 공유되는 유전체 (dispensable genome) 및 특정 species에서만 확인되는 유전체 (unique genome)들의 집합인 부속 유전체 (accessory genome)으로 구성됨.

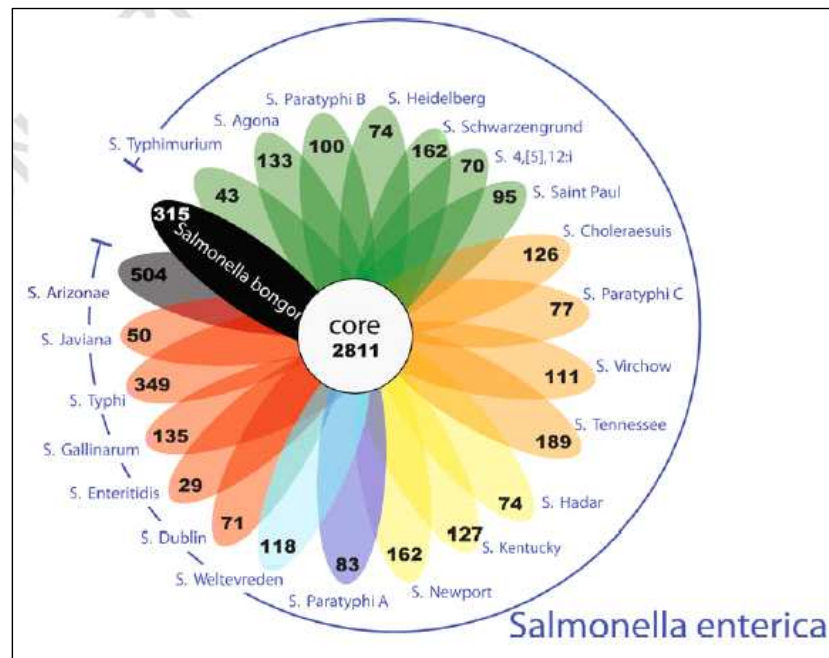


<그림 34. Core and accessory genes>

- (4) 일반적으로 core genome은 미생물의 기본적인 생물학적 특성과 주요 표현형 특성을 코딩하는 유전자들로 구성됨. Accessory genome은 미생물의 성장에 필수적이지는 않지만, 환경조건에서의 생존, 항생제 내성, 새로운 숙주에서의 집락화 등과 같이 생존에 영향을 줄 수 있는 부가적인 생화학적 특성을 코딩하는 유전자들로 구성됨. Accessory genome은 short repeated DNA sequence나

정상적이지 않은 G + C content로 이루어져 있는 경우가 많으며, phage나 transposon 등과 관련된 유전자 등을 포함하는 것으로 알려져 있음 (Medini et al. 2005).

- (5) 미생물의 다양성을 결정하는 유전체는 accessory genome로 알려짐. 따라서 Core genome에 속해있는 housekeeping gene의 variable region을 기반으로 하는 multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 분석과 multi-locus sequence typing (MLST) 분석을 이용한 미생물 혈청형 분석은, 미생물의 표면항원이나 병원성과 관련된 유전자들이 포함되어 미생물의 다양성에 영향을 미치는 accessory genome 기반 분석에 비해 혈청형 분석 정확도가 떨어지는 것이 확인되었음 (Medini et al. 2005).
- (6) Jacobsen et al. (2011)는 35개의 *Salmonella* 균주들의 pan-genome과 core-genome을 분석한 결과, 살모넬라 혈청형에 따라 pan-genome과 core-genome의 유전자 수의 증감이 각각 반대로 나오는 것을 확인하였음. 또한, *S. enterica*에 속하는 22가지 혈청형을 나타내는 균주와 *S. bongori*의 genome을 분석한 결과 2,811개의 core genes과 각 혈청형에 특이적인 unique genes의 유전자 수를 확인함.
- (7) 이 결과를 바탕으로 pan-genome 분석을 통해 각 혈청형에 특이적인 unique genes을 확인 후 그에 대한 마커를 제작하여 살모넬라 혈청형 동정에 적용가능성을 제시함.

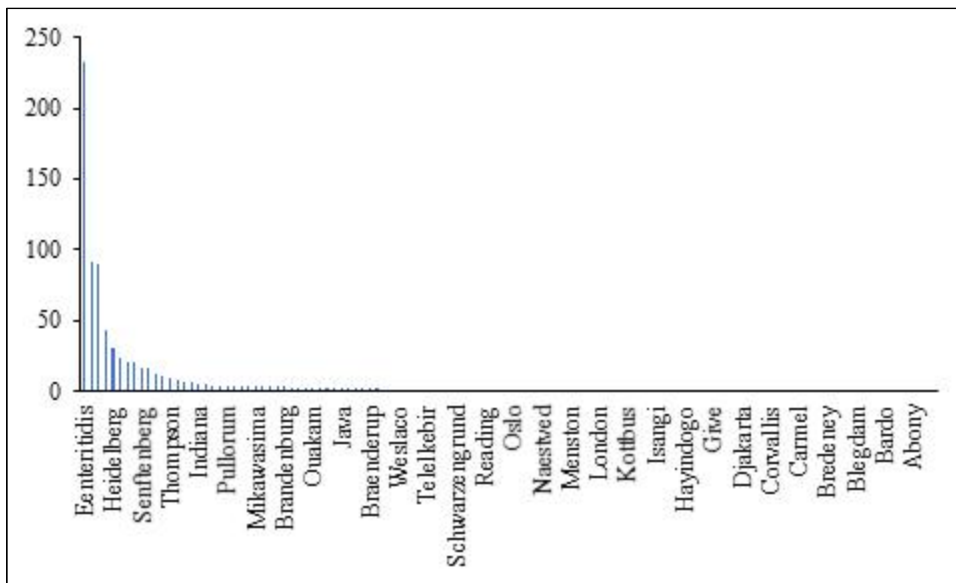


<그림 35. 살모넬라 혈청형에 따른 unique genes 및 core-genome의 크기 (Jacobsen et al., 2011)>

- (8) 본 과제를 통한 pan-genome 분석을 이용한 살모넬라 혈청형 특이 마커 분석 수행 : 최근에 들어서 완전전장유전체(WGS) 이용 가능한 수가 급격히 증가해지고 있으므로 이전에는 pan-genome 분석을 위한 자료가 부족하여 이러한 분석법을 이용할 수가 어려웠던 반면, 현재 이용 가능한 살모넬라균의 WGS 수와 매년 WGS의 수의 급속한 증가와 축적은 pan-genome 분석을 통해 각각의 살모넬라균에 대한

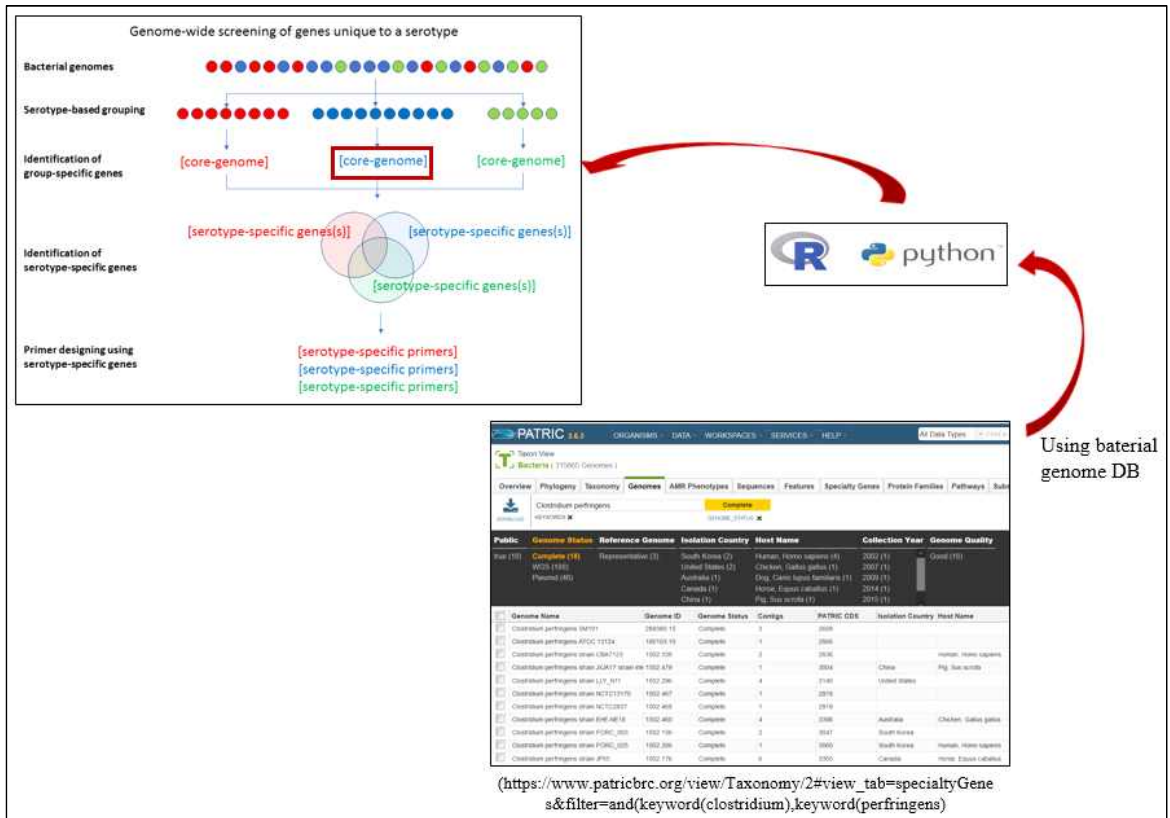
특이 유전자를 찾을 수 있는 적절한 시기라고 사료됨. 최근 식중독사고와 관련있는 살모넬라 혈청형을 포함한 대부분의 outbreak나 식품 및 인간유래 혈청형에 대한 WGS 자료를 보여주고 있음. 결론적으로 pan-genome 분석 결과의 민감도와 특이성을 높이기 위해서는 다양한 살모넬라 혈청형별 WGS의 수와 새로운 균주확보를 통해, 직접적 전장유전체해독을 통한 WGS에 대한 자료의 확보도 중요시 되고 있음. 본 과제에서는 two-step pangenome analysis를 통한 core gene group 분석을 아래와 같은 방법으로 연구 수행

- (가) 본 연구팀은 본 과제의 선행연구를 위해 PATRIC data로부터 수집된 *S. Enteritidis*를 포함하는 572개 살모넬라 WGS를 가지고 two-step pan-genome 분석을 실시하여 각 혈청형에 대한 core-genome을 추출하였음.



<그림 36. Two-step pan-genome에 사용된 살모넬라 혈청형별 WGS 수>

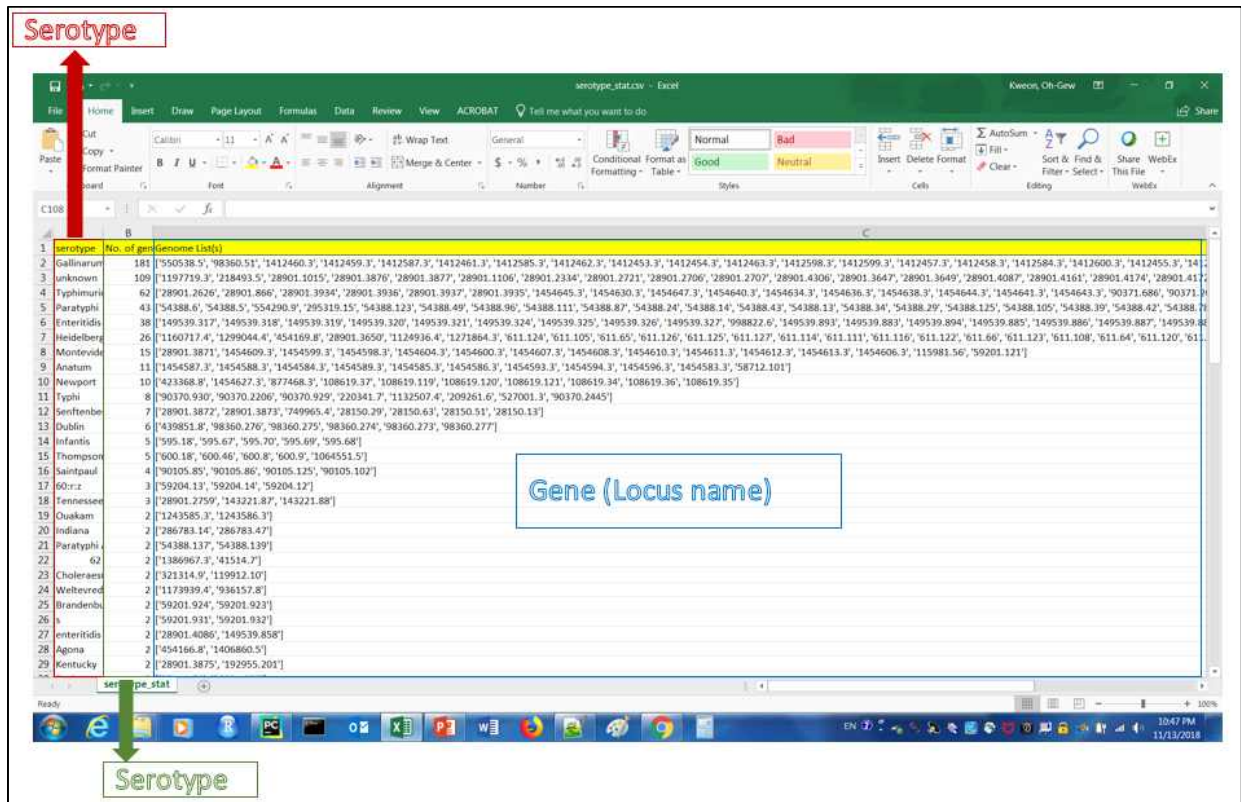
- (나) Two-step pan-genome분석 flowchart는 그림1에 제시되어 있으며, genome들을 이용해 혈청형별로 grouping 과정 excel 파일은 그림 2에 제시되어 있음.



<그림 37. Two-step pan-genome 분석 모식도>

(다) 아래와 같은 혈청형 및 strains의 complete genome sequence에 대한 library를 확보하였고, 다양한 *Salmonella* spp. 혈청형을 대상으로 two-step pangenome analysis를 실시하였음.





<그림 38. PATRIC database로부터 수집된 살모넬라 혈청형별 분류>

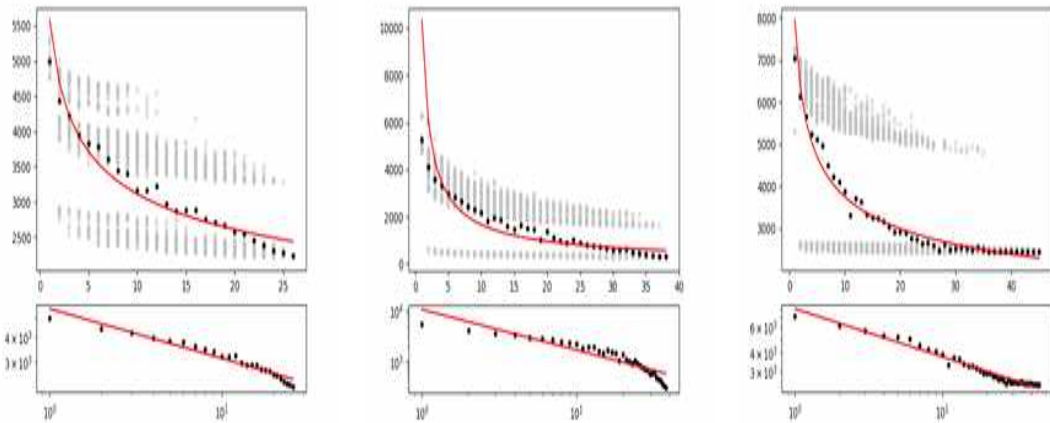
(라) 분석 결과 살모넬라 혈청형 그룹이 보유하고 있는 core gene과 unique gene이 이 확인됨.

(마) PATRIC database로부터 수집된 살모넬라 균주의 CGS들을 이용해서 pan-genome 분석을 실행함. 혈청형별 WGS 개수에 따라 S. Heidelberg 균주들의 개수가 늘어날수록 그 혈청 내 균주들이 가지고 있는 모든 유전자들(pan-genome)의 숫자는 지속적으로 증가하며 (open pan-genome), 반면에 core-genome은 지속적으로 감소함 (open core-genome). 따라서, 안정된 serotype-specific genes (즉, closed core-genome) 을 얻기 위해서는 혈청형내 충분한 수의 CGS가 필요하다는 것을 확인함.

<S. Heidelberg>

<S. Enteritidis>

<S. Paratyphi>



<그림 39. Core genome 분석을 통한 closed, open pan-genome 판단>

(마) S. Heidelberg의 core-genome 과는 달리 다른 두 혈청형의 core-genome 들은 거의 closed 되어 있음을 확인함.

(사) 컴퓨터 프로그래밍을 이용한 분석결과

: 살모넬라 주요 혈청형 (S. Enteritidis, S. Heidelberg, S. Paratyphi, S. Typhi, S. Typhimurium)과 그 외 혈청형을 함께 그룹으로 묶어서 분석한 결과 살모넬라 혈청형별 단일 또는 조합으로 검출할 수 있는 방법은 현재로서는 찾기가 어렵다는 것을 확인함. 특히, 살모넬라균들 간의 유전정보의 공유(genetic sharing)가 매우 높아 pan-genome 분석을 통해서도 완벽하게 살모넬라 혈청형별 특이 마커를 찾는 것이 상당히 복잡하다는 것을 확인함.

① 유전자 하나를 가지고 살모넬라 혈청형별 특이 마커 분석

| Serovar #       | Ordered locus names                       | Enteritidis | Heidelberg | Others | Paratyphi A | Typhi | Typhimurium | Diveristy(%) |
|-----------------|---|-------------|------------|--------|-------------|-------|-------------|--------------|
|                 |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Enteritidis 232 | (fig 1962639.4.peg.4227 NCTC7102_03938')  | (0)         | (1)        | (0)    | (-1)        | (-1)  | (0)         | 50           |
| Typhimurium 91  | (fig 1008297.7.peg.2899 UMN798_2919')     | (0)         | (-1)       | (0)    | (0)         | (1)   | (0)         | 50           |
| Typhi 90        | (fig 28901.3934.peg.2362 DLJ68_11670')    | (-1)        | (1)        | (0)    | (-1)        | (-1)  | (0)         | 50           |
| Paratyphi 43    | (fig 108619.36.peg.1755 A8180_08370')     | (-1)        | (1)        | (0)    | (-1)        | (1)   | (0)         | 50           |
| Heidelberg 30   | (fig 1132507.4.peg.4246 STBHUCCB_41920')  | (-1)        | (0)        | (0)    | (1)         | (1)   | (-1)        | 50           |
| 1,4,[5],12:- 24 | (fig 1077085.4.peg.2249 DZA58_11020')     | (0)         | (0)        | (0)    | (0)         | (-1)  | (1)         | 50           |
| Newport 21      | (fig 1008297.7.peg.3330 UMN798_3347')     | (0)         | (1)        | (0)    | (0)         | (-1)  | (0)         | 50           |
| Montevideo 20   | (fig 90370.2473.peg.2327 SM221186_02789') | (-1)        | (-1)       | (0)    | (0)         | (1)   | (0)         | 50           |
| Sentenberg 16   | (fig 1242107.3.peg.3446 LFZ25_16900')     | (-1)        | (0)        | (0)    | (1)         | (1)   | (0)         | 50           |
| Anatum 16       | (fig 1242098.3.peg.5063 LFZ16_24100')     | (0)         | (1)        | (0)    | (-1)        | (-1)  | (1)         | 50           |
| Agona 12        | (fig 28901.4167.peg.4251 CHE86_20885')    | (-1)        | (-1)       | (0)    | (0)         | (1)   | (-1)        | 50           |
| Infantis 10     |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Thompson 9      |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Dublin 8        |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Waltveden 7     |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Saintpaul 6     |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Indiana 5       |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Derby 5         |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Tennessee 4     |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Stanleyville 4  |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Pullorum 4      |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Mbandaka 4      |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Worthington 3   |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Typhimurium 3   |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Mikawasima 3    |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Kentucky 3      |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Johannesburg 3  |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Goldcoast 3     |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Brandenburg 3   |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Oranienburg 2   |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Braenderup 2    |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Bareilly 2      |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Poona 1         |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Paratyphi B 1   |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Javiana 1       |   |             |            |        |             |       |             |              |
| Berta 1         |   |             |            |        |             |       |             |              |

\* (-1: 이 유전자는 존재안 함), (0: 이 유전자가 존재할 수 도 안할 수도 있음), (1: 이 유전자가 반드시 존재함)

② 유전자 두 개 조합을 가지고 살모넬라 혈청형별 특이 마커 분석

With two genes

| Ordered locus names   | Enteritidis | Heidelberg | Others | Paratyphi A | Typhi    | Typhimurium | Diveristy(%) |
|---|-------------|------------|--------|-------------|----------|-------------|--------------|
| ('fig 1160769.22.peg.4788', 'fig 108619.36.peg.1755 A8180_08370')                 | (0, -1)     | (0, 1)     | (0, 0) | (1, -1)     | (1, 1)   | (1, 0)      | 100          |
| ('fig 1160769.22.peg.4788', 'fig 211968.26.peg.3996 DBZ76_019395')                | (0, -1)     | (0, 1)     | (0, 0) | (1, 1)      | (1, -1)  | (1, 0)      | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 28901.4167.peg.4251 CHE86_20885')     | (-1, -1)    | (1, -1)    | (0, 0) | (-1, 0)     | (-1, 1)  | (0, -1)     | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1081093.3.peg.1416 SPUL_1377')        | (-1, 0)     | (1, 0)     | (0, 0) | (-1, 1)     | (-1, -1) | (0, 1)      | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1132507.4.peg.1531')                  | (-1, 0)     | (1, -1)    | (0, 0) | (-1, -1)    | (-1, 1)  | (0, -1)     | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1271863.3.peg.983 CFSAN002050_06405') | (-1, 0)     | (1, 1)     | (0, 0) | (-1, 1)     | (-1, -1) | (0, 1)      | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1412471.3.peg.6380')                  | (-1, 0)     | (1, 0)     | (0, 0) | (-1, -1)    | (-1, 1)  | (0, -1)     | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1242088.3.peg.3214 LFZ5_15595')       | (-1, -1)    | (1, 0)     | (0, 0) | (-1, 0)     | (-1, 1)  | (0, -1)     | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1016998.12.peg.1000 SPAB_01059')      | (-1, 0)     | (1, 1)     | (0, 0) | (-1, -1)    | (-1, 1)  | (0, 1)      | 100          |
| ('fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670', 'fig 1271863.3.peg.75 CFSAN002050_01910')  | (-1, 0)     | (1, -1)    | (0, 0) | (-1, 1)     | (-1, -1) | (0, -1)     | 100          |

③ 유전자 세 개 조합을 가지고 살모넬라 혈청형별 특이 마커 분석

With three genes

| ORF/ordered locus names  | Enteritidis | Heidelberg | Others    | Paratyphi A | Typhi      | Typhimurium | Diveristy(%) |
|--|-------------|------------|-----------|-------------|------------|-------------|--------------|
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1008297.7.peg.4434 UMN798_4469', 'fig 1132507.4.peg.4246 STBHUCB_4192')    | (0, 0, -1)  | (1, 1, 0)  | (0, 1, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1008297.7.peg.4434 UMN798_4469', 'fig 1242098.3.peg.5063 LFZ16_24100')     | (0, 0, 0)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, 0) | (0, 1, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 1, 1)   | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1008297.7.peg.4434 UMN798_4469', 'fig 28144.233.peg.3042')                 | (0, 0, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 1, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1008297.7.peg.4434 UMN798_4469', 'fig 1077085.4.peg.122')                  | (0, 0, 0)   | (1, 1, 0)  | (0, 1, 0) | (0, 1, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 1, 1)   | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1008297.7.peg.4434 UMN798_4469', 'fig 286783.14.peg.1495')                 | (0, 0, 0)   | (1, 1, -1) | (0, 1, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1008297.7.peg.4434 UMN798_4469', 'fig 108619.119.peg.1231 ABT64_05475')    | (0, 0, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 1, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 0)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 28901.3934.peg.2362 DL68_11670')  | (0, 0, -1)  | (1, 1, 1)  | (0, 0, 0) | (0, 1, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 1, 0)   | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 1132507.4.peg.4246 STBHUCB_41')   | (0, 0, -1)  | (1, 1, 0)  | (0, 0, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 1242107.3.peg.3446 LFZ25_16900')  | (0, 0, -1)  | (1, 1, 0)  | (0, 0, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, 0)   | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 28901.4167.peg.4251 CHE86_2088')  | (0, 0, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 0, 0) | (0, 1, 0)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 1008297.7.peg.854 UMN798_0870')   | (0, 0, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 0, 0) | (0, 1, -1)  | (1, 1, 1)  | (0, 1, 0)   | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 28144.233.peg.3042')              | (0, 0, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 0, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, -1)  | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 211968.26.peg.3996 DBZ76_019395') | (0, 0, -1)  | (1, 1, 1)  | (0, 0, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, -1) | (0, 1, 0)   | 100          |
| ('fig 1008297.7.peg.4291 UMN798_4332', 'fig 1173939.4.peg.2458 SEEW1655_11650', 'fig 115981.98.peg.820')               | (0, 0, -1)  | (1, 1, -1) | (0, 0, 0) | (0, 1, 1)   | (1, 1, 1)  | (0, 1, 0)   | 100          |

다. 살모넬라 주요 혈청형 동정 real-time PCR 신속 검출법 개발


: 따라서, 살모넬라 pangenome 분석을 통해 살모넬라균 특이 마커를 개발할 것으로 기대하였으나 2,600개 이상의 다양한 혈청형에 따른 살모넬라균 혈청형별 특이 마커는 유전자의 genetic sharing (유전정보 공유)이 높아 살모넬라 혈청형별 특이 마커는 pangenome 분석을 통해서서는 어려울 것으로 판단되어 본 팀에서 이전 개발한 살모넬라균 및 그룹D 특이 유전자 서열을 이용한 특수동결형 병원성세균 살모넬라 그룹 D 신속 검출용 PCR 키트를 개발하였음.

표 19. 살모넬라 그룹 D 검출용 키트의 유전적 염기서열

| Target gene | Primer name         | Sequence                 |
|-------------|---------------------|--------------------------|
| <i>sefA</i> | <i>Sal D sefA F</i> | GGCTTCGGTATCTGGTGGTGTA   |
| <i>sefA</i> | <i>Sal D sefA R</i> | GGTCATTAATATTGGCCCTGAATA |
| <i>ttr</i>  | <i>Sal spp F</i>    | CTCACCAGGACATTACAACATGG  |
| <i>ttr</i>  | <i>Sal spp R</i>    | AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC |

- (1) 특수동결형 병원성세균 살모넬라 그룹 D 신속 검출용 PCR 키트 개발의 필요성
- (가) 2018년 전 세계 식품검사 시장은 약 17조원으로 보고됨(미국 markets and markets 조사 결과).
  - (나) 식중독사고의 지속적인 증가로 식중독세균의 신속검사법의 수요가 기하급수적으로 증가하고 있음.
  - (다) 최근 최저임금 상승으로 인한 인건비용의 급상승하여 자동화-키트화된 식중독세균 검출법의 수요가 급증하고 있는 추세임.
  - (라) 식중독세균의 신속검출법으로 PCR법이 가장 우수하다고 인정은 되나 PCR 시약은 액체 형태로 보관 유통되기 때문에 5℃ 이하로 유지하기 위해서는 아이스팩 등을 운반용기에 함께 넣어야하고 냉장고에 보관하지 않으면 안되는 번거로움으로 인해 가격 경쟁력이 떨어짐.
  - (마) 특히, PCR 시약의 주요 물질인 Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, primers, probe 등을 시험자가 각각 주입해야하는 번거로움으로 인해 시료준비 시간, 노동력의 손실 뿐만아니라 실험 오류의 주요 원인으로 대두됨.
  - (바) 최근, 국내 PCR 키트에 적용사례가 없는 특수동결건조형의 PCR 키트 제품이 선진국 시장을 중심으로 각광을 받고 있음.
  - (사) 가급에 있어서 주요 관심 혈청형은 그룹 D에 속하는 *S. Enteritidis*와 *S. Gallinarum*이며 생산단계에서의 신속한 검출에 대한 요구가 증가하고 있음.
  - (아) 따라서 본 연구팀의 특수동결건조형의 PCR 제품을 통해 기존 제품과의 민감도와 특이도에 대한 성능 평가를 실시함.
- (2) 기존기술(제품)과의 독창성 및 차별성

<시중 판매되고 있는 PCR Kit의 구성 예시>

|       |  |
|-------|--|
| 업체명   | <b>BIONEER</b>   |
| 제품명   | <b>AccuPower<sup>®</sup> Salmonella spp. 3-Plex PCR kit</b>  |
| 제품 사진 |    |
| 제품 구성 | <p>AccuPower<sup>®</sup> Salmonella spp. 3-Plex PCR PreMix-- ----- 96tubes<br/>         Positive control DNA ----- 1tube<br/>         Size marker----- 1tube<br/>         D.W----- 2tubes</p> <hr/> <p style="text-align: center;"><b>Components</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;">Top DNA polymerase<br/>         dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)<br/>         Reaction Buffer, with MgCl<sub>2</sub><br/>         Stabilizer and tracking dye<br/>         8-Mop (dissolved in DMSO)<br/>         Primers for InvA, SC and ST</p> <hr/> |



|              |  |
|--------------|--|
| <b>사용방법</b>  | <p><b>1. DNA Preparation</b></p> <p>- DNA extraction kit (k-3032) 또는 선택배지에 배양시킨 Colony 를 Boiling extraction 방법을 사용하여 DNA를 추출한다.</p> <p><b>2. Amplification</b></p> <p>- Template DNA와 3차 증류수 (D.W)를 준비한다.<br/> - AccuPower® Salmonella spp. 3-Plex PCR premix tube에 3차 증류수 18 ~ 16 (ul)를 넣는다(건조된 pellet의 양은 계산하지 않는다).<br/> - 그 다음, AccuPower® Salmonella spp. 3-Plex PCR premix tube에 template DNA 2 ~ 4 (ul)를 넣는다.<br/> - Lyophilized green pellet이 잘 섞이도록 2 ~ 3분 vortex한 뒤, spin down시 킨다.<br/> - PCR 반응 후 계속해서 15 ~ 20℃에서 반응을 유지시키거나 PCR 반응샘플은 -20℃에서 사용 전까지 보관한다.</p> <p><b>3. Detection of Amplified Products</b></p> <p>- Agarose (Bioneer)를 0.5X TBE buffer (Bioneer)에 녹여 Et-Br (0.5~1.0 µg/mL)을 첨가하여 1.5 ~ 2% agarose gel 을 준비한다.<br/> - 각각 Size marker와 PCR 산물을 3 ~ 5 ul 정도 agarose gel에 loading한다.<br/> - AgaroPower™ (Bioneer)에서 high voltage(150v)에서, 약 30~40분 간 전기영동을 한다.<br/> - Ultra-violet (UV) transilluminator로 결과를 확인한다.</p> |
| <b>보관 온도</b> | <b>-20℃에서 2년의 유효기간 보장.</b>   |

출처 : 바이오니아 웹사이트

- 현재 국내 제품 단점:

- PCR premix가 액체 형태로 되어 있어 상온보관이 불가능
- 최소 4개 이상의 tube에 시약을 따로 보관함
- Conventional PCR법으로 검사결과 확인까지 장시간 소요됨
- -20℃에서 보관해야만 2년의 유효기간을 보장할 수 있음

<시중 판매되고 있는 PCR Kit의 구성 예시 - 외국 제품>

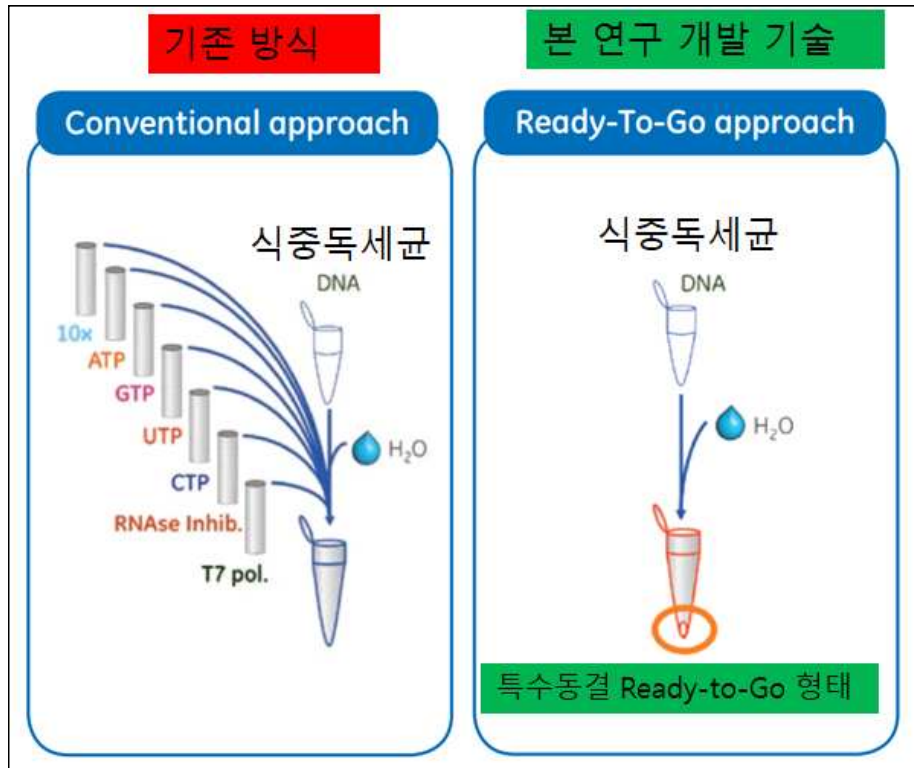
|              |  |
|--------------|--|
| <b>업체명</b>   |  |
| <b>제품명</b>   | High Fidelity PCR EcoDry™ Premix (Code 639280)                                       |
| <b>제조국가</b>  | <b>일본</b>  |
| <b>제품 사진</b> |  |
| <b>제품 구성</b> |  |

|                     |  |
|---------------------|--|
|                     | <p>Always store any unused product at 20–22°C, either (1) back in the original foil pouch, re-sealed with desiccant; or (2) in a desiccator.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• High Fidelity PCR EcoDry Premix 8-tube strips</li> <li>• <b>NOTE:</b> Each tube contains lyophilized master mix with the following components:</li> <li>• Advantage® 2 DNA Polymerase Mix (includes a hot start antibody and a proofreading enzyme)</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> (2 mM final conc.)</li> <li>• dNTP Mix</li> <li>• Reaction Buffer</li> <li>• Cryoprotectant</li> <li>• Stabilizers</li> <li>• Optically Clear Cap Strips (8 caps/strip)</li> </ul>   |
| <p><b>제품 특징</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 동결건조 타입의 PCR mastermix</li> <li>• 실온 보존 가능</li> <li>• 프라이머, 주형, H<sub>2</sub>O만 넣으면 곧바로 PCR 적용 가능</li> <li>• 프리미엄 효소 혼합: Advantage 2 DNA Polymerase를 기반으로 혼합된 PCR 효소</li> </ul> <p>- High Fidelity PCR EcoDry Premix는 간편하게 PCR을 수행할 수 있는 동결 건조 타입의 PCR mastermix 이다. 각 tube에는 동결 건조된 Advantage 2 DNA Polymerase Mix, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>와 PCR 버퍼가 포함되어 있어, 프라이머와 주형 그리고 H<sub>2</sub>O만 첨가하면곧바로 PCR 반응을 실시할 수 있다.</p> <p>- 실온 보존이 가능한 제품으로 운반이나 보존시 냉동, 냉장이 필요 없는 환경 친화적인 제품이다. 이와 함께 mastermix 제품이라 반응액 조제 시간을 절약할 수 있으며 오염이나 피펫팅 에러를 줄일 수 있다. 8-strip tube에 분주되어 있어 필요한 만큼 분리해 사용할 수 있다.</p> <p>- 본 제품은 Hotstart용 Taq Start Antibody를 포함하는 TITANIUM Taq DNA Polymerase와 proofreading 활성을 갖고 있는 효소가 혼합된 Advantage 2 DNA Polymerase Mix로서 Taq Polymerase보다 정확성이 높고 보다 길게 PCR 증폭을 할 수 있다. 이와 같은 특징으로 cDNA library 제작이나 클로닝, 그리고 정확한 PCR 증폭을 요하는 PCR 실험에 적용할 수 있다.</p>  |
| <p><b>사용방법</b></p>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Assemble a Primer/Template Mix<br/>Each tube of High Fidelity PCR EcoDry Premix requires the addition of PCR-grade water, primers, and/or template in a total volume of 25 µl. Assemble a mix containing water, primers and/or template with volume sufficient for the number of PCR reactions you plan to perform, plus an additional reaction to compensate for pipetting errors.</li> <li>2. Reconstitute the Premix       <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Pipette 25 µl of the primer/template mix into each tube.</li> <li>b. Pipette up and down several times to dissolve each pellet, then cap the tubes.</li> <li>c. Briefly spin the tubes in a microcentrifuge, and begin thermal cycling using the guidelines provided below.</li> </ol> </li> <li>3. Recommended Cycling Parameters<br/>Use the following guidelines when setting up your initial experiments. These are general guidelines—the optimal parameters may vary.</li> </ol> |
| <p><b>보관 온도</b></p> | <p>실온 (20~22°C : 데시케이터에서 보존)</p>   |

- 장점: 동결건조형
- 단점: 아직도 프라이머를 별도로 추가하여야하고 실온 보관은 가능하나 데시케이터에 보존해야하는 단점을 해결하지 못함

(3) 본팀이 개발하고자 하는 24개월 상온 보관이 가능한 특수동결건조형 PCR키트

: 국제특허를 확보하고 있는 GE Healthcare의 특수동결건조용 부형제(excipient)를 사용하여 PCR 반응에 필요한 프라이머/프로브, 폴리머라제 효소, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, 버퍼, 기타 내재 반응 대조물질(IAC, internal amplification control)를 PCR 튜브에 모두 혼합한 뒤 동결건조하여 타겟 식중독세균의 DNA만 추출하여 준비한 후 혼합하여 용해시킨 후 PCR 기기에 장착시켜 반응을 바로 시작할 수 있는 간편 PCR키트를 개발함 (아래 그림 참고)



<96-well 형태의 Ready-To-Go 키트 예시>



<본 연구 개발 특수동결건조형 Ready-To-Go기술의 장점>

|              |              |
|--------------|--------------|
| 제조사 측면에서의 이점 | 사용자 측면에서의 이점 |
|--------------|--------------|

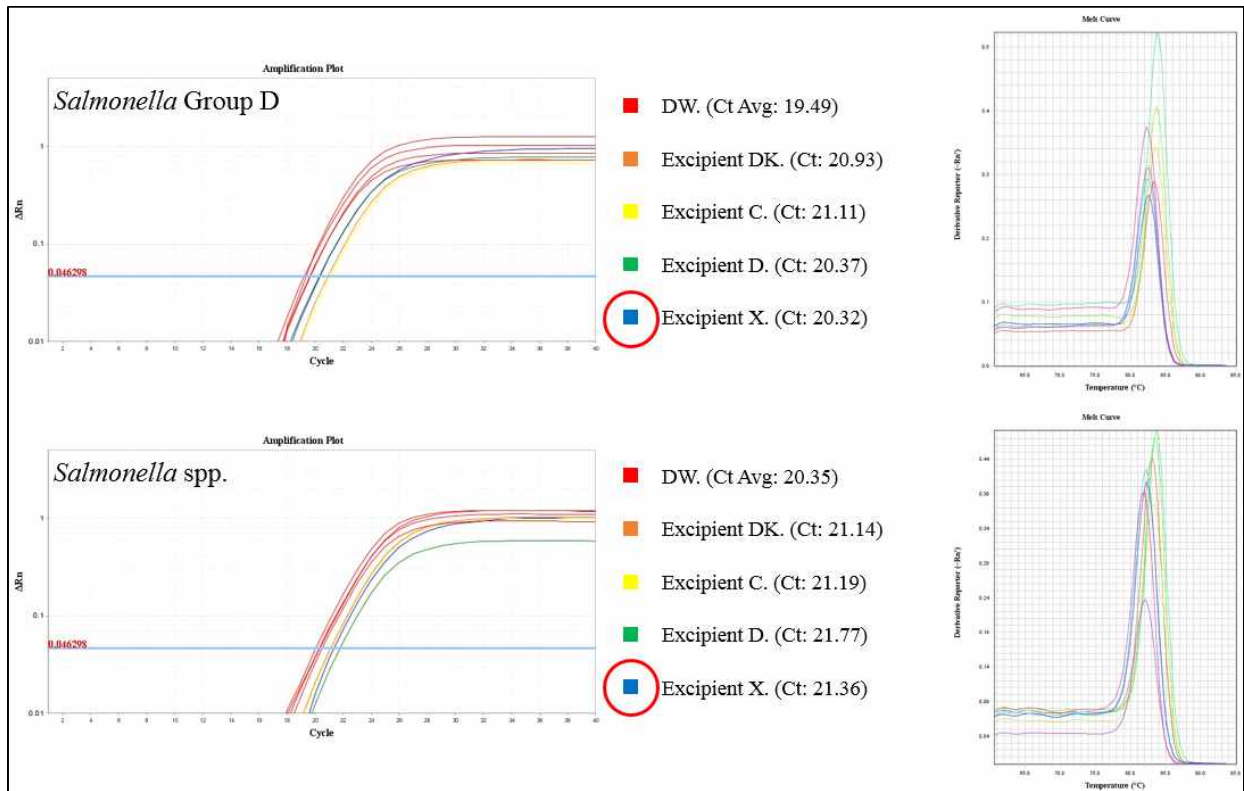
|                       |   |   |
|-----------------------|---|---|
| 분석 시약의 안정화            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 상온에서 2년간 안정</li> <li>• 민감한 효소 및 마스터믹스 구성품을 포함한 복합 혼합물에 적합</li> <li>• 맞춤 제작 가능</li> </ul>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 상온에서 2년간 안정</li> </ul>   |
| 단순화, 선분주, 1회용량 시약     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 교육 간소화</li> <li>• 다운스트림 애플리케이션과의 호환 및 자동화 가능</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 교육 간소화</li> <li>• 다운스트림 애플리케이션과의 호환 및 자동화 가능</li> <li>• 피펫팅 단계 감소로 교차 오염 위험 감소 및 데이터 신뢰성 향상 및 전반적인 검사 품질 개선</li> </ul> |
| 배송시 건조 또는 얼음이 필요하지 않음 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 국가 간 배송 간소화 및 예상치 못한 지연 방지</li> <li>• 먼 지역에 대한 접근성 향상</li> <li>• 큰 비용 절감</li> <li>• 친환경</li> </ul>     |   |
| 보관시 냉장이나 냉동이 필요하지 않음  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 재고 관리 간소화</li> <li>• 저장공간 및 비용 절감</li> <li>• 에너지 소비 감소</li> <li>• 새로운 시장 개척 및 신규 소비자층 탐색 가능</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 재고 관리 간소화</li> <li>• 저장공간 및 비용 절감</li> <li>• 에너지 소비 감소</li> <li>• 지역 내 또는 인근 환자를 위한 애플리케이션 제공</li> </ul>               |

#### (4) 특수동결형 PCR 키트 시약의 성능 평가

##### (가) 민감도 및 특이도 평가

: 기존의 제품 (DW)과 현재 특수동결을 위해 개발 중인 다양한 부형제 (C, D, DK, X)에 대한 제품에 대해 살모넬라 그룹 D의 균들의 민감도와 특이도에 대한 자료는 아래의 그림에 나타남. 개발 제품에 의한 살모넬라균 및 살모넬라 그룹 D 균들에 대한 qPCR 자료에서는 약 20.3~21.1의 Ct value를 보여주고 있으므로 매우 제품의 성능은 매우 우수하다는 것을 보여주고 있음.





(나) 보관 온도에 따른 검출 능력 평가

: 기존의 제품과의 비교평가를 위한 보관 및 온도에 따른 검출 능력에 대한 평가가 현재 진행 중이므로 이번 보고서에서는 이에 대한 자료를 첨부하지 못함.

라. 시제품 개발 및 현장적용 검증

: 보관 온도에 따른 평가 후 현장적용 평가 및 검증 실시 예정.

#### 4. 주요 혈청형 살모넬라 분리주 특성 분석

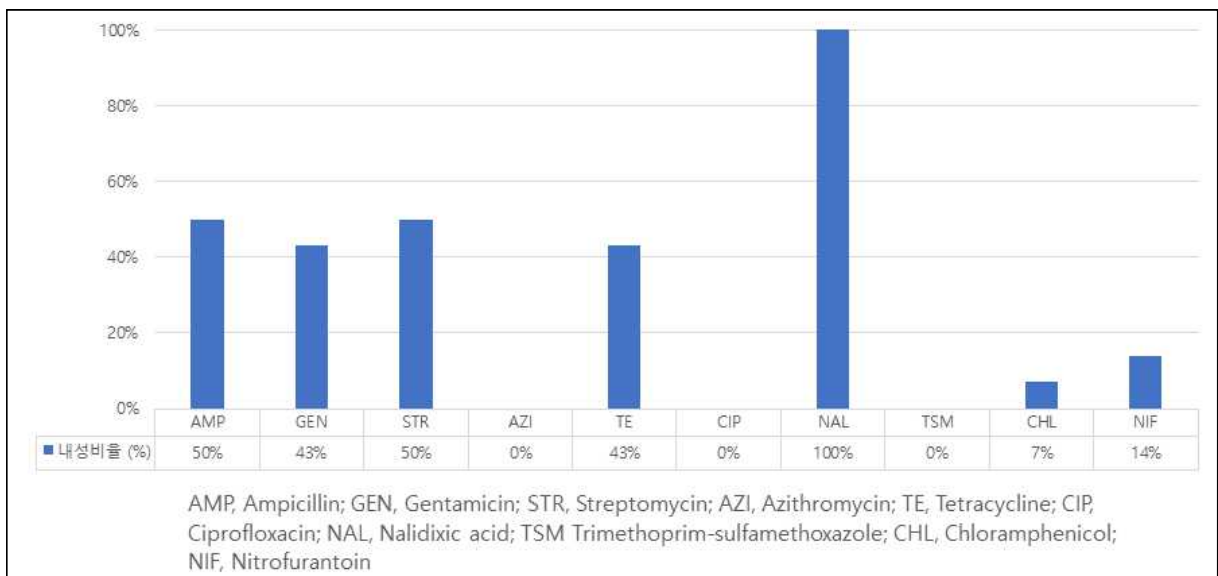
가. 병원성 유전자 분포 및 항생제 내성 프로파일링 분석

(1) 항생제 내성 프로파일링

<살모넬라 분리 및 혈청형 분석, 총 샘플 수 n=81>

| 샘플링 장소   | 축종     | 시료(n)      | 형질형 결과      | 검출률(%)       |
|----------|--------|------------|-------------|--------------|
| 농장       | 닭      | 총배설강(10)   | Westhampton | 9/10(90)     |
|          |        |            | Montevideo  | 1/10(10)     |
| 분변(3)    |        | Agona      | 3/3(100)    |              |
|          |        | Montevideo | 2/10(20)    |              |
| 임상시료     |        | 총배설강(10)   | Westhampton | 7/10(70)     |
|          |        |            | Enteritidis | 1/10(10)     |
|          |        |            | Enteritidis | 3/3(100)     |
| 도축장      |        | 분변(7)      | Enteritidis | 4/7(57.14)   |
|          |        |            | Typhimurium | 2/7(28.57)   |
|          |        |            | Albany      | 1/7(14.29)   |
|          | 도체(34) |            | Albany      | 7/34(20.59)  |
|          |        |            | Kentucky    | 4/34(11.76)  |
|          |        |            | Enteritidis | 15/34(44.12) |
|          |        |            | Virchow     | 8/34(23.53)  |
|          | 소      | 도체(2)      | Albany      | 2/2(100)     |
|          |        | 돼지         | 분변(6)       | Typhimurium  |
|          | 도체(6)  |            | Typhimurium | 2/6(33.33)   |
| Takoradi |        |            | 4/6(66.67)  |              |

- (가) 국내 경기, 충북, 충남, 전북, 전남, 제주 지역에 위치한 가금류 작업장 샘플에서 분리한 *S. Enteritidis* 14주와 *S. Typhimurium* 5주에 대해 WGS를 통해 병원성 유전자 및 항생제 내성 프로파일링 분석을 진행하였음.
- (나) *S. Enteritidis* 균주에 대한 항생제 내성 프로파일링 결과, 50%의 균주에서 3가지 이상 항생제 class에 내성을 보이는 다제내성 (Multidrug resistance, MDR)이 확인되었음. 모든 *S. Enteritidis* 균주에서 퀴놀론 계열 항생제인 Nalidixic acid에 내성이 확인되었으며, Ampicillin (50%), Streptomycin (50%), Gentamycin (43%), Tetracycline (43%)의 내성률이 확인되었음.
- (다) *S. Typhimurium* 균주의 경우, 테스트한 항생제에 대하여 모두 감수성을 가지는 것이 확인되었음.



<그림 40. *S. Enteritidis*의 항생제 내성 비율>

(2) 병원성 유전자 프로파일링

: Capsule, Fimbrial adherence determinants, Macrophage inducible genes, Magnesium uptake, Nonfimbrial adherence determinants, Regulation, Secretion system, Serum resistance, Spv locus, Stress adaptation, Toxin, Invasion, Adherence와 관련된 36가지 병원성 유전자에 대한 프로파일링을 진행하였음. *S. Enteritidis*의 경우, Typhoid toxin과 Capsule과 관련된 Vi antigen을 제외하고 거의 모든 병원성 유전자를 보유하고 있는 것이 확인되었음. *S. Typhimurium*의 경우, *S. Enteritidis*와 비슷한 양상이 확인되었으며, Typhoid toxin, Vi antigen, LPS O-antigen을 제외한 거의 모든 병원성 유전자를 보유하고 있는 것이 확인되었음.

표 20. *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium* 분리주의 병원성 유전자 로파일링

| VF class                        | Virulence factors                            | Prevalence (%) |                |
|---------------------------------|--|----------------|----------------|
|                                 |  | S. Enteritidis | S. Typhimurium |
| Capsule                         | Vi antigen                                   | 0              | 0              |
| Fimbrial adherence determinants | Agf/Csg                                      | 100            | 100            |
|                                 | Bcf  | 100            | 100            |
|                                 | Fim  | 100            | 100            |
|                                 | Lpf  | 100            | 100            |
|                                 | Pef  | 100            | 100            |
|                                 | Peg  | 100            | 0              |
|                                 | Saf  | 100            | 100            |
|                                 | Sef  | 100            | 0              |
|                                 | Sta  | 0              | 0              |
|                                 | Stb  | 100            | 100            |
|                                 | Stc  | 7.1            | 100            |
|                                 | Std  | 100            | 100            |
|                                 | Ste  | 100            | 0              |
|                                 | Stf  | 100            | 100            |
|                                 | Stg  | 0              | 0              |
|                                 | Sth  | 100            | 100            |
|                                 | Sti  | 100            | 100            |
| Stk                             | 7.1  | 0              |                |
| Tcf                             | 0  | 0              |                |
| Macrophage inducible genes      | Mig-14                                       | 100            | 100            |
| Magnesium uptake                | Mg <sup>2+</sup> transport                   | 100            | 100            |
| Nonfimbrial adherence           | MisL   | 100            | 100            |
| Regulation                      | PhoPQ  | 100            | 100            |
| Secretion system                | TTSS (SPI-1 encode)                          | 100            | 100            |
|                                 | TTSS (SPI-2 encode)                          | 100            | 100            |
|                                 | TTSS effectors translocated via both systems | 100            | 100            |
|                                 | TTSS-1 translocated effectors                | 100            | 100            |
|                                 | TTSS-2 translocated effectors                | 100            | 100            |
|                                 | ACE T6SS (Escherichia)                       | 100            | 0              |
| Serum resistance                | Rck  | 100            | 100            |
| Spv locus                       | Spv  | 100            | 100            |
| Stress adaptation               | SodCI  | 100            | 100            |
| Toxin                           | Typhoid toxin                                | 0              | 0              |
| Invasion                        | Invasin A (Yersinia)                         | 21.4           | 100            |
| Adherence                       | LPSO-antigen (P.aeruginosa)                  | 92.9           | 0              |

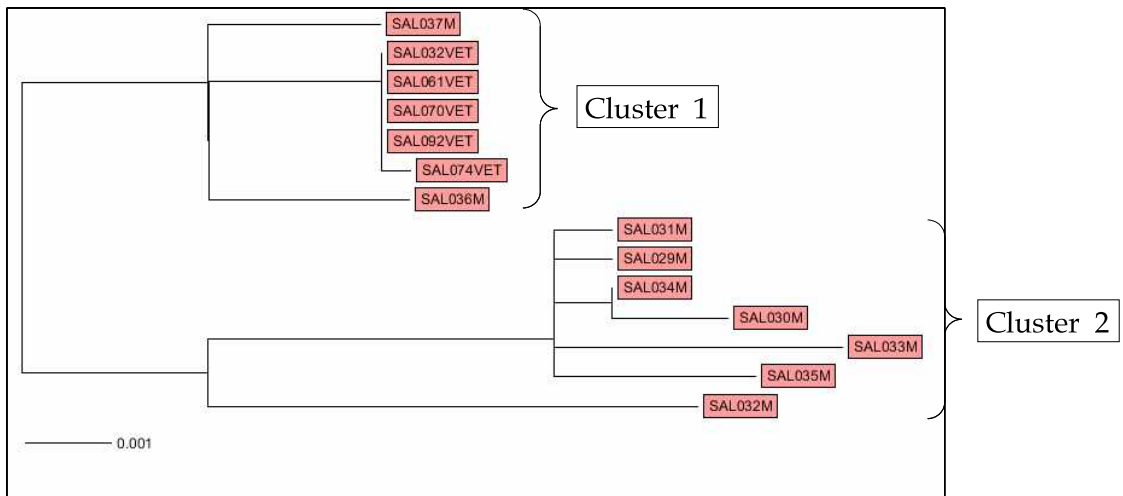
나. OIE 살모넬라 표준 실험실과 Data 상호교류를 통한 분자역학적 특성분석

(1) 주요 혈청형 genotyping을 통한 살모넬라 오염원 추적

: 살모넬라 분리주들에 대하여 WGS를 기반으로한 Multilocus sequence typing (MLST)을 분석한 결과, *S. Enteritidis* 균주는 모두 MLST ST-11로 확인되었으며, *S. Typhimurium* 균주는 모두 ST-19로 확인되었음.

(2) 지역별, 사육형태별, 농장별 분리 균주의 유전적 근연관계 조사

: 지역별 살모넬라 분리주간 유전적 근연관계를 분석하기 위해, WGS를 통해 core genome MLST (cgMLST) 기반의 cluster 분석을 실시하였음. 그 결과, 같은 지역에서 분리된 isolate간 phylogenetic distance가 가까운 것이 확인되었음. *S. Enteritidis*의 경우, phylogenetic distance를 기준으로 2개의 clustering이 확인되었으며, 경기, 충남, 제주지역 유래 isolate가 cluster 1에 포함되었고, 충북, 충남, 전남 지역 유래 isolate가 cluster 2에 포함되었음. *S. Typhimurium*의 경우 모두 경기 지역 유래균주로, 한 균주를 제외하고 모두 phylogenetic distance가 매우 가까운 것이 확인되었음.



<그림 41. cgMLST를 기반으로 분석한 *S. Enteritidis* 분리주 간의 유전적 연관성>



<그림 42. cgMLST를 기반으로 분석한 *S. Typhimurium* 분리주 간의 유전적 연관성>

5. 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화 (협동연구기관: (주)카브)

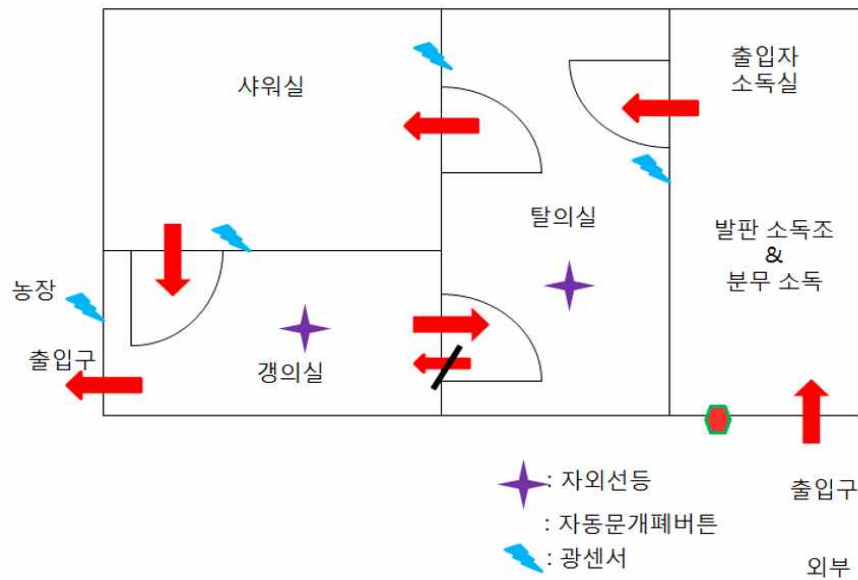
가. 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP를 도출

(1) 살모넬라 부재 사육 계열화 회사 모니터링 및 대응방법을 조사함.

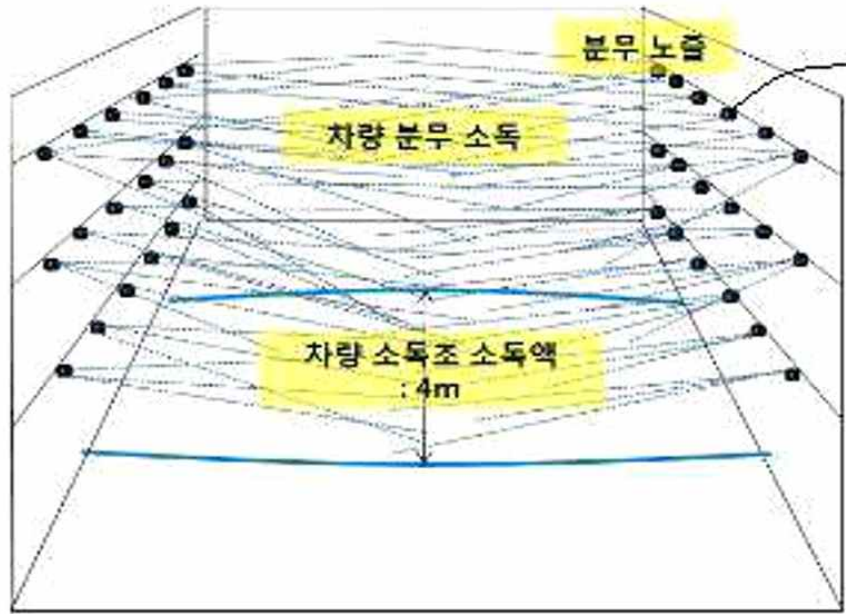
(가) 살모넬라 부재 사육 계열화 회사의 경우 일반적인 사육 농가와 유사한 백신

프로그램을 사용하며, 식중독 균인 S. Enteritidis 또는 S. Typhimurium이 아닌 S. gallinarum에 대한 SG9R 백신 프로그램을 사용하고 있었음

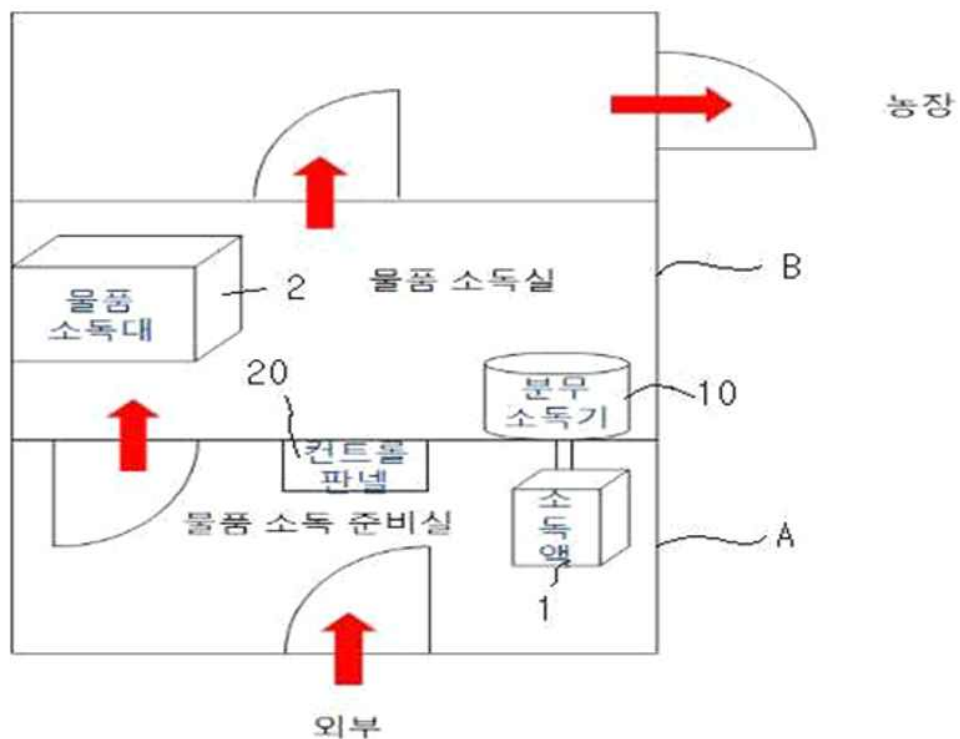
- (나) 반면 농장에 출입하는 사람, 차량 및 반입되는 물품에 대해 차단방역이 높은 수준으로 유지되고 있어, 유입확률이 낮게 예상됨. 사람의 경우 탈의실-샤워실-갱의실을 거쳐야만 농장 내 출입이 가능했으며, 일방향으로만 출입할 수 있게 만들어 차단방역을 강조함. 차량 소독시설의 경우 차량의 바퀴가 모두 침지되도록 4m의 소독조를 만들어 외부의 감염원이 농장 내로 들어오는 것을 막았으며, 물품도 소독 경로를 통해야만 농장 내로 들어올 수 있도록 시설을 갖추
- (다) 이외에도 지속적인 항원 및 혈청 모니터링을 통해 질병 유입에 대해 감시하고, 적극적으로 능동적인 대처를 통해 사전 예방에 노력함.
- (라) 이번 조사에서는 일반 산란계 사육 농가에서 살모넬라가 검출되지 않았지만, 차단방역 등이 충분히 이뤄지지 않을 경우 살모넬라의 유입 가능성은 지속적으로 높게 유지되고 있어, 차단방역 강화 및 양계 산업에 큰 피해를 주는 SG 이외에도 SE 및 ST에 대한 백신이 필요할 것으로 생각됨. 복지 농장에 대해서는 백신 프로그램이 일반 산란계 사육 농가에 비해 미비하여 전반적인 백신 프로그램을 적용할 필요성이 높음.
- (마) 육계의 경우, 생산주기가 짧아 개체에 대한 백신이 힘들며 환경에의 살모넬라 수를 줄일 수 있도록 차단방역의 개선 및 유산균 등 억제제의 적용이 효과적일 것으로 판단됨



<그림 43. 살모넬라 부재 사육 계열화 회사 내 사람 출입 경로>



<그림 44. 살모넬라 부재 사육 계열화 회사 내 차량 소독 시설>



<그림 45. 살모넬라 부재 사육 계열화 회사 내 물품 소독 및 반입 과정>

나. 살모넬라 모니터링 샘플 및 모니터링 횟수에 따른 살모넬라 조사율 및 오염원 파악 가능 여부 분석을 실시함.

- (1) 현재 국내 HACCP 기준의 경우, 유럽 기준에 비해 사육두수 당 검사 시료수가 적고 모니터링 기간 및 횟수에 대한 기준이 명확치 않음

- (2) 살모넬라 모니터링 프로그램 개선을 통해, 현재 농가 내 살모넬라 혈중 항체를 통한 감염 여부 판단법을 항원 검사 방법으로의 교체를 실시하고 다양한 환경 내 모니터링을 주기적으로 실시함으로써 오염원에 대한 조사가 필요함.
- (3) 또한 최근 떠오르고 있는 전장유전체 분석을 통해 기존 분리 살모넬라 및 신규 분리 살모넬라에 대한 근연관계를 분석함으로써 살모넬라의 유래 및 오염경로에 대한 추가적인 판단이 이뤄져야할 것으로 판단됨.
- (4) 이외에도 시설과 관리에 대한 SOP만이 강조되어 있어 사전관리 항목에 대해서는 강조가 되고 있지만, 살모넬라와 같은 유해항목에 대한 재현성 있는 사후관리 방안이 부재되어 있어 이를 개선할 필요성이 높음
- (5) HACCP 인증제 개선 및 복지농장 인증과 마찬가지로 식중독균인 살모넬라 무검출 인증 제도를 도입하여 지속적인 모니터링을 실시할 경우, 오염원에 대한 파악이 가능할 것으로 예상됨

#### 다. 살모넬라 저감화 방법을 위한 방역 SOP 작성

##### (1) 차단 방역 개요

- (가) 차단방역이란 닭이나 돼지 등 가축에 질병 원인체의 유입과 전파를 방지하기 위한 일련의 작업을 의미함
- (나) 다양한 원인체 중 식중독의 최대 원인체로 손꼽히고 있는 살모넬라에 대한 차단방역 기술
- (다) 사육시설과 외부환경 및 청정구역과 오염구역을 설정함으로써 물리적인 경계선 확립
- (라) 질병전파에 원인이 되는 매개체를 설정하여 해당되는 매개체마다 관리에 필요한 방법 제시
- (마) 청정구역인 계사내부 및 계사간의 관리 방법 제시
- (바) 지정된 경로 및 지정되지 않은 경로로 청정구역을 출입할시 관리방법 확립

##### (2) 효과적인 소독 조건

- (가) 살모넬라의 전파와 확산의 가능성을 최소화하기 위한 소독법 제시
- (나) 삽, 빗자루 등을 이용하여 시설 및 장비표면에 묻어있는 유기물 및 잔여물 제거
- (다) 물세척은 물세척 만으로도 살모넬라 수를 감소시키며, 계면활성제등을 이용하여 소독제의 효력을 떨어뜨릴 수 있는 유기물 제거에 도움
- (라) 소독제에 맞는 소독방법을 사용해야하며 최소 접촉시간을 준수
- (마) 소독이 종료된 시점부터 입식전까지 재오염을 방지하고자 기타 접촉 금지

##### (3) 소독제의 선택

- (가) 살모넬라는 거의 모든 소독제에 감수성이 존재하므로 소독하는 장소 및 기기에 맞는 소독제 선택
- (나) 소독제는 제품의 라벨 및 부표에 제시된 방법으로 소독해야 하며, 효력유지를 위해 적정온도 및 유효기간을 지키는 것을 권장
- (다) 복수의 소독제를 임의로 섞어서 쓰는 행위는 지양



- (라) 각각의 소독제 종류마다 장점 및 단점 제시
- (4) 방역시설 표준 작업 지침
  - (가) 사육시설의 내부와 외부 경계에 출입을 관리할 전실 필요
  - (나) 전실은 기후에 영향을 받지 않는 실내조건이어야 하며 장화 및 방역복 구비 필요
  - (다) 특히 외부 신발과 내부 신발간의 교차 오염 주의
  - (라) 축산관련차량은 병원체의 전파 및 확산에 관하여 주요한 요소
  - (마) 농장입구에 차단바를 설치하여 차량의 임의 방문 방지
  - (바) 차량소독은 외부에서 진행하기 때문에 기후의 영향을 많이 받으며 차량의 특성상 외부 구조물이 다양하기 때문에 세밀한 주의 필요

라. 차단방역 시설 및 소독의 농가 환경 내 저감화 효과 확인 (계사 내 시설, 바닥, 음용수 및 환기시설 등)

- (1) 농장 내 살모넬라 관리뿐만 아니라 농장 외부에서 농장 내로의 살모넬라 유입을 막기 위한 차단방역 시설의 세균에 대한 소독제 효능 검사를 실시함.
  - (가) 살모넬라 모니터링 검사를 시행했던 동물복지 인증 산란계 농가 및 일반 산란계 사육 농가에 대해 기존 설치 방역시설의 소독효능을 평가함.
  - (나) 선정된 10곳의 농장에 대해 일반적인 소독제 시험보다 물건 표면에 묻어있는 병원체에 대한 소독 효능 검증에 우수한 Disc carrier test 시험방법을 이용하여 방역시설 소독효능 평가를 진행하였음.
  - (다) 농장의 특성 상 병원체의 반입을 최소화하기 위해 닭에서 감염성을 띠지 않는 인플루엔자 바이러스 A/PR8/34 (H1N1) 주를 이용하여 disc carrier에 건조시킨 후, 정상적인 소독과정을 거치고 PBS로 재부유시켜 바이러스의 회수율을 검정함.
  - (라) 농장 외부에서 농장 진입 시 이루어지는 소독시설에 대해 우선적으로 소독 효능 검정을 실시함.
  - (마) 시험 결과, 동물복지 인증 산란계 사육 농장과 일반 산란계 사육 농장 모두 유의미한 소독 결과를 확인 하지 못했음
  - (바) 또한 대부분의 농장내에서 높은 확률로 방역시설이 고장 나있거나 사용을 하지 않는 것으로 확인됨
  - (사) 상기와 같이 적절한 소독효능을 나타내지 않는 이유로는 소독제 사용법의 미숙과 낙후된 농가 시설이 가장 큰 원인으로 사료됨. 대부분의 농가들은 소독제 희석 시 정확한 용량 및 용법을 지키지 않고 있음. 이는, 소독제의 중요성에 대한 인식이 낮으며 인력 부족으로 인한 작업 시간 관계가 연관되어 있는 것으로 판단됨. 또한, 오래된 연식의 농가들은 상대적으로 낙후된 소독시설을 보유하고 있으므로 소독제의 적절한 기능이 발휘되기 힘든 상황도 큰 원인으로 작용하고 있음

표 21. 동물복지 인증 산란계 사육 농장 방역시설 소독효능 평가 결과

| 구분    | 농장번호 1 |     | 농장번호 2 |      | 농장번호 3 |      | 농장번호 4 |     | 농장번호 5 |     |
|-------|--------|-----|--------|------|--------|------|--------|-----|--------|-----|
|       | 1회차    | 2회차 | 1회차    | 2회차  | 1회차    | 2회차  | 1회차    | 2회차 | 1회차    | 2회차 |
| 음성대조  | 6.0    | 5.5 | 5.8    | 5.5  | 6.3    | 5.6  | 5.4    | 5.9 | 6.2    | 5.7 |
| 차량소독기 | 5.7    | 5.5 | 5.5    | 5.47 | 6.2    | 6.38 | 5.32   | 5.8 | 5.9    | 5.4 |
| 분무소독기 | 4.5    | 4.7 | 4.0    | 4.5  | 작동중지   |      | 작동중지   |     | 5.8    | 5.8 |
| 대인소독기 | 작동중지   |     | 5.6    | 5.6  | 작동중지   |      | 5.3    | 5.9 | 작동중지   |     |

표 22. 일반 산란계 사육 농장 방역시설 소독효능 평가 결과

| 구분    | 농장번호 6 |     | 농장번호 7 |     | 농장번호 8 |     | 농장번호 9 |     | 농장번호 10 |     |
|-------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|---------|-----|
|       | 1회차    | 2회차 | 1회차    | 2회차 | 1회차    | 2회차 | 1회차    | 2회차 | 1회차     | 2회차 |
| 음성대조  | 5.8    | 5.9 | 6.2    | 5.7 | 6.1    | 5.5 | 5.7    | 5.6 | 5.7     | 5.5 |
| 차량소독기 | 5.62   | 5.7 | 5.2    | 5.3 | 작동중지   |     | 5.4    | 5.0 | 작동중지    |     |
| 분무소독기 | 5.7    | 5.5 | 6.0    | 5.4 | 작동중지   |     | 5.3    | 5.6 | 5.7     | 5.2 |
| 대인소독기 | 작동중지   |     | 작동중지   |     | 6.0    | 5.3 | 5.5    | 5.7 | 작동중지    |     |

마. 살모넬라 저감화를 위해 작성된 SOP를 바탕으로 닭 복지농장의 우선 적용을 통해 살모넬라 억제 효능 가능 여부 확인

(1) 국내 양계사육 기업과 협력

(가) 국내에서 양계사육을 하는 기업과 협의를 거쳐 살모넬라 방역 SOP를 적용시킬 양계농장 선택

(나) 선택된 양계농가의 방역을 살모넬라 방역 SOP로 변경

(다) 변경된 살모넬라 방역을 바탕으로 추후에 살모넬라 저감화에 효과가 있는지 확인(1) 농장 내 살모넬라 저감화를 위하여 농장에서 분리된 살모넬라에 대하여 *in vitro* 검사를 통하여 유산균의 살모넬라 억제능을 확인하였음.

(라) 실험 계군에 대해 맹장변 내용물을 채취하여 각 항생제에 대한 내성균의 존재 여부를 사전 검사하였음.

(마) Chloramphenicol 항생제에 대해 내성이 존재하는 살모넬라 엔테리티디스 균을 선발하여 공격접종균주로 사용함으로써 접종 이후 Chloramphenicol 항생제가 포함된 배지 내에서의 균 재분리를 통해 유산균 제제의 살모넬라 억제능을 확인하였음.

(바) Prebiotics로 유산균의 장내 정착 및 생존을 도울 수 있는 부형제 선발 작업을 진행중이며 이를 위해 다양한 회사의 프락토올리고당 및 텍스트린을 구매하여 유산균의 생존 능력을 비교 실험 중에 있음(2) 발효제품으로부터 살모넬라 저감화 방제사업에 활용할 유산균 균주 선발함.

(2) 실험실내 분리 유산균의 항산성, 항담즙성 및 항살모넬라능 평가

- (가) 살모넬라 저감화를 위한 유산균 선발을 위해 김치, 버섯, 된장, 깍두기, 물김치에서 총 42종류의 유산균을 분리하였음.
- (나) 유산균을 투여 했을 때, 실제로 장내 까지 안전하게 도달하는지 알아보기 위해 항산성 및 항담즙성 시험을 진행하였음.
- (다) 연구목전에 부합하기 위해 살모넬라 억제능도 함께 평가하였음.
- (라) 실제로 몇가지 유산균종이 항담즙성 및 항산성이 우수하며, 동시에 높은 살모넬라 억제능을 보임.
- (마) 항담즙성, 항산성, 및 항살모넬라능이 우수한 유산균에 대해 1일령 육계 병아리에 실제 *in vivo* 실험을 계획하였음.

표 23. 실험실내 분리 유산균의 항산성, 항담즙성 및 살모넬라 억제능 평가 결과

| 분리 유래 | 접수 번호  | 16s rRNA                 | 항산성 (생존율) | 항담즙성 (생존율) | 살모넬라 억제능 |
|-------|--------|--------------------------|-----------|------------|----------|
| 김치    | KMC-1  | Lactobacillus plantarum  | N         | 26.33      | N        |
| 김치    | KMC-2  | Lactobacillus brevis     | 0.02      | -          | N        |
| 버섯    | KMC-3  | Pediococcus acidilactici | 0.45      | 123.33     | N        |
| 김치    | KMC-4  | Lactobacillus brevis     | 0.05      | 24.17      | N        |
| 김치    | KMC-5  | Lactobacillus plantarum  | N         | 9.08       | N        |
| 된장    | KMC-6  | Lactobacillus brevis     | 0.07      | 58.83      | N        |
| 된장    | KMC-7  | Pediococcus pentosaceus  | N         | 49.17      | N        |
| 된장    | KMC-8  | Pediococcus acidilactici | 0.79      | 148.33     | N        |
| 된장    | KMC-9  | Pediococcus pentosaceus  | N         | 55.83      | +        |
| 김치    | KMC-10 | Lactobacillus revis      | 1.68      | 34.33      | N        |
| 김치    | KMC-11 | Lactobacillus plantarum  | N         | 26.33      | +        |
| 김치    | KMC-12 | Lactobacillus sakei      | 0.55      | 162.5      | N        |
| 깍두기   | KMC-13 | Lactobacillus brevis     | 0.02      | 44.5       | N        |
| 깍두기   | KMC-14 | Lactobacillus brevis     | 0.35      | 160.83     | N        |
| 깍두기   | KMC-15 | Lactobacillus curvatus   | 0.15      | 170        | N        |
| 물김치   | KMC-16 | Lactobacillus plantarum  | N         | 38.58      | N        |
| 물김치   | KMC-17 | Lactobacillus plantarum  | N         | 11.92      | N        |
| 물김치   | KMC-18 | Lactobacillus brevis     | 1         | 0.17       | N        |
| 물김치   | KMC-19 | Lactobacillus brevis     | N         | 2.42       | N        |
| 물김치   | KMC-20 | Lactobacillus plantarum  | 0.03      | 98.33      | N        |

표 24. 실험실내 분리 유산균의 항산성, 항담즙성 및 살모넬라 억제능 평가 결과

| 분리 유래 | 접수 번호    | 16s rRNA                            | 항산성 (생존율) | 항담즙성 (생존율) | 살모넬라 억제능 |
|-------|----------|-------------------------------------|-----------|------------|----------|
| 김치    | LAB15-11 | Lactobacillus brevis                | N         | N          | +++      |
| 김치    | LAB15-12 | Lactobacillus pentosus or plantarum | 2.88      | 13.42      | N        |
| 김치    | LAB15-13 | Lactobacillus plantarum             | N         | N          | N        |
| 된장    | LAB15-17 | Sporolactobacillus nakayamae        | 3.52      | 29.17      | N        |
| 된장    | LAB15-18 | Bacillus coagulans                  | 122.11    | 122.1154   | N        |
| 김치    | LAB15-19 | Lactobacillus pentosus or plantarum | 124.69    | 124.6914   | N        |
| 된장    | LAB15-21 | Bacillus coagulans                  | 118.49    | 118.4932   | N        |
| 김치    | LAB15-22 | Leuconostoc mesenteroides           | 135.30    | 135.3043   | N        |
| 된장    | LAB15-23 | Enterococcus faecium                | 130.08    | 130.0813   | N        |
| 김치    | LAB15-27 | Lactobacillus pentosus or plantarum | N         | N          | +++      |
| 김치    | LAB15-28 | Lactobacillus alimentarius          | 122.81    | 122.8188   | N        |
| 된장    | LAB15-29 | Pediococcus pentosaceus             | 89.452    | 89.4526    | +++      |
| 된장    | LAB15-30 | Pediococcus acidilactici or lolii   | 124.57    | 124.5714   | ++       |
| 된장    | LAB15-32 | Bacillus lincheniformis             | 78.512    | 78.5124    | +++      |
| 된장    | LAB15-34 | Sporolactobacillus nakayamae        | 140.77    | 140.7767   | N        |
| 된장    | LAB15-35 | Bacillus lincheniformis             | 125.48    | 125.4821   | ++       |
| 김치    | LAB15-36 | Lactobacillus brevis                | 3.77      | 28.33      | N        |
| 된장    | LAB15-37 | Sporolactobacillus nakayamae        | 122.00    | 122.0056   | N        |
| 김치    | LAB15-38 | Lactobacillus sakei                 | N         | 0.5        | N        |
| 김치    | LAB15-40 | Lactobacillus curvatus              | N         | N          | +        |
| 된장    | LAB15-41 | Bacillus coagulans                  | 0.82      | 3          | N        |
| 김치    | LAB15-44 | Lactobacillus curvatus              | 0.73      | 0.08       | N        |

바. 살모넬라 저감화를 위한 후보 유산균의 살모넬라 억제능 *in vivo* 실험

- (1) 살모넬라 저감화를 위한 유산균 후보주들을 1일령 육계 병아리에 살모넬라 엔테리티디스( $1.5 \times 10^3$  cfu/ml)를  $250 \mu\text{l}$ 씩 공격접종한 후, 1시간 뒤 표와같이 유산균( $1.0 \times 10^7$  cfu/수) 및 오크충(100 mg/ml)을 각각 경구 투여함
- (2) 유산균 및 오크충 투여 후 24시간 뒤, 부검을 통한 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 균을 정량분석하여 유산균 및 오크충의 살모넬라 방어능을 측정하였음 - 실제로 LAB15-27 유산균, LAB15-32 유산균 및 LAB13-12 유산균을 투여한 시험군에서 양성대조군에 비해 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스의 수가 유의적으로 감소하는 것으로 확인 되었음

표 25. 생균제 후보주의 in-vivo 실험 시 살모넬라 억제능 확인을 위한 시험군 구분

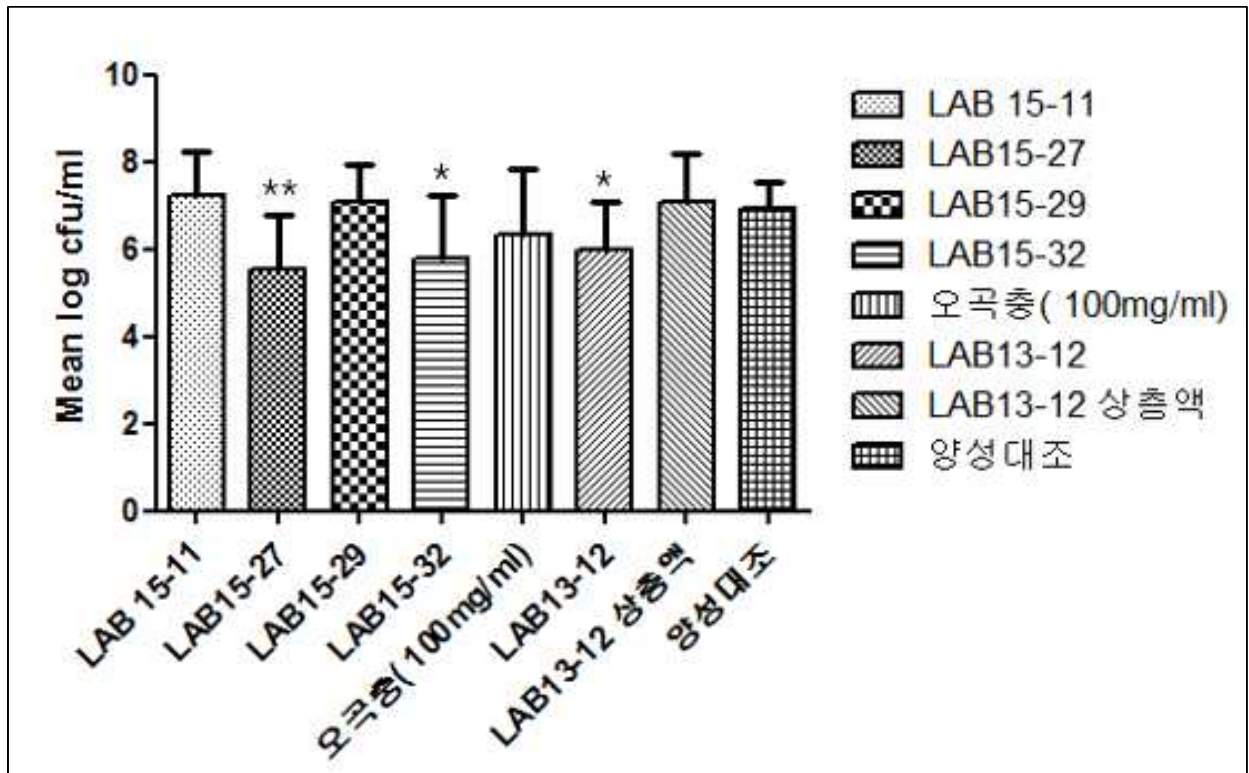
| 구분      | 공시 수수 | 투여 생균제 후보   | 공격접종 균주                |
|---------|-------|---|------------------------|
| Group 1 | 10    | 김치유래 유산균 LAB15-11<br>L.brevis                                 | Salmonella Enteritidis |
| Group 2 | 10    | 김치유래 유산균 LAB15-27<br>L.pentosus or plantarum                  | Salmonella Enteritidis |
| Group 3 | 10    | 된장유래 유산균 LAB15-29<br>Pediococcus pentosaceus                  | Salmonella Enteritidis |
| Group 4 | 10    | 된장유래 유산균 LAB15-32<br>Bacillus lincheniformis or<br>sonorensis | Salmonella Enteritidis |
| Group 5 | 10    | 오곡층   | Salmonella Enteritidis |
| Group 6 | 10    | 김치유래 유산균 LAB13-12<br>L.sakei                                  | Salmonella Enteritidis |
| Group 7 | 10    | 김치유래 유산균 LAB13-32<br>L.sakei 상층액                              | Salmonella Enteritidis |
| Group 8 | 10    | -   | Salmonella Enteritidis |
| Group 9 | 10    | -   | -                      |

표 26. 생균제 후보주 투여에 따른, 24시간 뒤 맹장변 내 S.Enteritidis 정량 결과

| 구분      | 투여 생균제 후보    | Mean log cfu/ml <sup>A</sup> |
|---------|--------------|------------------------------|
| Group 1 | LAB15-11     | 7.24                         |
| Group 2 | LAB15-27     | 5.54** <sup>B</sup>          |
| Group 3 | LAB15-29     | 7.08                         |
| Group 4 | LAB15-32     | 5.78*                        |
| Group 5 | 오곡층          | 6.31                         |
| Group 6 | LAB13-12     | 5.99*                        |
| Group 7 | LAB13-32 상층액 | 7.08                         |
| Group 8 | -            | 6.92                         |
| Group 9 | -            | 0                            |

<sup>A</sup>맹장변 내 S.Enteritidis 정량 값(Mean log cfu/ml)

<sup>B</sup>one-tailed t-test 분석을 이용하여 시험군과 양성대조군 사이에 P value가 0.05보다 작을 경우 통계학적으로 유의성이 있다고 분석 (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*<0.001)



one-tailed t-test 분석을 이용하여 시험군과 양성대조군 사이에 p value가 0.05보다 작을 경우 통계학적으로 유의성이 있다고 분석. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

<그림 46. 생균제 후보주 투여에 따른, 24시간 뒤 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량 결과>

사. 살모넬라 저감화를 위한 후보 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 in-vivo 실험

- (1) 후보유산균 복합체(총 4종)를 혼합하여 살모넬라 엔테리티디스를 방어하는지 확인해 보고자 하였음
- (2) 75마리의 1일령 육계를 총 3개의 그룹으로 나누어 실험을 진행하였음
- (3) Group1은 후보유산균 복합체를 경구투여 하였으며 살모넬라 엔테리티디스를 공격 접종, Group2는 PBS를 경구투여 하였으며 살모넬라 엔테리티디스를 공격 접종, Group3은 PBS를 경구투여 하였으며 PBS로 공격접종을 진행하였음
- (4) 1일령의 육계 병아리에 각 그룹별로 같은 농도의 유산균( $1 \times 10^9$ cfu/수) 및 PBS를  $100 \mu\text{l}$ /수 경구 투여하였음
- (5) 유산균 투여 하루 후 2일령의 육계에 살모넬라 엔테리티디스 ( $1 \times 10^4$ cfu/수) 및 PBS를 경구로 공격 접종하였음
- (6) 육계 3, 6 및 8일령에서 그룹별 10수를 무작위로 선별하여 총배설강으로부터 샘플을 채취한뒤, MRS agar에 도말하여 유산균과 살모넬라 엔테리티디스의 집락화 유무를 확인하였음
- (7) 육계 2, 3, 6, 27 및 43일령에서 각 그룹별 5수를 무작위로 선별하여 부검한 뒤 맹장편도를 채취한 후 채취한 맹장편도에서 분리되는 살모넬라 엔테리티디스 균의 정량분석을 실시하였음
- (8) 유산균 복합체를 경구 투여 했을 때 양성 그룹과 비교하여 In-vivo에서는 효과를

확인 할 수 없었음

(9) 결과를 바탕으로 새로운 살모넬라 저감화를 위한 후보 유산균 재탐색을 실시하였음

그림 27. 생균제 후보주 투여에 따른, 24시간 뒤 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량 결과

| 구분 | 2일령                      |   | 3일령         |                                      | 6일령         |                                      | 8일령         |                                      |
|----|--------------------------|---|-------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|
|    | 유산균 <sup>A</sup><br>양성수수 | <i>S. Enteri-<br/>tidis</i> <sup>B</sup> 양<br>성수수 | 유산균<br>양성수수 | <i>S. Enteri-<br/>tidis</i> 양<br>성수수 | 유산균<br>양성수수 | <i>S. Enteri-<br/>tidis</i> 양<br>성수수 | 유산균<br>양성수수 | <i>S. Enteri-<br/>tidis</i> 양<br>성수수 |
| G1 | 10/10                    | 0/10  | 10/10       | 5/10                                 | 10/10       | 10/10                                | 10/10       | 9/10                                 |
| G2 | 10/10                    | 0/10  | 10/10       | 5/10                                 | 10/10       | 10/10                                | 10/10       | 10/10                                |
| G3 | 10/10                    | 0/10  | 10/10       | 0/10                                 | 10/10       | 0/10                                 | 10/10       | 0/10                                 |

A 맹장편도에서 유산균 양성으로 확인된 수수

B 맹장편도에서 살모넬라 엔테리티디스양성으로 확인된 수수

그림 28. 생균제 후보주 투여에 따른, 24시간 뒤 맹장변 내 *S. Enteritidis* 정량 결과

| 구분      | 2 일령<br>Mean log CFU <sup>A</sup> | 3 일령<br>Mean log CFU | 7 일령<br>Mean log CFU | 27 일령<br>Mean log CFU |
|---------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Group 1 | —                                 | 5.81                 | 6.75                 | 4.54                  |
| Group 2 | —                                 | 4.9                  | 6.71                 | —                     |
| Group 3 | —                                 | —                    | —                    | —                     |

A맹장편도 내 살모넬라 엔테리티디스정량 값 (Mean Log CFU)

아. 살모넬라 저감화를 위한 후보 유산균 재탐색 및 복합체의 의 살모넬라 억제능 in-vitro 실험

- (1) 새로운 후보 유산균을 탐색하기 위해 된장, 김치에서 총 4종의 유산균을 분리하였음
- (2) 분리된 4종의 유산균을 혼합하여 시판되고 있는 타사제품 A와의 살모넬라 엔테리티디스에 대한 항균력에 비교 실험하였음
- (3) 타사제품 A와 4종의 유산균 복합체의 비교 결과 유사한 살모넬라 억제능이 있는 것으로 판단됨
- (4) 위의 결과로 In-vivo에서 실제 살모넬라 엔테리티디스의 억제능이 있는지 확인해 보고자 하였음

표 29. 분리 유산균 목록

|    |                                 |
|----|---------------------------------|
| 시료 | 유산균                             |
| 된장 | <i>Pediococcus acidilactici</i> |
| 김치 | <i>Lactobacillus pentosus</i>   |
| 김치 | <i>Lactobacillus sakei</i>      |
| 된장 | <i>Bacillus coagulans</i>       |

표 30. 상층액을 분주한 웰의 살모넬라 엔테리티디스 억제구간(지름) 길이

| 구분      | 유산균 종류 | 유산균배양 상층액의 S.Enteritidis에 대한 항균력 |     |
|---------|--------|----------------------------------|-----|
|         |        | 억제구간                             | 항균력 |
| Group 1 | 유산균 합제 | -                                | +++ |
| Group 2 | 타사제품 A | -                                | +++ |

+: 6<=억제구간<=9, ++: 10<=억제구간<=13, +++<=억제구간<=16

자. 선발된 유산균 균주에 대한 살모넬라 저감화 확인

(1) 살모넬라 저감화를 위해 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 in-vivo 실험

- (가) 살모넬라 저감화로 효과가 알려져 있는 타사제품 A와 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 엔테리티디스 억제능을 비교 실험함
- (나) Group 1은 유산균 4종 복합체를 입추 후 3일간 경구 투여, Group 2는 대조약품으로 효능이 알려져 있는 타사제품 A를 3일간 경구 투여, Group 3은 약물을 투여하지 않은 양성대조군으로 진행하였음
- (다) 3일간 각 그룹에 맞는 유산균 투여 후 모든 시험군에 육계 유래 살모넬라 엔테리티디스균주 100 $\mu$ l (1x10<sup>6</sup> CFU/ml)를 구강으로 공격 접종함
- (라) 공격접종 2, 4, 7일 후 각 그룹에서 5마리씩 무작위로 선발하여 맹장변을 채취한 뒤 살모넬라 엔테리티디스균의 정량분석을 실시하였음
- (마) 공격접종 후 최대 7일 까지 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량결과 유산균 복합체는 살모넬라 엔테리티디스가 검출 되지 않았음
- (바) 실험실 내 결과를 바탕으로 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능을 실제 양계 사육 농장에서 확인해 보고자 하였음

표 31. 공격접종 2일 후 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량 값의 평균

| 구분      | 유산균 투여 | Mean log CFU/ml |
|---------|--------|-----------------|
| Group 1 | 유산균 합제 | 0.00            |
| Group 2 | 타사제품 A | 0.00            |
| Group 3 | -      | 4.88            |



표 32. 공격접종 4일 후 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량 값의 평균

| 구분      | 유산균 투여 | Mean log CFU/ml |
|---------|--------|-----------------|
| Group 1 | 유산균 합제 | 0.00            |
| Group 2 | 타사제품 A | 0.00            |
| Group 3 | -      | 5.31            |

표 33. 공격접종 7일 후 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량 값의 평균

| 구분      | 유산균 투여 | Mean log CFU/ml |
|---------|--------|-----------------|
| Group 1 | 유산균 합제 | 0.00            |
| Group 2 | 타사제품 A | 4.40            |
| Group 3 | -      | 6.71            |

표 34. 공격접종 후 맹장변 내 살모넬라 엔테리티디스 정량 값의 평균

| 구분      | 유산균 투여 | Mean log CFU/ml |
|---------|--------|-----------------|
| Group 1 | 유산균 합제 | 0.00            |
| Group 2 | 타사제품 A | 1.47            |
| Group 3 | -      | 5.63            |

(2) 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 실제 양계 농장 투여 실험

- (가) 최종적으로 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능을 야외 농장에서 다른 2개의 품목과 비교하여 효과를 알아보하고자 함
- (나) 양계 농가 계열사 계약 농가 3개에서 투여 시험을 진행하였음
- (다) 한 농가에 타사제품 A, 타사제품 B, 유산균 복합체, 음성컨트롤로 총 4개의 그룹으로 나누어 진행하였음
- (라) 각각의 유산균의 투여일정은 1일령부터 3일령 까지 총 3일 이며 출하 전까지 지속적인 환경모니터링 및 1일령, 17일령, 32일령에 부검을 진행하였음
- (마) 입추 직후에 살모넬라 검사를 진행하였을 때 살모넬라가 검출된 농가에서 살모넬라 저감화 유산균을 투여 했을 때 출하 직전 부검에서는 살모넬라가 검출되지 않았음
- (사) 입추 전 환경 및 입추 직후의 육계에서 살모넬라가 검출되는 실험적 상황을 재현할수 없으며, 농가의 수 및 계사의 수도 적어 유의성을 확인하기엔 다소 부족하였음
- (아) 추후에 살모넬라가 검출되는 농가를 추가로 확인 한 후, 유의성을 확보할 수 있는 시험을 계획할 예정임.

표 35. 시험군의 농장, 투여 유산균 및 투여일정

| 구분      | 농장   | 투여 유산균  | 투여 일정       | 시료 수집 일정        |                      |
|---------|------|---------|-------------|-----------------|----------------------|
|         |      |         |             | 환경 모니터링         | 동물 부검                |
| Group 1 | 농장 A | 타사제품 A  | 1일-3일       | 0일령<br>31~35일령A | 1일령<br>17일령<br>32일령B |
| Group 2 |      | 타사제품 B  |             |                 |                      |
| Group 3 |      | 유산균 복합체 |             |                 |                      |
| Group 4 |      | -       |             |                 |                      |
| Group 5 | 농장 B | 타사제품 A  | 1일-3일,      |                 |                      |
| Group 6 |      | 타사제품 B  | 항생제         |                 |                      |
| Group 7 |      | 유산균 복합체 | (4-5일),6-7일 |                 |                      |
| Group 8 |      | -       | -           |                 |                      |
| Group 9 | 농장 C | 타사제품 A  | 1일-3일,      |                 |                      |
| Group10 |      | 타사제품 B  | 항생제         |                 |                      |
| Group11 |      | 유산균 복합체 | (4-5일),6-7일 |                 |                      |
| Group12 |      | -       | -           |                 |                      |

A 동물 입추 전, 출하시기에 환경 모니터링을 진행할 예정으로, 농장의 상황에 따라 구체적인 날짜는 변경될 수 있음

B 동물 입추, 사료 교체 직전, 출하 시기에 부검을 진행할 예정으로, 농장의 상황에 따라 구체적인 날짜는 변경될 수 있음

표 36. 시험 유산균의 안정성 확인

| 구분       | 안전성 확인 결과  |             |       |            |              |
|----------|------------|-------------|-------|------------|--------------|
|          | 출하 체중 (kg) | 증체량         | 출하 일령 | 입추 수수      | 출하 수수        |
| Group 1  | 1.5        | 63556.629   | 31일   | 10000+a    | -209         |
| Group 2  | 1.38       | (FCR 1.448, | 31일   | 10000+a    | -394         |
| Group 3  | 1.44       | 동별 측정값      | 31일   | 10000+a    | -195         |
| Group 4  | 1.46       | 미제공)        | 31일   | 12000+a    | -159         |
| Group 5  | 1.94       |             | 34일   | 20000+a    | 20020        |
| Group 6  | 1.8        | 정보 미제공      |       | 2동 20000+a |              |
| Group 7  | (개별 자료     | (FCR 1.439) | 34일   | 3, 4동      | 20020, 30030 |
| Group 8  | 미제공)       |             |       | 30000+a    |              |
| Group 9  |            |             |       |            |              |
| Group 10 |            |             |       |            |              |
| Group 11 |            |             |       |            |              |
| Group 12 |            |             |       |            |              |

표 37. 시험 유산균의 살모넬라 모니터링 결과

| 구분      | 입추 전 환경 | 입추 직후 동물 | 중간검사 환경 | 출하 후 환경 | 출하 후 동물 |
|---------|---------|----------|---------|---------|---------|
| Group 1 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 2 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 3 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 4 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 5 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 6 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 7 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 8 | 미검출     | 미검출      | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group 9 | 미검출     | 검출       | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group10 | 미검출     | 검출       | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group11 | 미검출     | 검출       | 미검출     | 미검출     | 미검출     |
| Group12 | 검출      | 검출       | 미검출     | 검출      | 검출      |

(3) 살모넬라 저감화에 효과가 있는 균주의 산란계 및 육계 농장으로 방제사업에 대한 계획 연구 수립

(가) 추가 농가 및 계열사와의 협력을 통한 살모넬라 저감화 실제 양계 농장 추가 실험

- ① 살모넬라 저감화 유산균 복합체의 효력을 입증하기 위해 육계 및 산란계에서 추가실험 동시 진행 예정
- ② 통계적 유의성을 확보하기 위해 다수의 농가에서 투여 시험을 진행 할 예정이며, 살모넬라 저감화를 확인하기 위해 높은 균 검출율을 보이는 농가를 선발할 계획임

(나) 살모넬라 저감화 유산균의 사료 첨가제 개발

- ① 기존 개발된 음수제제 뿐만 아니라 사료첨가제로 확대 개발
- ② 사료첨가제로써도 살모넬라 저감화에 효과가 있는지 입증하고 추후 제품 등록 진행 예정

차. 도출된 대응방법을 토대로 국가정책 도입을 위해 정책건의

(1) 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화에 대한 정책건의 기술서 작성

(가) 현황 및 문제점

- ① 닭고기에 대한 연간 소비량은 매년 증가 추세에 있으며, 이에 발맞추어 실용계 사육두수 역시 증가 추세에 있음.
- ② 살모넬라는 특히 전세계적으로 사람 식중독 유발의 주요 원인체로 국가 차원의 발생 감시 및 방제 연구가 지속적으로 요구되고 있음.

- ③ 가금 생산물(계육, 계란)은 식중독 발생의 최대원인으로 꼽히고 있으며, 최근 국내에서 발생한 식중독 사고들 역시 살모넬라균에 감염된 위의 재료들을 이용하여 제조된 가공식품이 문제인 것으로 밝혀짐
- ④ 전세계적으로 살모넬라가 검출되지 않은 가금 생산물 (계육, 계란)에 대하여 인증제를 부여하는 제도가 시행되고 있음. 하지만, 현재까지 국내에서는 이러한 제도가 확립되지 않음.
- ⑤ 살모넬라의 검출을 재검증하며, 나아가 모니터링 방법을 변화시킬 필요가 있을 것으로 사료됨.

(나) 주요 연구 성과

- ① 국내 산란계 농장 중 동물복지 사육방식과 관행적인 사육방식을 택한 농장 각 5곳씩 총 10곳의 농장을 선정하였음.
- ② 국내 육계 농장 중 동물복지 사육방식을 택한 5곳과 관행적인 사육방식을 택한 농장 10곳을 선정하였음.
- ③ 관행적인 사육방식을 택한 육계농가를 제외한 나머지 15곳의 농가는 1년에 두 번씩 방문하여 살모넬라 동정을 실시하였음.
- ④ 농장 내에서 사용되고 있는 물품이나 건물로부터 살모넬라 동정을 위한 샘플을 채취하였음.
- ⑤ 산란계의 경우 복지사육 방식을 택한 B농장 음수대에서 한 개의 샘플 (0.7%)만이 살모넬라 양성으로 확인되었으나, 혈청형 검사 결과 식중독의 주요 원인균으로 밝혀진 ser.Enteritidis로 확인되었음.
- ⑥ 관행적인 케이지 사육방식을 택한 농가에서는 110개의 샘플에서 양성 샘플이 확인되지 않았음.
- ⑦ 육계의 경우 복지사육 방식을 택한 농가 샘플 총 200개 중 21개의 샘플 (10.5%)이 양성으로 확인되었으며, 특정한 물품에 한정되어 있지 않는 경향을 보임.
- ⑧ 복지사육 방식의 농가에서 검출된 살모넬라는 대부분 ser.Grampian과 ser.Virchow로 확인되었음.
- ⑨ 관행적인 케이지 사육방식의 육계 농가에서는 복지농가에서보다 적은 7개의 샘플 (3.5%)이 살모넬라 양성으로 확인되었으며, 일부 ser. Senftenberg와 ser.Enteritidis로 확인되었음.

(다) 정책건의 사항

- ① 살모넬라 무검출 인증 제도도입 및 HACCP 인증제 개선
- ② 살모넬라 모니터링 프로그램 개선

(라) 기대효과

- ① 사육단계별 모니터링 기법과 살모넬라 제어 모델이 확립될 경우 살모넬라 부재 계육의 생산이 가능해지고 이를 통하여 계육시장의 확대기반을 마련할 수 있을 것으로 예상됨.
- ② 살모넬라 등 식중독 유발 질병 부재 안전 축산물의 시장 형성 및 국내 축산물의

위생과 안전성 수준 향상을 통한 관련 산업 육성이 가능함.

- ③ 위생적인 양계 생산기반 정착으로 양계농가 보호 및 시민건강 증진을 기대할 수 있음.

## 가금 살모넬라 저감화를 위한 생산단계에서 유통까지 활용지침(SOP)

### 1. 서론

살모넬라균 감염증은 전 세계적으로 가장 많이 보고되고 있는 식품 매개 질환으로써, 닭고기는 이 두 감염증에 있어서 가장 중요한 식품 매개체 중의 하나이다. 이러한 질병 발생으로 인한 사회적 부담과 효과적인 제어를 위한 경제적 비용은 여러 국가에서 매우 중요하게 여겨지고 있으며, 이런 인수공통 전염병의 원인체인 살모넬라균(Zoonotic Salmonella)에 의한 식품오염 문제는 국가 간의 무역에까지도 심각한 문제를 야기할 가능성이 있다.

본 지침서에서는 미생물의 위험관리(MRM) 수행을 위하여 Codex 원칙 및 미생물 위험관리 수행 지침서(CAC/GL 63-2007)에서 채택하고 있는 위험관리체계(RMF)에 입각한 접근방법을 적용하고자 한다. “예비 위험관리 활동“과 “위험관리 옵션의 확인 및 선택“은 식품공급망(Food Chain)의 각 단계별 제어수단으로 개발된 지침에 따른다. “실행“ 및 “모니터링“에 대한 섹션에서는 위험관리체계의 모든 구성 요소를 적용하여 완성한다.

본 지침서는 Codex 시스템에 이미 설정된 일반 식품위생수칙을 토대로 하여, 닭고기에서 공중보건학적으로 중요한 살모넬라균 제어를 위한 실용적인 제어방법(control measures)으로 발전시키고자 하였다. 이러한 맥락에서 본 지침서는 과학적인 근거 및 위해성 평가에 기초한 관리기준을 개발하고자 하는 Codex 위원회 (Codes Alimentarius Commission: CAC)의 의도를 이행하였다. 단일 또는 다수의 단계에서 적용 가능한 제어방법은 다음과 같이 구분할 수 있다.

- 작업장 위생관리기준(GHP) 기반: 이 지침들은 사실상 본질적으로는 질적이며 또한 실증적인 과학적 지식과 경험을 바탕으로 한다. 또한, 이것들은 일반적으로 규범적이며 아마도 국가마다 상당히 다를 수도 있다.
- 위해관리 기반: 이 지침들은 또한 식품공급망의 한 단계 (또는 일련의 단계들)에서 위험 요소를 일정 수준으로 제어할 수 있는 과학적 지식을 바탕으로 개발하였으며, 살모넬라균의 검출이나 농도(concentration)에 대한 정량적 자료를 확보할 수 있어서 각 단계적인 과정에서 그러한 과학적인 방법이 위해성 제어에 효과가 있는지 입증할 수 있도록 하였다. 위해에 기반한 제어 방법의 이점은 특정한 위험평가과정 없이 정확히 확인할 수 없지만 식중독세균의 검출도 및(또는) 오염농도의 현저한 감소효과는 국민 건강 증진에 크게 기여할 것이다.

- 위해 제어(hazard control)를 위한 양적 수준에 기초한 제어조치에 대한 여러 사례들은 본 지침서의 개발에 있어서 엄격한 과학적 평가와 검토를 거쳤다. 그러나 이 사례들은 단지 예시일 뿐이며 이런 사례들의 사용 및 승인은 회원국마다 다를 수 있다. 지침서에 포함된 이런 예시들은 식품공급망 시나리오 및 국가 차원에서의 선택된 제어수단은 발생가능한 공중보건 예방을 위한 조치이다.

본 지침서는 식품안전에 대해서 1차 생산부터 소비까지의 일련의 접근방법의 실제 적용을 향상시키기 위해 흐름도 형식으로 제시하였다. 이러한 형식의 장점은 다음과 같다.

- 살모넬라균에 대한 제어조치들에 대한 접근방식의 차이점과 공통점들을 설명함.
- 식품공급망의 여러 단계에서 적용되는 제어조치들 간의 관계를 서술함
- 작업장 위생관리기준에 의거한 제어조치들에 대한 과학적 타당성/검증 측면에서 데이터 차이점들을 강조함
- 개별 작업장 및 국가 수준에서 HACCP 계획의 개발을 촉진함
- 다른 나라에 적용된 닭고기에 대한 제어조치들의 동등성을 판단하는 데 도움을 줌

이렇게 함으로써, 본 지침서는 각 국가 차원(및 개별적 1차 생산 및 가공)에서 융통성 있게 활용할 수 있게 하였다.

## 2. 목적

본 지침서의 주요 목표는 닭고기를 매개로한 식품유래(foodborne) 질병을 줄이기 위해 식육내 살모넬라균의 제어와 관련된 정보를 정부와 업계에 제공하는 동시에 국가 간 식품 거래에서 공정성을 보증하는 것이다. 본 지침서는 국가 위험관리 결정에 따라 닭고기에 있어서 살모넬라균의 제어를 위한 작업장 위생관리 및 위해관리 접근법들의 확고한 적용을 위해 과학적이고도 국제적으로 통용되는 도구가 될 것이다.

국제 무역에서 닭고기내 살모넬라균에 대한 양적 기준을 설정하려는 것이 본 지침서의 의도는 아니다. 오히려 이 지침서는 Codex 식육위생 관리규범 (CAC/RCP 58-2005)의 권고를 따르고 국가들이 자국의 상황에 적합한 제어조치를 수립하는데 “활용 가능성이 높은 (enabling)” 틀을 제공하는 것이다.

## 3. 지침서의 범위와 사용

### 3.1 범위

본 지침서는 육계용 닭고기(Gallus gallus)를 오염시킬 수 있고 식중독을 일으킬 수 있는 모든 살모

넬라균의 저감화를 위해 적용된다. 주요 초점은 가금 부산물을 제외한 육계 통닭과 닭고기 부분육에 적용하기 위한 것이다. 이 지침서는 산란노계의 닭과 같은 다른 종류의 닭에도 적절하게 적용될 수 있다.

본 지침서는 전형적인 “산업“시스템에서 생산되는 닭고기에 대한 “1차 생산부터 소비“에 이르는 식품공급망의 모든 단계에 적용된다. 이 문서에서는 차단방역 관리를 위해서 주로 환경 제어 가능한 계사 형태를 위해 개발되었지만, 다른 계사 형태에도 적용될 수 있다.

### 3.2 사용

본 지침서는 진행 흐름도에서 개별 단계 또는 여러 단계들에서 고려되어지는 잠재적 제어 방안과 함께 “1차 생산부터 소비“에 이르는 식품공급망 접근법에 따라 닭고기에 있는 살모넬라균을 제어하기 위한 구체적인 지침서로 발달되고 있다. 본 지침서는 식품위생 일반규정 (CAC / RCP 1-1969), 식육위생관리 규범 (CAC/RCP 58-2005), 즉석 냉동식품 가공과 취급에 관한 규정(CAC/RCP 8-1976) 및 우수 동물사료 관리기준(CAC/RCP 54-2004)에 대한 실천규범 등에 대해서 보충적이며 또한 그런 기준서들과 함께 사용되어야 한다. 이러한 일반적이고 포괄적인 조항들은 본 지침서에서 적절히 참조하고 있으며 그 내용들은 본 지침서에서는 언급하지는 않을 것이다.

본 지침서는 작업장 위생관리 기반 제어수단과 위해 기반 제어수단의 사례들을 체계적으로 제시한다. 작업장 위생관리 기반은 위해 기반 제어수단을 선택하고 결정하기 위한 선결 조건이다. 위해 기반 제어조치의 예들은 과학적으로 상업적 사용 조건 하에서 효과적이라고 평가된 것에 국한한다. 특정 제어조치에 대해 정량화 할 수 없는 경우, 살모넬라균 간에 효과가 다를 수 있음을 명심해야 한다. 각국은 이러한 위해에 기반한 제어조치가 단지 지표일 뿐이며 제공된 참고 자료는 현장 적용을 위해 검토되어야 함을 주지해야 한다. 제어조치에 대한 결과로써 정량화 가능한 결과지만 특정 연구의 조건에 따라 다를 수 있으며 위해 감소의 의미있는 추정치를 제공하기 위해 상업지역 조건 아래에서 유효성 검사가 요구되어질 수 있다. 정부와 산업계는 특정 식품 공정에 HACCP 원칙을 적용할 때 중요관리점(CCP)에 대한 결정을 알리기 위해 위해 기반 제어조치에 대한 선택 사항을 적용할 수 있다.

본 지침서에 제시된 몇 가지 위해 기반 제어조치는 육계의 도체에서 살모넬라균의 유행 가능성 및(또는) 농도를 줄이기 위한 살균소독제의 사용을 기반으로 한다. 일차 생산에서부터 소비에 이르는 식품공급망에서 화학소독제를 포함한 이런 제어수단의 적절한 사용이 필요하게 되는 경우, 주무당국의 승인을 받아야 한다. 그리고 본 지침서는 사례들에 포함되지 않은 어떤 다른 위해 기반 제어조치의 선택에 대한 것도 배제하지 않는다.

본 지침서의 적용에 있어서 유연성의 규정은 하나의 중요한 특성이다. 이 지침서는 주로 정부의 위험 관리자 및 산업계의 식품안전 제어 체계 설계 및 구현을 위한 것이다.

본 지침서는 여러 나라의 닭고기에 대한 서로 다른 식품안전 조치의 동등성을 판단할 때 유용할 것이다.

■ 용어 정의

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <i>Batch</i>                  | 무리의 부분집합. 도계장으로 동시에 보내어지는 닭의 무리.   |
| <i>Broiler</i>                | 알보다는 고기를 위해 선택적으로 교배되고 사육된 갈러스 갈러스( <i>Gallus gallus</i> ) 학명을 가진 닭의 종들.   |
| <i>Chicken</i>                | <i>Gallus gallus</i> 종의 새들.  |
| <i>Competitive exclusion:</i> | 살모넬라균을 포함한 장내 병원균( <i>enteropathogens</i> )의 장내 정착( <i>Gut colonization</i> )을 예방하기 위해 가금류에 확인동정 되었거나 되지 않은 박테리아 균총을 급여하는 것.   |
| <i>Crate:</i>                 | 살아있는 닭을 운반하는 데 사용되는 상자와 같은 컨테이너  |
| <i>Epidemiological unit</i>   | 어떤 병원체에 노출될 확률이 거의 같은 역학적 관계를 가진 동물군. 이는 공통된 환경 (예: 우리에 있는 동물)을 공유하거나 공통적인 사육관리기법으로 인해 발생 가능하다. 보통, 이것은 한 무리( <i>herd</i> ) 또는 계군( <i>flock</i> )이다. 그러나 역학 단위는 마을과 같은 좁은지역내 서식자들에 속한 동물 또는 공동 동물 취급 시설을 공유하는 동물과 같은 그룹을 지칭할 수도 있다. 질병의 역학 관계는 질병에 따라 혹은 심지어 병원균의 군주에 따라서도 달라질 수 있다. |
| <i>Establishment:</i>         | 동물이 보호되는 시설.   |
| <i>Flock:</i>                 | 인간의 통제하에서 유지되는 한 종류의 무리 또는 야생동물 떼. 육상동물 국제위생규약의 목적을 위해, 무리는 일반적으로 역학 단위로 간주된다.   |
| <i>Module:</i>                | 여러 개 상자 또는 케이지에 수집된 닭의 상하차를 용이하게 그것들을 넣어 들 수 있게 만든 구조물.  |
| <i>On-line Reprocessing</i>   | 분변 또는 섭취물의 오염에 대한 관리수단으로 (트리밍 또는 오프라인 세척 대신) 사용할 수 있는 추가 세척단계.   |
| <i>Partial depopulation:</i>  | 부분 계사비우기.  |
| <i>Total depopulation:</i>    | 완전 계사비우기.  |



## ■ 닭고기에서 살모넬라균의 제어에 적용되는 원칙

육류에 대한 우수위생관리의 중요한 원칙은 식육위생 관리규범(CAC/RCP 58-2005) 4 절: 식육위생 일반원칙에 나와 있다. 이 지침서에서 특히 고려한 두 가지 원칙은 다음과 같다.

식품안전 위험분석의 원칙은 1차 생산에서부터 소비까지의 일련의 과정 중 닭고기에서 살모넬라균 제어를 위해 가능하고 적절한 곳에 포함되어야 한다.

가능하고 실용적인 경우 관할당국은 공중보건목표를 충족시키는데 필요한 닭고기에 살모넬라균의 제어수준을 객관적으로 표현할 수 있도록 위험관리 지표를 작성해야 한다.

## ■ 위험성인지

위험성(risk) 인지(profiles)는 식품안전 문제에 위험관리체계(RMF)를 적용할 때 “예비 위험관리 활동”의 중요한 부분이다. 이들은 개별 식품생산 및 가공 시스템에 맞게 조정된 식품안전 제어 시스템의 설계에 있어 위험 관리자 및 업계에 과학적 정보를 제공한다.

본 지침서의 내용은 육계의 살모넬라균에 대한 두 가지 광범위한 위험성의 인지에 근거하고 있다:  
- 육계용(어린) 닭에서 살모넬라종에 대한 식품 안전성 위험도, 2007년 6월

## ■ 일차 생산에서부터 소비까지의 제어수단에 대한 접근법

본 지침서는 육계의 살모넬라균에 대한 제어조치가 잠재적으로 적용될 수 있는 식품공급망의 모든 단계에서 식별할 수 있도록 “1차생산으로부터 소비까지”의 흐름도 접근법을 택하고 있다. 또한, 본 지침서는 모든 잠재적인 제어수단에 대한 식별 및 평가에 대한 체계적인 접근을 용이하게 한다. 따라서, 식품공급망의 모든 단계를 고려하면 제어수단의 다양한 조합을 개발할 수 있다. 이는 국가 간에 발생하는 육계의 생산 및 처리과정 시스템에 있어서의 차이와 리스크 관리자가 국가별 상황에 적합한 리스크관리 옵션을 선택할 때와 같이 융통성이 필요한 경우, 특히 중요하다.

## ■ 제어수단의 적용을 위한 일반적인 순서도

일반적인 흐름도는 아래에서 보여주는 바와 같이 순서대로 제시하고 있다. 개별 시설은 공정 흐름도에서 변화를 줄 수도 있으며 그에 따라 HACCP 계획의 설계도 적절히 조정해야 한다.

### • 처리공정 흐름도1: 1차생산(1~11단계)

1. 원종계군 관리
2. 부화장으로 달걀 운송
3. 종계 부화장
4. 초생추를 종계농장으로 운송이동
5. 종계군 관리

6. 부화장으로 달걀 운송
7. 부화장
8. 초생추를 사육장소로 운송
9. 닭 관리
10. 계사비우기 (전체 또는 부분)
11. 도계장으로 운송  
처리공정(12~24단계)
12. 도계장에 입고
13. 생체 검사
14. 도살[도표2 참조]
15. 조리 가능한 상태로 다듬기 (방혈 후 털뽑기만 마친 도체 단계)[도표3 참조]
16. 내부/외부 세척
17. 온라인 재처리
18. 사후 검사
19. 도체 냉각(공기 또는 침수)
20. 냉각 후 이용
21. 해체
22. 통닭 또는 부분육 포장
23. 냉각 또는 동결
24. 저장  
유통경로(25~30단계)
25. 운송
26. 도매상(업소)
27. 수송물류
28. 소매상 또는 식당업소
29. 운송
30. 소비자

• **처리공정 도표2 (14단계~도살까지)**

- A. 현수 또는 가스 기절
- B. 전기 기절 또는 현수
- C. 목베기
- D. 방혈

• **처리공정 도표3 (15단계~다듬기까지)**

- A. 뜨거운 물에 담금(탕침)
- B. 털을 제거(탈모)
- C. 머리 당김
- D. 비절베기
- E. 재절기(선택사항)
- F. 환기
- G. 내장제거
- H. 모래주머니 제거
- I. 목 분해/목 절단

**■ 본 지침서에서 다루는 구체적인 공정흐름 단계들에 있어서의 제어수단의 이용 가능성**

다음 표의 목적은 살모넬라균에 대한 특정 제어조치가 식품공급망의 여러 다른 부분에 있어서 각각의 공정 흐름 단계와 관련하여 확인된 곳을 설명하기 위한 것이다. 제어조치는 체크로 표시되었으며 자세한 내용은 본 지침서 및(또는) GHP의 경우 OIE 육상동물 위생규약에 기술되어 있다. 빈 칸은 살모넬라균에 대한 특정 관리 조치가 공정 흐름 단계에서 규명되지 않았음을 의미한다.

**■ 처리공정의 단계별 제어수단의 이용 가능성**

| 가공단계             | GHP기반 제어수단 | 위해관리기반 제어수단 |
|------------------|------------|-------------|
|                  | 살모넬라균      | 살모넬라균       |
| 1. 원종계           | OIE +√     |             |
| 2. 부화장으로 운송      | OIE +√     |             |
| 3. 종계 부화장        | OIE +√     |             |
| 4. 종계 농장으로 운송    | OIE +√     |             |
| 5. 종계 관리         | OIE        |             |
| 6. 부화장으로 운송      | OIE        |             |
| 7. 부화            | OIE +√     |             |
| 8. 초생추를 사육장소로 운반 | OIE        |             |
| 9. 닭 관리          | OIE +√     |             |
| 10. 계사비우기        | OIE        |             |

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
| 11. 도살장으로 운송         | OIE |   |
| 12. 도살장에 입고          | √   |   |
| 13. 생체검사             |     |   |
| 14. 도살               |     |   |
| 15. 방혈 후 털뽑기 만 마친 단계 |     | √ |
| 16. 내부/외부 세척         |     | √ |
| 17. 온라인 재처리          |     | √ |
| 18. 사후 검사            |     |   |
| 19. 도체 냉각            | √   | √ |
| 20. 냉각 후 이용          |     | √ |
| 21. 부분으로 해체          | √   |   |
| 22. 포장               | √   | √ |
| 23. 냉각 또는 동결         |     |   |
| 24. 저장               | √   |   |
| 25. 운송               |     |   |
| 26. 도매               | √   |   |
| 27. 운송               |     |   |
| 28. 소매 또는 식당         | √   | √ |
| 29. 운송               |     |   |
| 30. 소비자              | √   | √ |

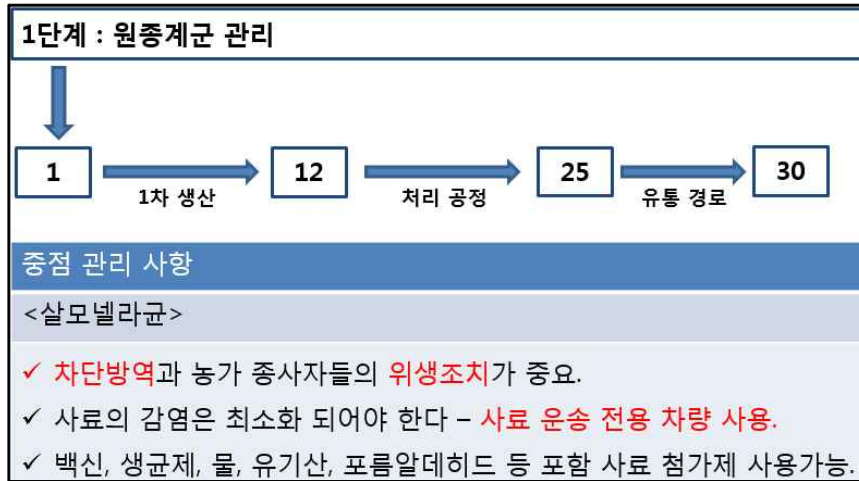
#### ■ 단계 1~11(1차생산)에 대한 제어수단

일차생산에 대한 본 지침서는 아래 기준서들을 보완하며 또한 함께 사용해야 한다.

- 세계동물보건기구(OIE) 육상동물 위생규약(살모넬라균에만 적용):
  - 제 6장 4절 “가금류 생산의 생물학적 안전(생물보안) 절차” 및
  - 제 6장 5절 “가금류 살모넬라균의 예방, 탐지 및 제어”.
  - 우수가축사양 실천규범(CAC/RCP 54-2004).
  - 육류 위생관리 실행규범(CAC/RCP 58-2005).

※ 참고: 세계동물보건기구(OIE) 육상동물 위생규약 및 동물용 사료 문서로부터의 특정 조항은 본 지침서에서는 제공하지 않는다.

■ 원종계군 관리



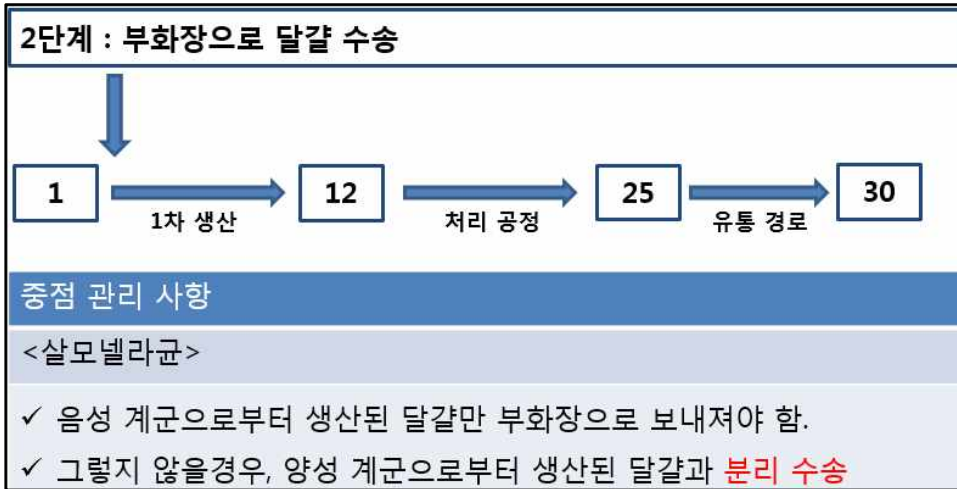
■ 작업장 위생관리 기반 제어수단

원종계군에 대한 살모넬라균의 제어는 차단방역과 농가 종사자들의 위생조치의 결합을 통해 강화될 수 있다. 국가 차원에서 채택된 제어조치의 특정 조합은 이해관련 관계자들과 함께 전문가 협의회에서 결정되어야 한다.

■ 살모넬라균

- 종계군은 감염의 전파를 예방하기 위해 살모넬라균의 감염이 없는 상태를 유지해야 한다.
- 계군이 살모넬라균 양성인 것으로 밝혀진 경우, OIE의 육상동물 위생규약, 제6장 5절 “가금류 살모넬라균의 예방, 탐지 및 제어“에 상세히 설명된 대응 범위를 정해야 한다.
- 사료는 살모넬라균의 감염을 최소화하는 방식으로 처리, 저장 및 운반되어야 한다. 가급적이면 종계용 사료는 사료 운송만을 위해 사용되는 전용 차량으로 운송되어야 한다.
- 생균 및 비활성 백신, 생균제와 물, 그리고 유기산 또는 포름알데히드를 포함하는 사료 첨가제와 같은 제어수단의 사용은 관할 당국의 허가를 받아 사용할 수 있다.

■ 부화장으로 달걀 수송

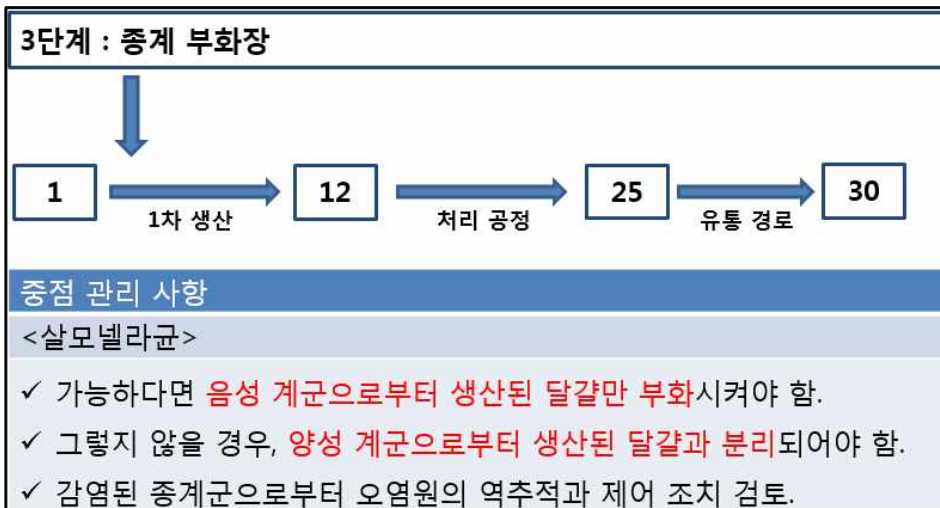


■ 살모넬라균에 대한 작업장 위생관리 기반 제어조치

• 살모넬라균

- 살모넬라균 음성 계군들로부터 생산된 달걀만 부화장으로 보내져야 한다. 그와 같이 실행되지 않은 경우, 살모넬라균 양성 계군들로부터 생산된 달걀은 그렇지 않은 다른 달걀들과 별도로 운반 되어져야 한다.

■ 종계 부화장



■ 살모넬라균에 대한 작업장 위생관리 기반 제어조치

• 살모넬라균

- 가능하다면 살모넬라균 음성 계군들로부터 생산된 달걀들만 부화시킨다.
- 오염된 계군들로부터 생산한 달걀들의 사용이 불가피한 경우, 오염된 달걀들을 오염되지 않은 달걀들과 별도로 분리 유지하고 부화시켜야 한다.
- 감염된 종계군으로부터 오염원의 역추적과 제어조치를 검토해야 한다.

■ 초생추를 종계장으로 운송

|  |           |    |           |
|--|-----------|----|-----------|
| <b>4단계 : 초생추를 종계장으로 운송</b>   |           |    |           |
| ↓  |           |    |           |
| 1  | → 1차 생산 → | 12 | → 처리 공정 → |
|  |           |    | 25        |
|  |           |    | → 유통 경로 → |
|  |           |    | 30        |
| <b>중점 관리 사항</b>  |           |    |           |
| <공통>   |           |    |           |
| ✓ 초생추를 종계장으로 운송하는 종사자는 어떤 다른 축사 건물에도 들어가서는 안되며 적재 및 하역 중 초생추의 교차오염을 방지해야 한다. |           |    |           |

■ 작업장 위생관리 기반 제어수단

- 초생추를 종계장으로 운송하는 종사자는 어떤 다른 축사 건물에도 들어가서는 안되며, 적재 및 하역 중 초생추의 교차오염을 방지해야 한다.

■ 종계군 관리

|   |  |
|---|--|
| <b>5단계 : 종계군 관리</b>                             |  |
| <b>중점 관리 사항</b>                                 |  |
| <공통>  |  |
| ✓ 1단계(원종계군 관리)와 동일.                             |  |
| ✓ 사료의 감염은 최소화 되어 져야 한다 - <b>사료 운송 전용 차량 사용.</b> |  |
| ✓ 백신, 생균제, 물, 유기산, 포름알데히드 등 포함 사료 첨가제 사용가능.     |  |

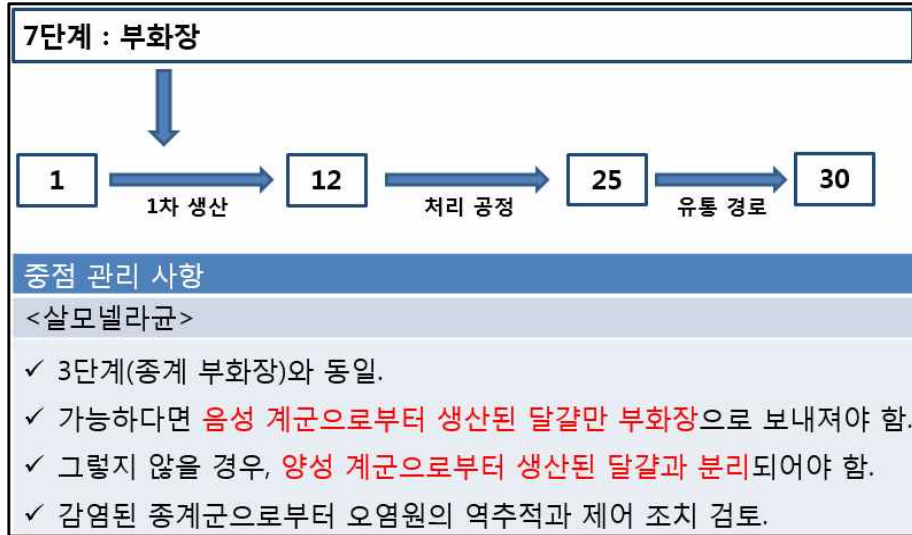
■ 부화장으로 달걀 운송

|  |           |    |           |
|--|-----------|----|-----------|
| <b>6단계 : 부화장으로 달걀 운송</b>                               |           |    |           |
| ↓  |           |    |           |
| 1  | → 1차 생산 → | 12 | → 처리 공정 → |
|  |           |    | 25        |
|  |           |    | → 유통 경로 → |
|  |           |    | 30        |
| <b>중점 관리 사항</b>  |           |    |           |
| <살모넬라균>  |           |    |           |
| ✓ 음성 계군으로부터 생산된 달걀만 부화장으로 보내져야 함.                      |           |    |           |
| ✓ 그렇지 않을 경우, 양성 계군으로부터 생산된 달걀은 다른 달걀들과 분리되어 운송되어 져야 함. |           |    |           |

■ 살모넬라균

- 살모넬라균 음성 계군들로부터 생산된 달걀만 부화장으로 보내져야 한다. 이것이 실행되지 않은 경우, 살모넬라균 양성 계군들로부터 생산된 달걀은 그렇지 않은 다른 달걀들과 별도로 운반 되어져야 한다.

■ 부화장

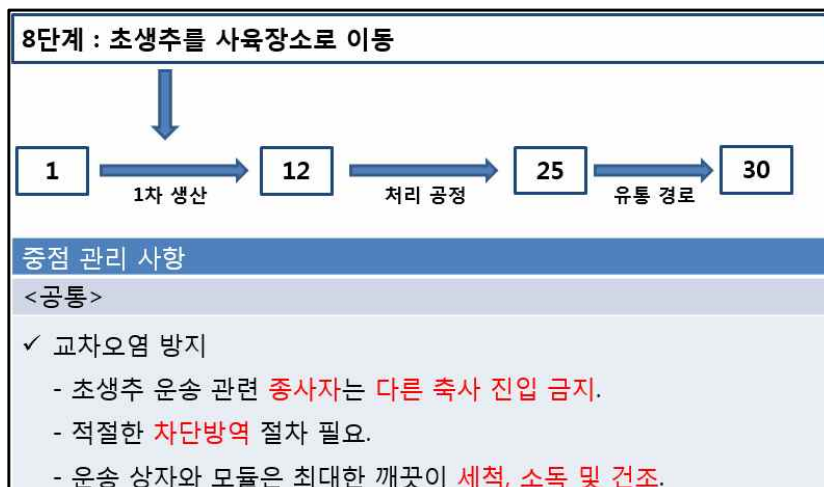


■ 작업장 위생관리 기반 통제 조치

• 살모넬라균

- 오염된 계군들로부터 생산된 달걀들의 사용이 불가피한 경우, 오염된 달걀들을 오염되지 않은 달걀들과 별도로 분리 유지하고 그 병아리들을 오염되지 않은 달걀로부터 부화된 계군들과 분리 유지해야 한다. 감염된 중계군으로부터 오염원의 역추적과 제어조치를 검토해야 한다.

■ 초생추를 사육장소로 이동

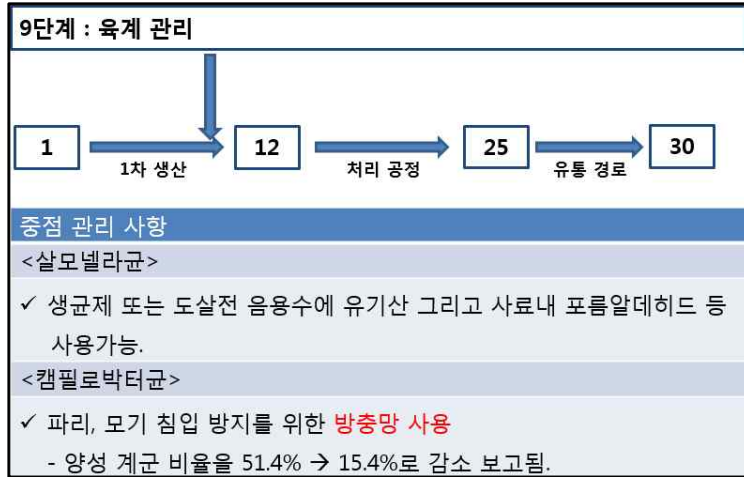




■ **작업장 위생관리 기반 제어조치**

- 초생추 운송 관련종사자는 어떤 다른 축사에 들어 가지 말아야 한다. 농장 종사자는 초생추의 적재 및 하역 중 교차오염을 피하기 위해 적절한 차단방역 절차를 따라야 한다. 모든 생계의 운송상자와 모듈은 재사용 전에 가능한 한 최대한 깨끗이 세척, 소독 및 건조되어야 한다.

■ **육계관리**



■ **작업장 위생관리 기반 제어조치**

- 계군에 있어서 살모넬라균의 제어는 차단방역과 농가 종사자들의 위생 조치의 결합의 적용을 통해 강화된다. 국가 차원에서 채택된 제어조치의 특정 조합은 이해 관련 관계자들과 함께 전문가 협회에서 결정되어야 한다. 특히, 해충방제 프로그램은 현지 조건에 따라 설계되어야 한다.

• **살모넬라균**

- 생균제, 도살 전 음용수에 유기산 그리고 사료내 포름알데히드 또는 유기산과 같은 특정 제어조치의 사용은 관할 당국의 허가를 받아 사용할 수 있다.

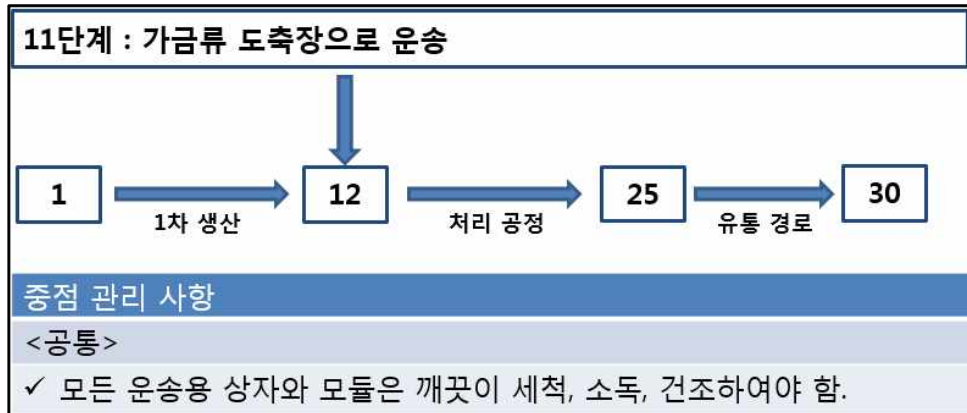
■ **계사 비우기**



■ **작업장 위생관리 기반 제어조치**

- 가능한 경우 완전 계사비우기를 수행해야 한다. 이것이 실행 가능하지 않거나 부분적인 계사비우기가 실행되는 경우, 닭들이 사용하는 장비와 상자들의 엄격한 차단방역 및 위생에 특별한 주의를 기울여야 한다.
- 부분적으로 비워지는 계사들은 전업을 고려해 같은 날에 완전비우기가 이루어질 계사들보다 앞서 계획을 잡는 것이 바람직하다.
- 절식이 실행될 때, 젓산과 같은 음료 첨가제는 도계 과정 중 모래주머니(소낭)의 오염을 줄이기 위해 사용될 수 있다.

■ **가금류 도축장으로 운송**



■ **육계 도축장으로 운송**



■ **살모넬라균에 대한 작업장 위생관리 기반 제어조치**

- **살모넬라균**
- 모든 생계 운송용 상자와 모듈은 재사용 전에 가능한 한 깨끗하게 세척, 소독, 건조시켜야 한다.



■ 육계 입고차량 소독

■ 단계 12~24(처리공정)에 대한 제어조치

■ 도축장 입고



■ 생계 입고



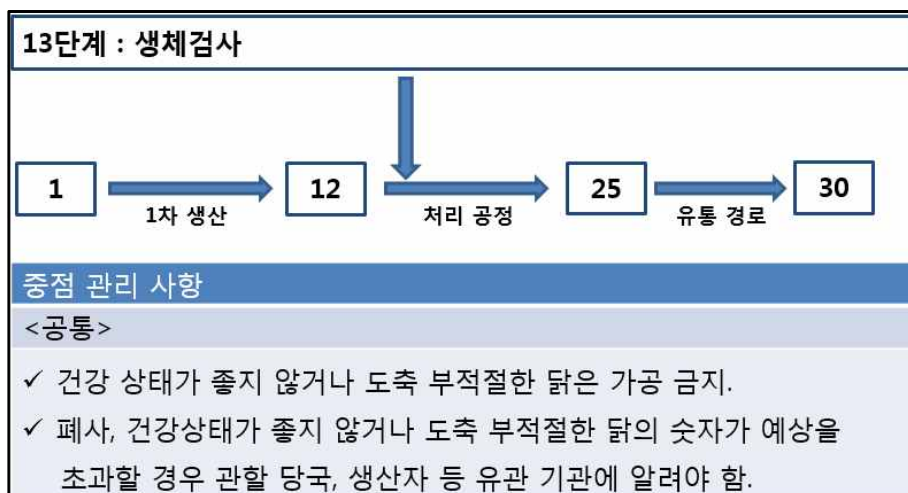
**■ 작업장 위생관리 기반 제어수단**

- 국가별 상황에 따라, 특히 살모넬라균 상태에 대한 계군의 정보는 도계 물류 및(또는) 가공육 처리의 흐름을 원활하게 하기 위해 적시에 제공되어야 한다.
- 계군들은 분변 및 섭취물에 의한 도계의 오염 가능성을 줄이기 위해 8-12 시간 절식 후 도축되어야 한다.
- 닭에 대한 스트레스는 최소화되어야 한다. 예를 들면, 희미한 조명, 최소 처리 및 처리 지연 방지.

**• 살모넬라균**

- 살모넬라균 양성인 닭들이 도축될 때는 다른 닭들과의 교차오염을 최소화하는 방식으로 수행되어야 한다. 예를 들면, 일과가 끝날 때 도축하거나 가급적이면 주중 마지막 날이나 혹은 다른 효과적인 일정 조정을 통해 도축해야 한다.

**■ 생체검사**

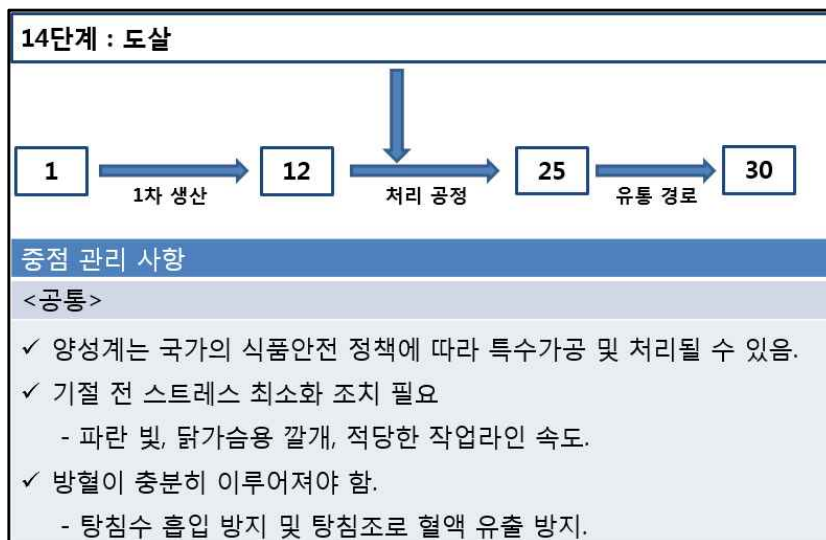




■ **작업장 위생관리 기반 제어조치**

- 다 죽어가거나 건강 상태가 좋지 않거나 또는 도축하기에 부적절한 닭은 가공해서는 안된다.
- 가금류 도축장으로 이송된 닭들이 죽었거나, 죽어가거나, 건강상태가 좋지 않거나, 또는 도축하기에 부적합한 숫자가 예상 수준을 초과하는 경우, 도축장 담당자는 관할 당국, 생산자, 수의사, 운반자, 또는 운송 회사와 같은 해당 관련자들에게 적절한 예방 조치 및(또는) 시정 조치를 취할 수 있게 연락해야 한다.

■ **도살**



- CO<sub>2</sub>를 이용하여 생계를 질식사시킴



#### ■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

- 살모넬라균 양성 반응의 닭들은 국가의 식품안전 정책에 따라 특수 가공 및(또는) 처리를 위해 전 환될 수 있다.
- 기질 전 현수 공정에 있어서 가금에 대한 스트레스를 최소화하기 위한 조치가 취해져야 한다. 예 를 들어, 파란 조명, 닭가슴용 깔개, 적당한 라인별 작업속도를 유지.
- 탭침수 흡입을 예방하고 탭침조로 혈액이 유출되는 것을 방지하기 위해서 충분한 방혈이 이루어 져야 한다.

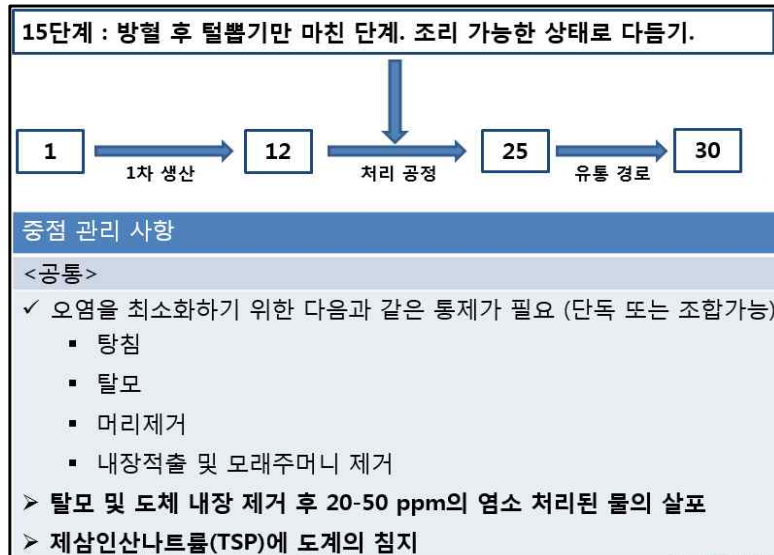
현수 →



방혈 →



■ 도체 다듬기



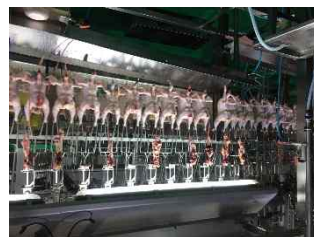
탕적(탕침)



탈모



머리제거



내장적출

■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

- 도체의 오염을 최소화하기 위한 통제 조치는 다음과 같다.
- 충분한 급수로 세척
- 징형 (불필요한 부분 제거)
- 분변 오염이 심한 도체의 폐기 또는 재처리
- 관할당국이 승인 한 화학소독제의 사용
- 관할당국이 승인 한 다른 물리적 방법의 사용.
- 이러한 제어 조치는 주요 공정 단계에서 단독 또는 조합 형태로 적용될 수 있다. 복수의 제어조치가 항상 추가 되어지는 것은 아니다.
- 도체를 다시 매는 것이 필요한 경우, 교차오염을 줄이기 위해 기계적으로 수행하는 것이 바람

직하다.

- 바닥에 떨어지는 모든 닭들은 불량으로 처리되거나 관할 당국이 정한 특정 조건 하에서 재처리해야 한다. 떨어뜨린 제품은 트리밍 및 재세척과 같은 적절한 개선 조치가 이루어 져야 한다.

#### ■ 탕침

- 탕침 과정 중의 오염은 다음의 수단에 의해 최소화될 수 있다.
  - 역류의 사용
  - 다충분한 흔들림이 있는 높은 유량의 물
  - 살모넬라균의 수준을 최소화하기 위해 최적의 탕침수 온도를 유지
  - pH 조절제와 같은 승인된 화학제제 사용
- 탕침 과정 동안 오염을 최소화하는 공정 제어 시스템을 설계할 때 고려해야 할 다른 요소는 다음과 같다
  - 교반 정도
  - 계단식 탱크의 사용
  - 탕침 전 세척 시스템
  - 탕침 중 탕침 시간을 충분히 고려해 살모넬라균이 죽을 수 있을 만큼 온도가 충분히 높다면 탕침기의 온도 상승을 멈춤
  - 탕침 처리 후 탱크 내 탕침수의 비움과 세척
  - 적어도 매일 탱크의 세척 및 소독
  - 재사용/재활용 수질에 적용되는 위생 조치

#### ■ 탈모

- 탈모과정 중 교차 오염은 다음에 의해 최소화 될 수 있다:
  - 도축 전 닭의 적당한 절식
  - 탈모기의 깃털 쌓임 방지
  - 장비 및 도체의 지속적인 세척
  - 장비의 정기 점검 및 유지 보수
  - 움직이는 부품 청소에 특별한 주의
  - 탈모기에 장착된 손가락에 대한 정기적인 검사 및 교체

#### ■ 머리제거

- 모래주머니로부터 내용물이 나오지 않는 방법으로 머리제거를 실행한다. 모래주머니의 파열로 인한 오염을 줄이기 위해 머리를 아래로 잡아 당겨야 한다.



■ 내장적출

- 내장의 파열 및 분변의 확산은 다음과 같이 최소화할 수 있다:
  - 닭의 크기 차이에 대해 여러 개의 배치(batch)로 제한하여 비슷한 크기의 닭들을 함께 처리함
  - 기계 장치의 세심한 점검과 정기적 유지 보수

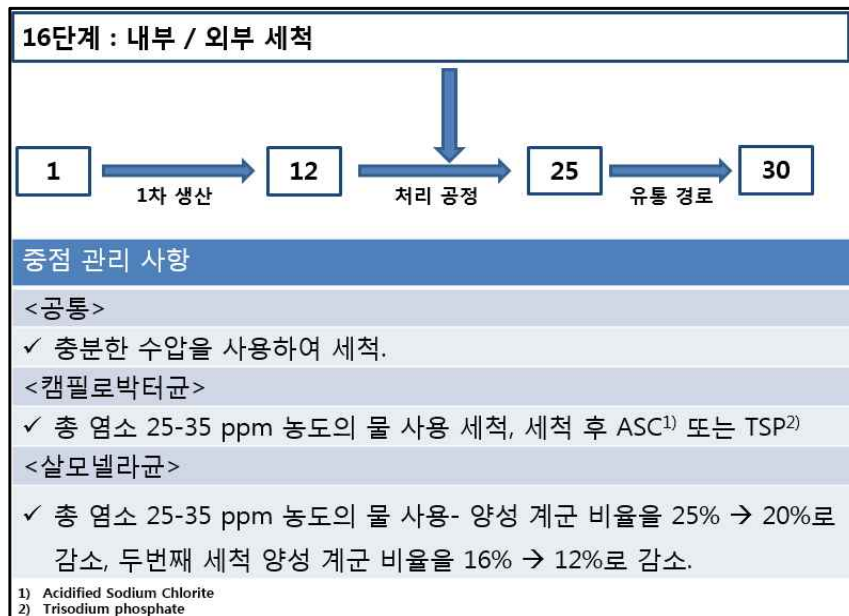
■ 모래주머니제거

- 가능한 경우, 도체가 오염되지 않는 방식으로 모래주머니를 제거

■ 살모넬라균에 대한 위해 기반 제어조치

- 살모넬라
  - 탈모 및 도체 내장 제거 후 20-50 ppm의 염소 처리된 물의 살포는 살모넬라균 양성 육계 도체의 오염율을 각각 34%에서 26% 및 45%에서 36%로 감소시키는 것으로 나타났다.
  - 제삼인산나트륨(TSP)에 도계의 침지는 살모넬라 양성균의 도체오염을 72%에서 4%로 낮추는 것으로 나타났다.

■ 도체내/외부 세척





■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

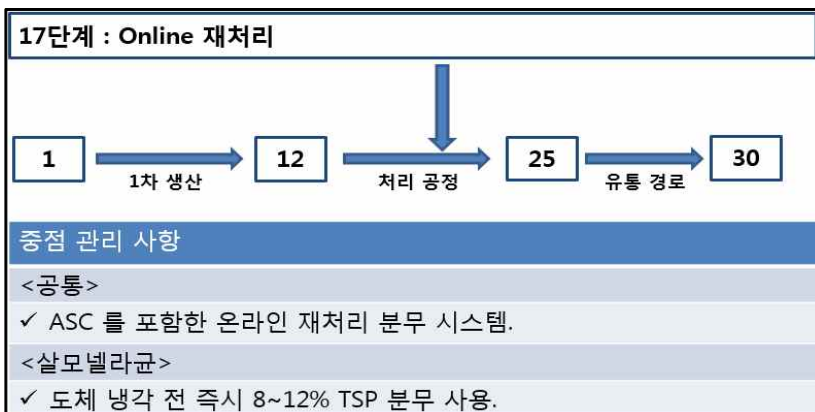
- 모든 도체의 내부와 외부는 눈에 보이는 오염을 제거하기에 충분한 수압으로 철저히 씻어야 한다. 가금 도체에 직접 사용하는 물을 확보할 수 있는 적절한 장비를 사용해야 한다. 내/외부 세척공정에 설치된 브러싱 장치는 오염 물질의 제거에 도움을 줄 수 있다.

■ 위해 기반 제어조치

• 살모넬라균

- 20-50 ppm 농도로 염소 처리 된 물을 이용한 스프레이 적용을 통한 내/외부 세척은 살모넬라균 양성 육계 도체의 오염율을 25%에서 20%로 감소시키는 것으로 나타났다. 첫 번째에 이어 두 번째 내/외부 세척은 살모넬라균 양성 육계 도체를 16%에서 12%로 감소시켰다.

■ 온라인 재처리



■ 위해 기반 제어조치

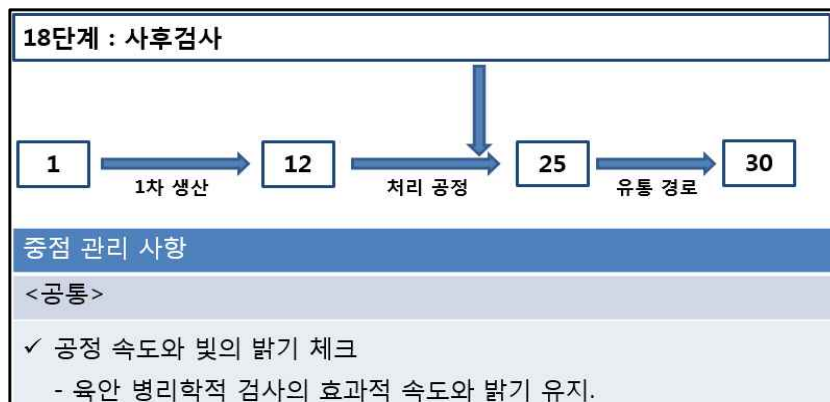
- 살모넬라균

- ASC를 포함한 온라인 재처리 분무 시스템은 통닭 한 마리의 살모넬라 양성 도체 오염율을 37%에서 10%로 감소시키는 것으로 나타났다.
- 도체를 10% TSP에 담금처리하는 살모넬라균의 최확수법(MPN) 검사에서는 같은 경우 피부에서 1.92 log 10 CFU/g 에서 불검출 수준으로 감소한 것으로 나타났다.

- 살모넬라균

- 업체에서 ASC (750 ppm, pH 2.5, 스프레이 적용)를 사용한 경우 세균에 대한 살모넬라균 오염율을 약 50%에서 검출 수준 이하로 감소시키는 것으로 나타났다. 또 다른 업체에서는 (700-900 ppm, pH 2.5, 분무 적용) 살모넬라균 오염율이 18%까지 감소된 것으로 나타났다. 또한, 냉각 전 ASC 스프레이는 도체에 대한 살모넬라균의 오염율을 17%에서 9%로 감소시켰다. ASC에 부분도체의 담금은 살모넬라균 오염율을 29%에서 1%로 감소시켰다. 도체냉각 전 즉시 8-12% TSP의 스프레이 사용은 살모넬라균 오염율을 10%에서 3%로 감소 시켰다.

■ 사후검사



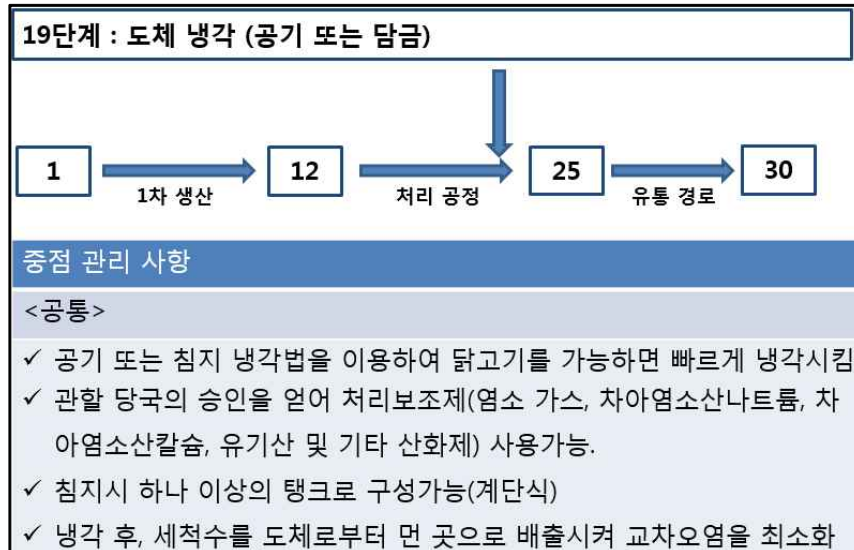
- 해체검사



■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

- 공정 속도와 빛의 밝기는 눈에 보이는 오염, 관능적 결점 및 관련 육안 병리학의 효과적인 사후 검사에 적합해야 한다.

■ 도체 냉각



• 도체 냉각 (침수/공기)



■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

- 도체의 미생물 성장을 억제하기 위해 공기 또는 침지 냉각법을 이용하여 닭고기를 가능하면 빠르게 냉각시켜야 한다. 냉각 시스템의 설계와 운영은 냉각된 도체의 목표 온도가 냉각기를 빠져 나올 때까지 반드시 이루어 질 수 있도록 해야 한다.

■ 공기냉각

- 도체의 건조를 방지하기 위해 공기 냉각 중 물 분무기를 사용하는 경우, 교차오염을 최소화하도록 준비해야 한다.

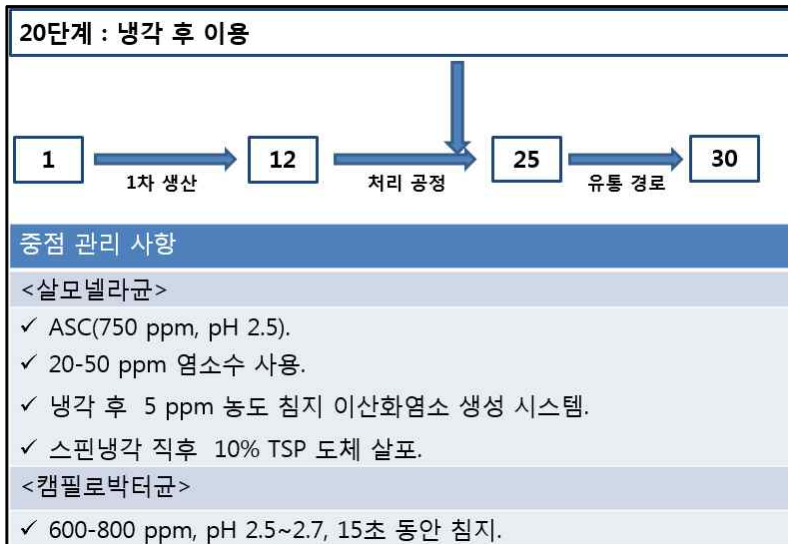
## ■ 침수냉각

- 살모넬라균의 방제가 필요한 것으로 간주되는 경우, 처리 보조제를 냉각기에 첨가할 수 있다. 이것들은 관할 당국의 승인을 받아야 하며, 다음을 포함할 수 있다:
  - (염소 가스, 차아염소산나트륨, 차아염소산칼슘 정제 또는 전해 생성 차아염소산에 의해 생성된) 유리 잔류 염소
  - 유기산 (예: 시트르산, 젖산 또는 과초산)
  - 기타 산화제 (예: 과산화수소, 과산화산, 이산화염소, 산성화된 염화나트륨)
- 냉각 탱크에서 염소의 사용은 오염된 도체에 직접 작용하는 오염 제거제로 작용하지 않을 수 있다. 그러나 물 자체에 의한 세척효과가 있을 수 있으며, 침지수에 필요한 염소 잔류량을 유지하기 위해 충분한 수준으로 염소를 첨가하면 재부착 및 교차오염 예방을 위해 세척된 살모넬라균을 불활화시킬 수도 있다.
- 물(재순환 수 포함)은 이동이 가능하여야 하며, 냉각 시스템은 하나 이상의 탱크로 구성될 수 있다. 냉각수를 사용하거나 얼음을 넣을 수도 있다. 물 흐름은 역류여야 하며 냉각 및 세수 작용을 돕기 위해 교반될 수 있다.
- 냉각 후, 세척수의 배출시 과도한 물을 도체로부터 먼 곳으로 배출시켜 후속 처리공정에서 도체의 교차오염을 최소화해야 한다.

## ■ 위해 기반 제어조치

- **살모넬라균**
  - 20 ppm 또는 34 ppm의 염소 또는 3 ppm 또는 5 ppm의 이산화염소로 처리된 침지수에서의 침지냉각은 살모넬라균에 대한 오염율을 14% (대조군)에서 각각 2% (20 ppm Cl<sub>2</sub>), 5% (34 ppm Cl<sub>2</sub>), 2% (3 ppm ClO<sub>2</sub>) 및 1% (5 ppm ClO<sub>2</sub>)로 감소시켰다.

## ■ 냉각 후 이용

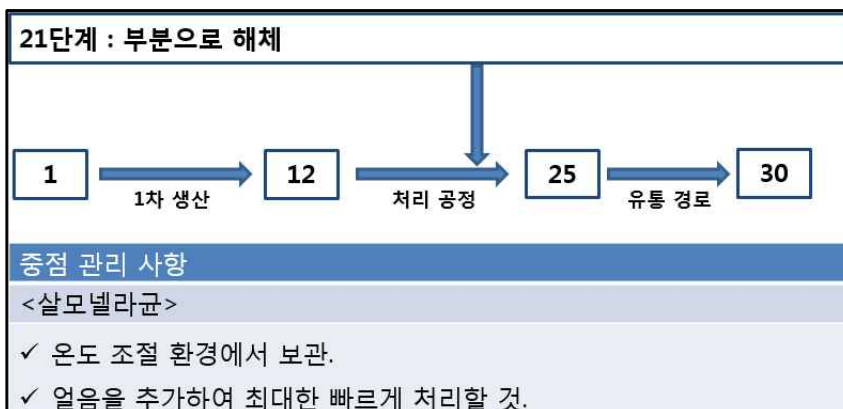


**■ 위해 기반 제어조치**

**• 살모넬라균**

- 냉각 후 ASC (750 ppm, pH ≈ 2.5, 침지액)의 사용은 도체의 살모넬라 양성도체 오염율을 16%에서 검출 이하로 감소시키는 것으로 나타났다. 다양한 처리 보조제는 FAO/WHO: 식품 생산 및 식품 가공 염소 함유 소독제의 사용에 대한 이점 및 위험 부분에서 설명되고 있다. (FAO/WHO 2009.)
- 20-50 ppm 농도의 염소수의 스프레이 사용은 도체의 살모넬라 양성 도체 오염율을 10%에서 4%로 감소시키는 것으로 나타났다.
- 냉각 후 5 ppm 농도의 침지로 적용되는 이산화염소 생성 시스템은 살모넬라균의 양성 도체 오염율을 15-25% 감소시켰다.
- 스프링클러 직후 10% TSP로 도체에 살포하면 살모넬라균 양성 도체 오염율을 50%에서 6%로 감소되는 결과를 보였다.

**■ 부분으로 해체**

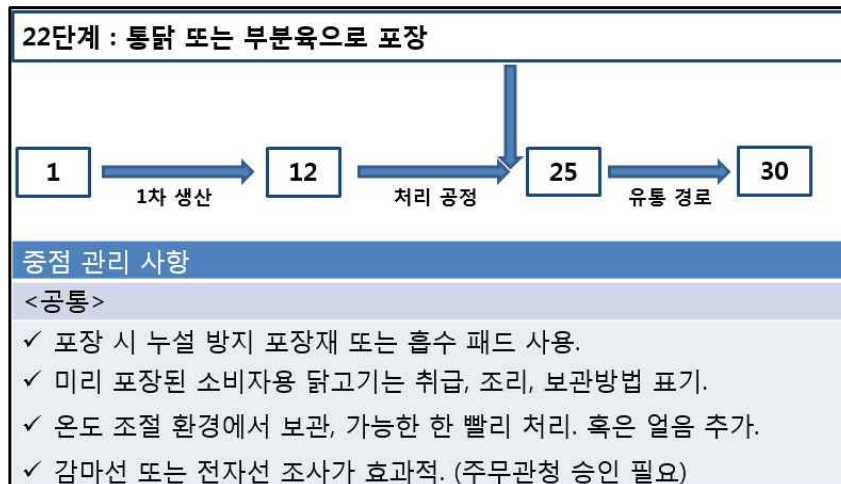


■ 살모넬라균에 대한 작업장 위생관리 기반 제어조치

• 살모넬라균

- 냉각된 도체는 온도 조절이 가능한 환경에서 보관하고 가능하면 빨리 처리되거나 또는 얼음을 추가하여 살모넬라균의 생장을 최소화해야 한다.

■ 통닭 또는 부분육으로 포장



• 중량 선별 및 도체 포장



■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

- 포장팩의 외부 오염을 최소화하기 위해 포장할 때 주의를 기울여야 한다. 누설 방지 포장재 또는 흡수 패드를 사용한다.
- 소비자용 포장판매된 닭고기는 국가 상황에 따라 안전한 취급, 조리 및 보관 방법을 표기해야 한다.

• 살모넬라균

- 냉장된 도체는 온도 조절이 가능한 환경에서 유지되어야 하며 가능하면 빨리 처리되거나 얼음

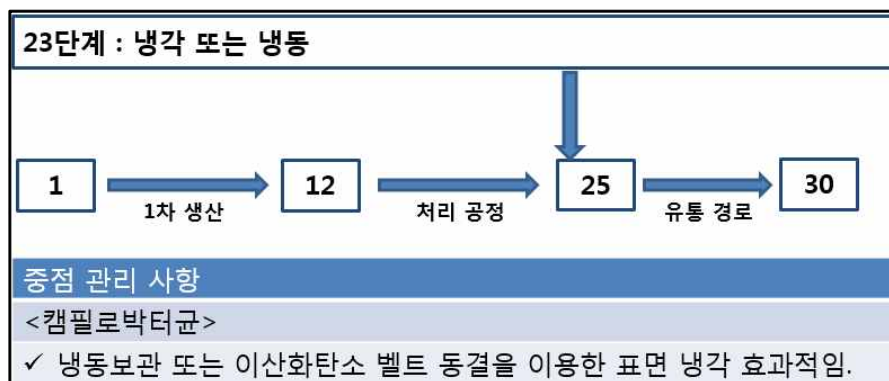
을 추가하여 살모넬라균의 생장을 최소화 한다.

■ 위해 기반 제어조치

• 살모넬라균

온도체, 냉도체, 동결도체에 적용되는 감마선 또는 전자선의 다양한 선량이 살모넬라균 제거에 효과가 있는 것으로 나타났다. 조사가 허용되는 경우, 조사의 선량은 관계당국에 의해 승인되고 검증되어야 한다.

■ 냉각 또는 냉동



■ 저장



■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

• 살모넬라균

- 제품은 살모넬라균의 증식을 예방하는 온도에서 보관해야 한다.

■ 단계 25~30(유통경로)에 대한 제어조치

- 운송의 모든 측면에 대한 작업장 위생관리 기반 관리 조치에 대해서는 실행규범-식품위생 일반 원칙 (CAC/RCP 1-1969) 및 식육위생 관리규범 (CAC/RCP 58- 2005)을 참조한다.

■ 운송



■ 도매

25단계 : 운송

26단계 : 도매

중점 관리 사항

<살모넬라균>

✓ 성장 억제 온도에서 저장되어야 함.

• 살모넬라균

- 제품은 살모넬라균의 증식을 예방하는 온도에서 보관해야 한다.

■ 운송

■ 소매 또는 식품 서비스

27단계 : 운송

28단계 : 소매 또는 식당



중점 관리 사항

<소매>

- ✓ 닭고기와 다른 식품 간의 상호오염을 방지.
- ✓ 비가공식품과 조리제품 분리 취급.
- ✓ 개별 포장시 포장재의 누출방지.

<음식서비스>

- ✓ 냉동 닭고기의 해동은 미생물의 성장을 최소화하고 교차오염을 방지.
- ✓ 닭고기 도체의 세척않음. 조리 및 비조리식품 분리 취급.
- ✓ 종사자 및 도구에 의한 교차오염 최소화

■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

• 소매

- 닭고기와 다른 식품 간의 교차오염을 방지하기 위한 위생 조치가 이루어져야 한다.
- 소매 업자들은 가공되지 않은 제품과 조리된 제품을 분리해야 한다.
- 생닭을 취급하기 전과 후에는 손을 위생적으로 씻어야 한다. 또한, 소매업자들은 생닭 껍을 취급 한 후 손을 위생적으로 처리하여 고객에게 위생적인 제품을 제공해야 한다.
- 소매점에서 고객의 선택에 의해 제품이 개별적으로 포장되는 경우, 포장재는 가능하면 누출이 없어야 한다. 고객의 다른 구매품들과 닭고기가 분리될 수 있도록 계산대에서 특별 포장을 제공해야 한다.

■ 식품 서비스

- GHP 기반 관리 조치의 경우, 대량 조리식품 및 도시락 제조위생 관리규범 (CAC/RCP 39-1993)을 참조한다.
- 냉동 닭고기의 해동은 미생물의 성장 가능성을 최소화하고 교차오염을 방지하는 방식으로 수행되어야 한다. 닭고기 도체의 세척은 오염을 확산시킬 수 있으므로 수행하지 않아야 한다.
- 식품 서비스업 종사자는 식품안전과 관련하여 생닭고기와 조리된 닭고기 제품의 차이점을 충분히 숙지하고 있어야 하며 항상 분리되도록 해야 한다.
- 식품 서비스업 종사자는 생닭과 손, 접촉면 및 도구 사이의 교차오염을 최소화하고 다른 식품의 오염을 방지해야 하는 위생조치를 마련해야 한다.

• 살모넬라균

- 제품은 살모넬라균의 증식을 예방하는 온도에서 보관해야 한다.

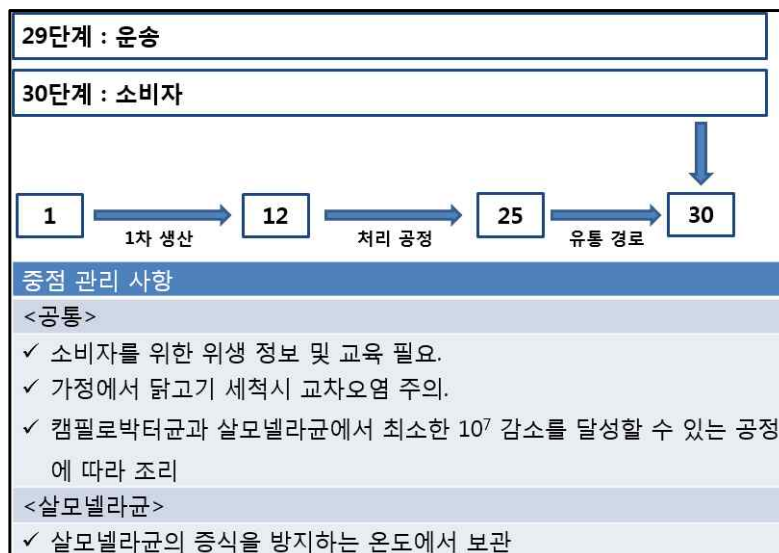
■ 위해 기반 제어조치

• 살모넬라균

- 닭고기는 살모넬라균이 최소  $10^7$  감소를 달성할 수 있는 공정에 따라 조리해야 한다.

■ 운송

■ 소비자



■ 작업장 위생관리 기반 제어조치

- 소비자 교육은 취급, 손 씻기, 조리, 보관, 해동, 교차 오염 방지 및 온도 오용 예방에 초점을 맞추어야 한다. WHO의 더 안전한 음식에 대한 5대 핵심은 이 과정에 도움이 된다.
- 음식을 준비하는 모든 사람은 교육에 세심한 주의를 기울여야 하며, 특히 어린이, 노인, 임산부 및 면역력이 약한 사람들의 음식을 준비할 때에는 특히 주의를 기울여야 한다.
- 위와 같은 소비자에 대한 위의 정보는 국가 매체, 건강관리 전문가, 식품위생 교육자, 제품 라벨, 팜플렛, 학교 커리큘럼 및 조리 시범과 같은 여러 채널을 통해 제공되어야 한다.
- 부엌에서 생닭을 씻는 경우 다른 음식과 사람이 접촉면에 닿지 않도록 하고, 다른 음식과 접촉으로 인한 오염 가능성을 최소화해야 한다. 생닭 도체 및(또는) 닭고기의 세척이 필요하다고 여겨질 때에는 다른 식품 및 사람이 접촉하는 표면과 다른 음식물의 오염 가능성을 최소화하는 방식으로 수행되어야 한다.
- 소비자는 생닭을 준비한 후 주방의 교차오염 가능성을 크게 줄일 수 있도록 하기 위하여 음식 접촉면을 씻고 소독해야 한다.

- **살모넬라균**

- 제품은 살모넬라균의 증식을 방지하는 온도에서 보관해야 한다.

**■ 위해 기반 제어조치**

- **살모넬라균**

- 닭고기는 살모넬라균에서 최소한  $10^7$  감소를 달성할 수 있는 공정에 따라 조리해야 한다.

## 제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 제 1 절 목표

#### 1. 연구과제 목표

| 구분   | 내용  |
|------|---|
| 최종목표 | <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 엔테라이티디스(<i>Salmonella</i> Enteritidis, SE) 저감화를 위한 종합적 방제 대책 수립에 필요한 조사 및 기초 데이터 확보</li> <li>◆ SE 저감화를 위한 진단/검사/방제법 개발, 가이드라인의 설정, 현장 적용 및 산업화</li> <li>◆ 개발 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 “살모넬라 국가종합방제대책” 수립</li> </ul> |
| 세부목표 | <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류농장 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사</li> <li>• 국내 가금류농장 내 살모넬라 발생 현황 조사</li> </ul> </li> <li>◆ SE 저감화 방법의 실험실 내 평가 및 농장 현장에서 농장별/사육형태별</li> </ul>   |

| 구분 | 내용  |
|----|---|
|    | <p>효능 평가 및 시제품 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 살모넬라 저감화방법 선별(유산균, 백신 및 박테리오파지의 개별 또는 혼합 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험 및 효과 확인)</li> <li>• 차단방역 시설 및 소독의 농가 환경 내 저감화 효과 확인 (계사 내 시설, 바닥, 음용수 및 환기시설 등),</li> <li>• 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP를 도출</li> </ul> <p>◆ 현장형 주요 살모넬라균 신속 진단/검사법 개발 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 육계/산란계 일반농가 및 복지농가 살모넬라균의 분포 확인 및 주요 혈청군 선별</li> <li>• Pan-genome 분석을 통한 SE 혈청형 특이 마커 진단</li> <li>• 선별된 혈청형 동정 및 신속 정밀 진단 기술 개발</li> <li>• 시제품 개발 및 현장적용 검증</li> </ul> <p>◆ 국내 육계/산란계 일반농가 및 복지농가 살모넬라균의 분포 확인 및 주요 혈청군 선별에 필요한 시험법 확립</p> <p>◆ 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 도출된 대응방법 및 SOP를 활용한 닭 복지농장의 우선 적용을 통해 살모넬라 억제 효능 가능 여부를 확인함</li> <li>• 닭 복지농장으로부터 살모넬라 저감화 방제사업 효과를 통한 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 확대 계획 연구 수립</li> <li>• 현장 및 연구실 내 의견 수렴을 통해 효율적, 위생적, 그리고 안전한 가금류의 생산을 위한 최적의 SOP 수립</li> </ul> |

## 2. 성과목표

(단위 : 건수, 백만원, 명)

| 성과목표    | 사업화지표  |      |      |           |     |     |     |     |      |      | 연구기반지표 |      |      |         |      |      |          |       |               |
|---------|--------|------|------|-----------|-----|-----|-----|-----|------|------|--------|------|------|---------|------|------|----------|-------|---------------|
|         | 지식 재산권 |      |      | 기술 실시(이전) |     | 사업화 |     |     |      |      | 기술인증   | 학술성과 |      |         | 교육지도 | 인력양성 | 정책 활용-홍보 |       | 기타 (타연구 활용 등) |
|         | 특허출원   | 특허등록 | 품종등록 | 건수        | 기술료 | 제품화 | 매출액 | 수출액 | 고용창출 | 투자유치 |        | SCI  | 비SCI | 논문평균 IF |      |      | 학술발표     | 정책 활용 |               |
| 단위      | 건      | 건    | 건    | 건         | 백만원 | 건   | 백만원 | 백만원 | 명    | 백만원  | 건      | 건    | 건    | 건       | 명    | 건    | 건        |       |               |
| 가중치     | 20     |      |      | 10        | 20  | 20  |     |     |      |      |        |      |      |         | 10   | 20   |          |       |               |
| 최종목표    | 2      | 1    |      | 1         | 5   | 1   | 50  |     |      |      |        | 2    | 2    | 3       | 3    | 1    |          |       |               |
| 1차년도    | 1      |      |      |           |     |     |     |     |      |      |        |      |      |         |      |      |          |       |               |
| 2차년도    | 1      |      |      | 1         | 5   |     |     |     |      |      |        | 1    | 1    |         | 3    | 1    |          |       |               |
| 소 계     | 2      | 1    |      | 2         | 5   | 1   | 50  |     |      |      |        | 2    | 2    | 3       | 3    | 1    |          |       |               |
| 종료 1차년도 |        | 1    |      |           |     | 1   | 50  |     |      |      |        | 1    | 1    | 2       |      |      |          |       |               |
| 종료 2차년도 |        |      |      |           |     |     |     |     |      |      |        | 1    |      |         |      |      |          |       |               |
| 소 계     |        | 1    |      |           |     | 1   | 50  |     |      |      |        | 2    |      |         |      |      |          |       |               |
| 합 계     | 2      | 1    |      | 1         | 5   | 1   | 50  |     |      |      |        | 2    | 2    | 3       | 3    | 1    |          |       |               |

\* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

## 제 2 절 목표 달성여부

### 1. 연구과제 목표 달성도

| 1차년도 |  |          |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |          |
|------|--|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----------|
| 일련번호 | 연구내용   | 월별 추진 일정 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 목표달성 (%) |
|      |  | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |          |
| 1    | SE 저감화 방법의 실험실 내 효능 평가                         |          |   |   |   | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | 100      |
| 2    | Pan-genome 분석을 통한 SE 혈청형 특이 마커 발굴              |          |   |   |   |   |   |   | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | 100      |
| 3    | 국내 및 해외 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사              |          |   |   |   | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |    |    |    | 100      |
| 4    | 살모넬라 저감화 방법 선별 및 효과 확인                         |          |   |   |   |   |   |   |   | ■ | ■  | ■  |    | 100      |
| 5    | 가금류 농가 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출              |          |   |   |   |   |   |   | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | 100      |
| 2차년도 |  |          |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |          |
| 1    | 살모넬라 SE 혈청형에 대한 real-time PCR 신속진단 키트 개발 및 상용화 | ■        | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |   |   |   |    |    |    | 100      |
| 2    | 시제품 개발 및 현장적용 검증                               |          |   |   |   |   |   |   | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | 100      |
| 3    | SE 저감화 방법의 농장 현장에서 농장별/사육형태별 효능 평가             |          | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |    |    |    | 100      |



## 1. 학술성과

### 가. 학술발표

| 번호 | 발표자 | 발표제목  | 발표일시       | 장소, 국명    |
|----|-----|---|------------|-----------|
| 1  | 배 열 | Effects of novel bacteriophage CJ22 for inhibiting <i>Clostridium perfringens</i> in the gut of broilers  | 2019-11-08 | 경주화백컨벤션센터 |
| 2  | 윤 영 | Antimicrobial activity of probiotic kefir yeasts against <i>Salmonella</i> Enteritidis and <i>Listeria monocytogenes</i>                                      | 2019-11-08 | 경주화백컨벤션센터 |
| 3  | 윤 영 | Evaluation of <i>Kluyveromyces marxianus</i> strains isolated from kefir as a Novel Probiotic Yeast   | 2019-11-08 | 경주화백컨벤션센터 |
| 4  | 서 호 | The survival and fate of <i>E. coli</i> O157:H7 and <i>L. monocytogenes</i> during maturing of unpasteurized raw milk Cheddar cheese                          | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 5  | 김 진 | Fate of <i>Vibrio uarahaemolyticus</i> artificially Inoculated onto raw squid during storage at 25 and 10 ° c   | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 6  | 윤 영 | Cell survival, growth, and biochemical characteristics of the potential probiotic yeast strain <i>Kluyveromyces marxianus</i> isolated from kefir             | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 7  | 윤 영 | Safety assessment of potential probiotic yeast in BALB/c mice: <i>Kluyveromyces marxianus</i> isolated from Korean kefir                                      | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 8  | 장 석 | Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of <i>Listeria monocytogenes</i> from raw beef and slaughterhouse environments in Korea        | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 9  | 서 호 | The physicochemical and organoleptic properties of dairy products added with various concentration of hyaluronic acid - A Preliminary Study                   | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 10 | 배 열 | Synergistic Effects of the Early administration of a Lactic Acid Bacterium and Yeast on the Inhibition of <i>Salmonella</i> Enteritidis Colonization in Young | 2020-11-05 | 부산 벵스코    |
| 11 | 윤 영 | Cell survival, growth, and biochemical characteristics of the potential probiotic yeast strain <i>Kluyveromyces marxianus</i> isolated from kefir             | 2020-10-30 | 온라인발표     |
| 12 | 장 석 | Prevalence, toxin - typing, and antimicrobial susceptibility of <i>Clostridium perfringens</i> from retail meats in Seoul, Korea                              | 2020-10-30 | 온라인발표     |

### 나. 논문

#### (1) SCI

: 본 과제를 통하여 살모넬라 저감화를 위한 유산균 균주의 개발 및 효능에 대한 논문이 가금분야의 최고 권위지인 SCI(E) 학술지인 “Poultry Science (PS) “에 “Synergistic effects of the early administration of *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 and *Kluyveromyces marxianus* KU140723-05 on the inhibition of *Salmonella*

Enteritidis colonization in young chickens“ 명으로 게재함. 이 외에도 SCI(E) 학술지인 Anaerobe에 ” Prevalence, toxin-typing, and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from retail meats in Seoul, Korea“ 명으로 게재함.

| 게재연도      | 논문명  | 저자명                     | 등록번호      |
|-----------|--|-------------------------|-----------|
| 2020-11-1 | Synergistic effects of the early administration of <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> DN1 and <i>Kluyveromyces marxianus</i> KU140723-05 on the inhibition of <i>Salmonella</i> Enteritidis colonization in young chickens | 배○렬, 김○현, 천○환, 송○영, 서○호 | 0032-5791 |
| Vol.(No.) | 학술지명   | SCI 구분                  | 국내외 구분    |
| 99(11)    | Poultry Science  | SCI                     | 국외        |

| 게재연도      | 논문명  | 저자명   | 등록번호      |
|-----------|--|---|-----------|
| 2020-8-1  | Prevalence, toxin-typing, and antimicrobial susceptibility of <i>Clostridium perfringens</i> from retail meats in Seoul, Korea | 장○석, 김○현, 배○렬, 김○형, 김○숙, 문○산, 송○영, 천○환, 서○호 | 1075-9964 |
| Vol.(No.) | 학술지명   | SCI 구분                                      | 국내외 구분    |
| 64        | Anaerobe   | SCI   | 국외        |

(2) 비SCI

: 본 과제를 통하여 살모넬라 저감화 관련 두 논문이 비SCI(E) 학술지인 “Journal of Dairy Science and Biotechnology 논문”에 ” Accurate and rapid Methods for detecting *Salmonella* spp. using polymerase chain reaction and aptamer assay from dairy products: A review“와 “Antibacterial activity of clove oil against foodborne pathogenic bacteria and sensory attributes in clove oil-enriched dairy products: A preliminary study“ 명으로 게재함.



# Synergistic effects of the early administration of *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 and *Kluyveromyces marxianus* KU140723-05 on the inhibition of *Salmonella* Enteritidis colonization in young chickens

Dongryeoul Bae, Dong-Hyeon Kim, Jung-Wan Chon, Kwang-Young Song, and Kun-Ho Seo<sup>1</sup>

**ABSTRACT** In this study, we aimed to assess the feasibility of the lactic acid bacterium *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 (LKF\_DN1) and the yeast *Kluyveromyces marxianus* KU140723-05 (KMA5), recently isolated from kefir, as probiotics. Specifically, we evaluated the effect of early administration of these 2 microbes on the inhibition of *Salmonella* Enteritidis (SE) colonization in neonatal chicks. We also examined the effects of exposure of chicks to probiotics before SE exposure on the reduction in the number of gut SE. A total of 108 1-day-old specific-pathogen-free male layer chicks were used for 3 independent experiments. The experimental chicks were randomly divided into 6 groups (negative control: basal diet [BD] without probiotics and SE; positive control: BD; probiotic group [PG] 1: BD + LKF\_DN1; PG2: BD + KMA5; PG3: BD + LKF\_DN1 + KMA5; and PG4: BD+ a commercial product IDF-7), all of which, except negative control, were coadministered with SE strain resistant to rifampicin (SERR). We found that the administration of

LKF\_DN1 and/or KMA5 reduced the number of viable cells of the SE strain in chicks by up to 1.90 log<sub>10</sub>, relative to positive control chicks. Compared with late administration (day [D] 10 and D11), early administration (D1 and D2) of the probiotics was more effective in reducing SE cell numbers in the gut. Furthermore, we detected no significant difference in the reduction of gut SE cell numbers in chicks from the same groups exposed to the probiotics at D10 and D11 before and after administration with SE. Collectively, our findings indicate that, as dietary additives, LKF\_DN1 and KMA5 showed potential probiotic activity in chicks. Moreover, the combination of the lactic acid bacteria and/or yeast strain was found to rapidly reduce SE numbers in the chick gut and showed a prolonged inhibitory effect against SE colonization. We, thus, propose that the administration of these 2 probiotics, as early as possible after hatching, would be considerably effective in controlling SE colonization in the guts of chicks.

**Key words:** poultry, probiotic, *Salmonella* Enteritidis, early administration, dietary additive

2020 Poultry Science 99:5999–6006

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.032>

## INTRODUCTION

It is estimated that approximately 1.2 million cases of the human disease salmonellosis occur annually in the United States, including 23,000 hospitalizations and 450 deaths (CDC, 2019). A significant proportion of human salmonellosis cases is caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*, SE), a zoonotic pathogen, which is contracted via the consumption of poultry and poultry-derived products

contaminated with pathogenic *Salmonella* spp. (Ao et al., 2015; Lee et al., 2015; Fguale, 2018). Poultry meats and eggs have been considered as the main reservoirs of SE (CDC, 2018; ECDC, 2018). The subtherapeutic use of antibiotics, which have prophylactic and growth-promoting effects in food-producing animals, contributed to meeting the demands for animal proteins and preventing bacterial diseases (Hao et al., 2014; Nhung et al., 2016). However, over the past few decades, restrictions on the prophylactic usage of antibiotics in animal feed have led to reductions in meat production and a concomitant increase in bacterial infections, resulting in economic losses in the poultry industry (Gadde et al., 2017). Moreover, there has been an increase in the frequency with which *Salmonella*-contaminated meats, eggs, or animal-derived products can enter the food chain, which may potentially have a high

© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Anaerobes in animal disease

## Prevalence, toxin-typing, and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from retail meats in Seoul, Korea



Yong-Seok Jang <sup>a,1</sup>, Dong-Hyeon Kim <sup>a,1</sup>, Dongryeoul Bae <sup>a</sup>, Se-Hyung Kim <sup>a</sup>,  
Hyunsook Kim <sup>b</sup>, Jin-San Moon <sup>c</sup>, Kwang-Young Song <sup>a</sup>, Jung-Whan Chon <sup>a</sup>, Kun-Ho Seo <sup>a,\*</sup>

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 5 February 2020  
Received in revised form  
29 May 2020  
Accepted 22 June 2020  
Available online 30 June 2020

Handling Editor: Francisco Uzal

### ABSTRACT

*Clostridium perfringens* is a ubiquitous, Gram-positive, spore-forming bacterium. It can contaminate many types of retail meat products and cause food poisoning by producing enterotoxins in the small intestines of humans and domestic animals. We investigated the prevalence, toxin-encoding gene profile, and antimicrobial resistance of *C. perfringens* in beef, chicken, and pork meat purchased from retail markets in Seoul, Korea. *C. perfringens* was detected according to the International Organization for Standardization 7937, with some modifications, and confirmed using the Vitek 2 system. In total, 38 *C. perfringens* strains were isolated from 200 meat samples (38/200, 19%); thirty-three from chicken, and five from beef). Among the six toxins evaluated, including alpha, beta, epsilon, iota, enterotoxin (encoded in the *cpe* gene), and netB, only the *cpe* gene was detected in all isolates by polymerase chain reaction (PCR) amplification. The antimicrobial resistance of the isolates was evaluated using the agar dilution method and resistance to ampicillin (12/38, 31.6%), tetracycline (38/38, 100%), chloramphenicol (26/38, 68.4%), metronidazole (13/38, 34.2%), and imipenem (27/38, 71%) was observed. Interestingly, 30 of the 38 isolates (78.9%) were multiple-drug resistant, showing resistance to more than three different antimicrobial classes.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Clostridium perfringens* is one of the most prevalent spore-forming, rapidly growing pathogenic bacteria in the world [1]. It is widely distributed in the environment and is present in soil, sewage, food, and dust [2]. *C. perfringens* has been recognized as a major public health risk, causing various human, and veterinary diseases [3]. Thus, food authorities in several countries have established the tolerance limit for the existence of *C. perfringens* in raw meat products; Korea has zero tolerance policy for meat products that are consumed raw and the USA has a performance standard of no more than one log growth during a stabilization step (cooling) after heat treatment [4,5].

Most diseases caused by *C. perfringens* are mediated by one or more toxins [6]. *C. perfringens* is classified into seven toxigenic

types, A to G, based on the production of six major toxins: alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), iota ( $\iota$ ), enterotoxin (CPE), and NetB [7]. All toxigenic types of *C. perfringens* produce the  $\alpha$  toxin that is encoded in the *cpa* gene. Additionally, type B produces  $\beta$  and  $\epsilon$  toxin, type C produces  $\beta$  toxin, type D produces  $\epsilon$  toxin, type E produces  $\iota$  toxin, type F produces CPE, and type G produces NetB [7]. *C. perfringens* food-borne illness is caused by type F strains that were formerly called CPE-positive *C. perfringens* type A strains [8]. Thus, determining the toxin type of *C. perfringens* isolates is critical to better describe the potential risk of the isolates and to trace the source of contamination in various food production steps [9].

*C. perfringens* causes a toxicoinfectious food-borne illness, in which both infection by viable bacterial cells as well as the  $\alpha$  toxin plays an important role in causing gastroenteritis in the host [10]. *C. perfringens* infections cause gas gangrene and food poisoning in humans and necrotizing enteritis in animals [11]. To minimize the economic losses caused by these infections, many antimicrobials, such as ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, metronidazole, and imipenem, have been used preemptively in the livestock

| 게재연도       | 논문명   | 저자명                                | 등록번호      |
|------------|---|------------------------------------|-----------|
| 2020-12-31 | Accurate and rapid Methods for detecting <i>Salmonella</i> spp. using polymerase chain reaction and aptamer assay from dairy products: A review | 현○연, 서○호,<br>천○환, 배○렬,<br>정○관, 송○영 | 2733-4554 |
| Vol.(No.)  | 학술지명  | SCI 구분                             | 국내외 구분    |
| 38(4)      | Journal of Dairy Science and Biotechnology  | 비SCI                               | 국내        |

| 게재연도       | 논문명  | 저자명                               | 등록번호      |
|------------|--|-----------------------------------|-----------|
| 2020-12-31 | Antibacterial activity of clove oil against foodborne pathogenic bacteria and sensory attributes in clove oil-enriched dairy products: A preliminary study | 천○환, 서○호,<br>배○렬, 김○, 정○관,<br>송○영 | 1075-9964 |
| Vol.(No.)  | 학술지명   | SCI 구분                            | 국내외 구분    |
| 38(4)      | Journal of Dairy Science and Biotechnology   | 비SCI                              | 국내        |

## 2. 정책 건의 · 활용



REVIEW

## Accurate and Rapid Methods for Detecting *Salmonella* spp. Using Polymerase Chain Reaction and Aptamer Assay from Dairy Products: A Review

Ji-Yeon Hyeon<sup>1†</sup>, Kun-Ho Seo<sup>2†</sup>, Jung-Whan Chon<sup>2</sup>, Dongryeoul Bae<sup>2</sup>, Dongkwan Jeong<sup>3</sup>, and Kwang-Young Song<sup>2,4\*</sup>



Received: November 27, 2020  
Revised: December 13, 2020  
Accepted: December 14, 2020

### Abstract

*Salmonella* spp. is the most common cause of gastrointestinal food poisoning worldwide, and human salmonellosis is mostly caused by the consumption of contaminated food. Therefore, the development of rapid detection methods for *Salmonella* spp. and rapid identification of the source of infection by subtyping are important for the surveillance and monitoring of food-borne salmonellosis. Therefore, this review introduces (1) History and nomenclature of *Salmonella* spp., (2) Epidemiology of *Salmonella* spp., (3) Detection methods for *Salmonella* spp. - conventional culture method, genetic detection method, molecular detection methods, and aptamer, and (4) Subtyping methods for *Salmonella* spp. - pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction (PCR).

### Keywords

*Salmonella* spp., dairy products, culture method, genetic- or molecular-based detection, aptamer, repetitive-sequence-based polymerase chain reaction (PCR)

Copyright © 2020 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Introduction

The World Health Organization (WHO) defines foodborne illnesses as diseases, usually either infectious or toxic in nature, caused by agents that enter the body through the ingestion of food [1]. It has been reported that in 2005 alone 1.8 million people died from diarrhoeal diseases and a great proportion of these cases can be attributed to contamination of food and drinking water [1]. For example, in the USA, it has been estimated that foodborne disease may cause up to 76 million cases, 325,000 hospitalizations, and 5,000 deaths occur each year [2]. Though viruses, bacteria, parasites, and a variety of chemicals are causes of foodborne disease, the leading known causes are bacterial. The widely cited USA estimate by Mead et al. [3] at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) is that non-typhoidal *Salmonella*, *Campylobacter*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* account for the vast majority of bacterial food-borne disease. In addition, a recent national surveillance study in Korea reported that non-typhoidal *Salmonella* is the most important bacterial cause of sporadic cases of foodborne-illness, and followed by *Staphylococcus aureus* and pathogenic *E. coli* [4]. *Salmonella* spp. is the most common cause of gastrointestinal

## ARTICLE

# Antibacterial Activity of Clove Oil against Foodborne Pathogenic Bacteria and Sensory Attributes in Clove Oil-Enriched Dairy Products: A Preliminary Study

Jung-Whan Chon<sup>1†</sup>, Kun-Ho Seo<sup>1†</sup>, Dongryeoul Bae<sup>1</sup>, Binn Kim<sup>1</sup>, Dongkwan Jeong<sup>2</sup>, and Kwang-Young Song<sup>1,3\*</sup>



Received: December 9, 2020  
Revised: December 13, 2020  
Accepted: December 14, 2020

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this study.

Copyright © 2020 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Abstract

This study was conducted to evaluate the antibacterial activity against *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enteritidis* as well as the sensory attributes of milk products supplemented with various concentrations (control, 0.5%, 1.0%, 1.5%, and 2.0%) of clove oil. In this study, clove oil was shown to have strong antibacterial activities. In addition, all the samples were assessed by ten researchers trained in five sensory attributes, namely, taste, flavor, color, texture, and overall acceptability. Compared to the control, 5% clove oil supplemented was the best in market milk, while in yogurt and kefir, 1.0% supplementation was the best. In terms of sensory attributes, the low score of color and flavor of market milk, yogurt, and kefir is attributed to the characteristics of the supplemented clove oil. Consequently, this study presents the possibility of producing bio-functional milk products supplemented with clove oil, and for controlling the growth of foodborne pathogenic bacteria in milk products using clove oil.

## Keywords

clove oil, antibacterial activity, sensory attributes, milk products, eugenol

## Introduction

Until now, the traditional medicine based on the herbal treatment would play a significant role in human's health care [1]. Especially, lots of plants for medicine have been gaining wider acceptance, because it is natural production. Furthermore, various medicinal plants have a few side effects and higher efficiency than the artificially synthesized chemicals [1]. In fact, over 80% of the world's people would rely on traditionally plant-derived medicines which are the primary ways for healing their health [1].

Among them, clove (*Syzygium aromaticum* (synonym) *Eugenia caryophyllata*) is a significant medicinal plant which is widely used in folk medicine in many nations, because of its wide broad of various pharmacological functions [2]. Generally, clove is an medium size tree (8-12 m) from Mirtaceae family native from the Maluku islands in east Indonesia, Brazil, Sri Lanka, Madagascar, Tanzania, and so on [2,3].

Especially, the clove essential oil was generally extracted from the dry floral bud of the clove tree, and has various biofunctional activities on account of the presence of eugenol (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) and other phenolic compounds [4]. For example, clove oil could act

|                          |  |                                 |                  |
|--------------------------|--|---------------------------------|------------------|
| <b>양 식</b>               | <b>정책건의/시행</b>   | ※ 정부시책, 법령개정, 매뉴얼(지침), 시스템 반영 등 |                  |
| <b>과제명</b>               | 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발   |                                 |                  |
| <b>건의명</b>               | 농장 내 Salmonella 검출에 따른 대책 강구 및 강화  |                                 |                  |
| <b>주관부처<br/>(담당자)</b>    | 농림축산식품부<br>조류인플루엔자 방역과<br>(안영창 주무관)  | <b>건의일자<br/>(제출일)</b>           | 2020년 12월<br>05일 |
| <b>시책명</b>               | 미정   | <b>시행일<br/>(시행예정일)</b>          | 미정               |
| <b>주요내용 요약</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 살모넬라 무검출 인증 제도 도입 및 HACCP 인증제 개선 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시설과 관리에 대한 SOP만이 강조되어 있으므로, 살모넬라와 같은 유해항목에 대한 재현성 있는 사후관리 방안이 부재되어 있어 이를 개선할 필요가 있음.</li> <li>- 국내에 알맞은 살모넬라 무검출 인증 제도 도입</li> </ul> </li> <li>○ 살모넬라 모니터링 프로그램 개선 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 현재 농가 내 살모넬라 혈중 항체가를 통한 감염 여부를 판단하고 있으므로, 항원 검사방법으로의 교체 요구</li> <li>- 사육두수 당 검사 시료수를 늘릴 것을 요구</li> <li>- 살모넬라 분석 및 검출의 정확성 향상</li> </ul> </li> </ul>  |                                 |                  |
| <b>기대효과</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 농장 및 부화장에 적용 가능한 살모넬라 모니터링 기술 및 살모넬라 제어 모델이 마련되어 있지 않아 현재는 관련 시장이 형성되어 있지 않으나 각각의 사육단계별 모니터링 기법과 살모넬라 제어 모델이 확립될 경우 살모넬라 부재 계육의 생산이 가능해지고 이를 통하여 계육시장의 확대기반을 마련할 수 있을 것으로 예상됨.</li> <li>○ 살모넬라 등 식중독 유발 질병 부재 안전 축산물의 시장 형성 및 국내 축산물의 위생과 안전성 수준 향상을 통한 관련 산업 육성이 가능함.</li> <li>○ 살모넬라 부재 병아리 및 계육의 부가가치 증가</li> <li>○ 보다 위생적이고 안전한 계육의 생산과 공급이 원활히 이루어져 공중보건학적 가치가 상당히 크며, 위생적인 양계 생산기반 정착으로 양계농가 보호 및 시민건강 증진을 기대할 수 있음.</li> <li>○ 또한 계육의 생산 및 유통과정에서 살모넬라가 오염될 수 있다는 경각심을 부여하여 차단방역 관련 의식을 고취해 기타 질병에 대한 예방 역시 가능함.</li> </ul> |                                 |                  |
| <b>증빙자료 1<br/>(하단별첨)</b> | ※ 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화 정책건의 서   |                                 |                  |
| <b>증빙자료 2<br/>(하단별첨)</b> | ※ 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화 정책제안 (문서관리카드 접수)<br>※ 문서 접수 관련 메일 내용 캡처본   |                                 |                  |

<증빙자료 1>

건의내용

Better Protection Through Research

KCAV

주식회사 카브

수신자 농림축산식품부

(참조) 농림축산식품부

제목 '농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화' 정책제안 건

1. 당사는 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화에 관한 정책건의 사항을 전달 드립니다.
2. 첨부문서: 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화

주식회사 카브 대표이사



전임연구원 김규직

선임연구원 주효선

수석연구원 윤하나

대표이사 송창선

협조자 대리 고단비

본부장 엄효숙

시행 KCAV-R-2012-001

(2020-12-05)

접수

본점 주소

연구소

우)

전화

**건의내용**

1. 정책건의

**정 책 건 의**  
**Policy Application (PA)**

|                 |   |            |               |                  |                |
|-----------------|---|------------|---------------|------------------|----------------|
| <b>1. 과 제 명</b> | 동물복지 인증농장 및 일반농장 유래 산란계 및 육계의 항병성에 관한 비교 연구 |            |               |                  |                |
| <b>2. 제 목</b>   | 농장 내 Salmonella 검출에 따른 대책 강구 및 강화           |            |               |                  |                |
| <b>3. 연 구 원</b> | <b>성 명</b>                                  | <b>직 급</b> | <b>과 (부서)</b> | <b>연 구 실 (팀)</b> | <b>참여율 (%)</b> |
| a. 주담당자         | 김O직   | 전임연구원      | 주식회사<br>카브    | 연구개발팀            | 50%            |
| b. 담 당 자        | 송O선   | 대표이사       | 주식회사<br>카브    |                  | 50%            |

**4. 정책건의사항**

가. 살모넬라 무검출 인증 제도도입 및 HACCP 인증제 개선  
 나. 살모넬라 모니터링 프로그램 개선

**5. 정책건의 내용요약**

가. 살모넬라 무검출 인증 제도도입 및 HACCP 인증제 개선  
 1) 시설과 관린에 대한 SOP만이 강조되어 있으므로, 살모넬라와 같은 유해항목에 대한 재현성 있는 사후관리 방안이 부재되어 있어 이를 개선할 필요  
 2) 국내에 알맞은 살모넬라 무검출 인증제도 도입

나. 살모넬라 모니터링 프로그램 개선  
 1) 현재 농가 내 살모넬라 혈중 항체가를 통한 감염 여부를 판단하고 있으므로, 항원 검사 방법으로서의 교체가 요구됨.  
 2) 사육두수 당 검사 시료수를 늘릴 필요가 있음.  
 3) 살모넬라 분석 및 검출의 정확성 향상

**6. 색인용어** | 살모넬라, 동물복지 사육 농가, 식중독균



정책건의 기술서

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| 과 제 명<br>(영문) | 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법<br>개발   | 과 제 코 드   |
|               | (Development of comprehensive control measures<br>for reducing <i>Salmonella</i> spp. in poultry) | 119055-22 |

|      |                             |    |    |    |               |
|------|-----------------------------|----|----|----|---------------|
| 제 목  | 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화 |    |    |    |               |
| 주담당자 | 김O직                         | 직급 | 대리 | 소속 | 주식회사 카브 연구개발팀 |
| 담당자  | 김O직                         |    |    |    |               |

1. 현황 및 문제점

- 가. 닭고기에 대한 연간 소비량은 매년 증가 추세에 있으며, 이에 발맞추어 실용계 사육두수 역시 증가 추세에 있음.
- 나. 이와 같이 실용계 사육두수는 증가하고 있으나, 국내 실정에 맞는 동물복지인증 농장의 적절한 규제가 존재하지 않음.
- 다. 유럽과 미국 등에서는 여러 등급에 맞추어 동물 복지농가에서 생산한 제품들을 구분하고 있으나, 국내에서는 아직 이에 대한 구체적인 체계가 없음.
- 라. 이중 살모넬라는 특히 전세계적으로 사람 식중독 유발의 주요 원인체로 국가 차원의 발생 감시 및 방제 연구가 지속적으로 요구되고 있음.
- 마. 가금 생산물(계육, 계란)은 식중독 발생의 최대원인으로 꼽히고 있으며, 최근 국내에서 발생한 식중독 사고들 역시 살모넬라균에 감염된 위의 재료들을 이용하여 제조된 가공식품이 문제인 것으로 밝혀짐. 이와 같은 이유로 인해 강원도에서는 살모넬라 식중독 예방 활동을 적극적으로 실시하고 있으며, 기타 자치단체들 역시 예방에 힘을 기울이고 있음.
- 바. 이와 같은 이유로 인해 전세계적으로 살모넬라가 검출되지 않은 가금 생산물(계육, 계란)에 대하여 인증제를 부여하는 제도가 시행되고 있음. 하지만, 현재까지 국내에서는 이러한 제도가 확립되지 않음.
- 사. 국내 부화장, 종계장, 육계농장 및 도계장에서의 식중독 유발 살모넬라를 포함한 다양한 종류의 살모넬라가 분리되고 있고, (Lee et al., characteristics of *Salmonella* spp isolated from an integrated broiler chicken operation in

Korea, 2006, J. Vet Med. Sci. 69(4): 399-404) 종계장 유래의 살모넬라가 부화장, 육계 농장을 거쳐 도축장까지 전달된다는 연구 내용을 고려할 때 육계 농장 및 최종 상품에 대한 모니터링 및 살모넬라 제어뿐만 아니라 부화장과 종계 사육과정부터의 모니터링과 살모넬라 통제가 절실한 상황임.

아. 2013년부터 진행된 종계장, 부화장 및 농장에서의 살모넬라 검출 결과 다양한 혈청형의 살모넬라가 다수 검출됨을 확인하였음. 또한, 유통되고 있는 계육 가공품에서도 역시 살모넬라가 검출되었으므로 이 과제를 통해 살모넬라의 검출을 재검증하며, 나아가 모니터링 방법을 변화시킬 필요가 있을 것으로 사료됨.



[그림 1. 축종별 국내 사육마릿수 동향]

## 2. 주요 연구성과

### 가. 농가 선정

- 1) 국내 산란계 농장 중 동물복지 사육방식과 관행적인 사육방식을 택한 농장 각 5곳씩 총 10곳의 농장을 선정하였음.
- 2) 국내 육계 농장 중 동물복지 사육방식을 택한 5곳과 관행적인 사육방식을 택한 농장 10곳을 선정하였음.
- 3) 관행적인 사육방식을 택한 육계농가를 제외한 나머지 15곳의 농가는 1년에 두 번씩 방문하여 살모넬라 동정을 실시하였음.

### 나. 농가 내 살모넬라 동정

- 1) 농장 내에서 사용되고 있는 물품이나 건물로부터 살모넬라 동정을 위한 샘플을

채취하였음.

- 2) 살모넬라가 의심되는 샘플은 Polymerase chain reaction (PCR) 방법을 이용해 최종 진단하였음.
- 3) 산란계의 경우 복지사육 방식을 택한 B농장 음수대에서 한 개의 샘플 (0.7%)만이 살모넬라 양성으로 확진되었으나, 혈청형 검사 결과 식중독의 주요 원인균으로 밝혀진 ser.Enteritidis로 확인되었음.
- 4) 반면, 관행적인 케이지 사육방식을 택한 농가에서는 110개의 샘플에서 양성 샘플이 확인되지 않았음.

| 구분  |      |    |      | 살모넬라 샘플 |      |      |      |      |      |      |       |      |
|-----|------|----|------|---------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 종   | 사육방식 | 농가 | 방문회차 | 난상      | 횃대   | 사료통  | 음수대  | 슬릿   | 팬    | 계    |       |      |
| 산란계 | 복지   | A  | 1차   | 0/2     | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10 |       |      |
|     |      |    | 2차   | 0/4     | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20 |       |      |
|     |      | B  | 1차   | 0/2     | 0/2  | 0/2  | 1/2  | 0/2  | -    | 1/10 |       |      |
|     |      |    | 2차   | 0/4     | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20 |       |      |
|     |      | C  | 1차   | 0/2     | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10 |       |      |
|     |      |    | 2차   | 0/4     | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20 |       |      |
|     |      | D  | 1차   | 0/2     | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10 |       |      |
|     |      |    | 2차   | 0/4     | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20 |       |      |
|     |      | E  | 1차   | 0/2     | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10 |       |      |
|     |      |    | 2차   | 0/4     | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20 |       |      |
|     |      | 계  |      |         | 0/26 | 0/26 | 0/26 | 1/26 | 0/18 | 0/8  | 1/130 |      |
|     |      | 관행 | 농가   | F       | 방문회차 | 사료통  | 계란벨트 | 바닥   | 팬    | 분변벨트 | 벽     | 계    |
|     |      |    |      |         | 1차   | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -     | 0/10 |
|     |      |    |      | 2차      | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20  |      |
|     | G    |    |      | 1차      | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10  |      |
|     | H    |    |      | 1차      | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10  |      |
|     | I    |    |      | 1차      | 0/2  | 0/   | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10  |      |
|     |      |    |      | 2차      | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20  |      |
|     | J    |    |      | 1차      | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | 0/2  | -    | 0/10  |      |
|     |      |    |      | 2차      | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/2  | 0/2  | 0/20  |      |
|     | 계    |    |      |         | 0/22 | 0/22 | 0/22 | 0/22 | 0/16 | 0/6  | 0/110 |      |

[표1. 산란계 농가 살모넬라 동정 결과]

- 5) 육계의 경우 복지사육 방식을 택한 농가 샘플 총 200개 중 21개의 샘플 (10.5%)이 양성으로 확인되었으며, 특정한 물품에 한정되어 있지 않는 경향을

보임.

- 6) 복지사육 방식의 농가에서 검출된 살모넬라는 대부분 ser.Grampian과 ser.Virchow로 확인되었음.
- 7) 관행적인 케이지 사육방식의 육계 농가에서는 복지농가에서보다 적은 7개의 샘플 (3.5%)이 살모넬라 양성으로 확인되었으며, 일부 ser.Senftenberg와 ser.Enteritidis로 확인되었음.

| 구분   |       | 살모넬라 샘플 |       |       |      |      |      |      |      |       |      |        |
|------|-------|---------|-------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|--------|
| 중    | 사육 방식 | 농가      | 방문 회차 | 음수 기  | 사료 통 | 팬    | 온풍 기 | 벽    | 문    |       | 계    |        |
| 산란 계 | 복지    | K       | 1차    | 1/3   | 1/3  | 082  | 1/2  | 3/7  | 0/1  | 0/2   |      |        |
|      |       |         | 2차    | 1/3   | 2/3  | 1/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2   | 4/20 |        |
|      |       | L       | 1차    | 0/3   | 1/3  | 2/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 2/2   | 5/20 |        |
|      |       |         | 2차    | 0/3   | 1/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2   | 1/20 |        |
|      |       | M       | 1차    | 0/3   | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2   | 0/20 |        |
|      |       |         | 2차    | 1/3   | 1/3  | 1/2  | 0/2  | 1/7  | 0/1  | 0/2   | 4/20 |        |
|      |       | N       | 1차    | 0/3   | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2   | 0/20 |        |
|      |       |         | 2차    | 0/3   | 0/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2   | 0/20 |        |
|      |       | O       | 1차    | 0/3   | 1/3  | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/11 | 0/2   | 1/20 |        |
|      |       |         | 2차    | 0/3   | 03   | 0/2  | 0/2  | 0/7  | 0/1  | 0/2   | 0/20 |        |
|      |       | 계       |       |       | 3/30 | 7/30 | 4/20 | 1/20 | 4/70 | 0/10  | 2/20 | 21/200 |
|      |       | 관행      | 농가    | 방문 회차 | 음수 기 | 사료 통 | 팬    | 온풍 기 | 벽    | 문     |      | 계      |
|      |       |         | P     | 1차    | 0/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 1/6  | 0/1   | -    | 1/20   |
|      |       |         | Q     | 1차    | 1/4  | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 1/6  | 0/1   | -    | 2/20   |
|      | R     |         | 1차    | 0/4   | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 1/6  | 0/1  | -     | 1/20 |        |
|      | S     |         | 1차    | 0/4   | 0/4  | 0/3  | 1/2  | 0/6  | 0/1  | -     | 1/20 |        |
|      | T     |         | 1차    | 0/4   | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | -     | 0/20 |        |
|      | U     |         | 1차    | 0/4   | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | -     | 0/20 |        |
|      | V     |         | 1차    | 0/4   | 0/4  | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | -     | 0/20 |        |
| W    | 1차    |         | 0/4   | 0/4   | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | -    | 0/20  |      |        |
| X    | 1차    |         | 0/4   | 0/4   | 0/3  | 0/2  | 0/6  | 0/11 | -    | 0/20  |      |        |
| Y    | 1차    |         | 0/4   | 0/4   | 0/3  | 1/2  | 1/6  | 0/1  | -    | 2/20  |      |        |
| 계    |       |         | 1/40  | 0/40  | 0/30 | 2/20 | 4/60 | 0/10 | -    | 7/200 |      |        |

[표2. 육계 농가 살모넬라 동정 결과]

### 3. 정책건의 사항

가. 살모넬라 무검출 인증 제도도입 및 HACCP 인증제 개선

- 1) 현행 농장 및 도계장 관리 HACCP은 시설과 관리에 대한 SOP만이 강조되어있

어 인증을 획득한 곳으로부터 생산되는 식품(닭고기 및 식란)으로부터의 살모넬라와 살충제 같은 유해항목에 대한 재현성있는 무검출 및 사후관리 방안이 부재되어 있음. 이와 같은 연유로 인해 HACCP 인증을 받은 유통식품 중 살모넬라 또는 살충제가 검출되는 경우가 다수 있어 HACCP 인증제에 대한 개선요구가 절실함.

- 2) 식품의 안전에 대한 요구가 증가되고 있는 현재 계육의 살모넬라 오염에 근원이 되는 부화장, 종계장 및 육계농장에서 HACCP 같은 프로그램이 시행되고 있지만 현실과 동떨어진 규정이 많아 현 축산물 안전관련 행정의 사각지대에 놓여있음.
- 3) 현재 전세계적으로 살모넬라가 검출되지 않은 계육 및 계란에 대하여 인증제를 부여하는 제도가 시행되고 있음. 하지만, 현재까지 우리나라에서는 이러한 제도가 확립되지 않음. 따라서, 선진국에서 시행하고 있는 살모넬라 무검출 인증제도를 파악하여 국내에 알맞은 제도로 개선하여 적용할 필요가 있음.

#### 나. 살모넬라 모니터링 프로그램 개선

- 1) 현재까지의 농장 살모넬라 정기 검진은 혈청 내 항체가 판단을 기준으로 삼고 있으나, 이는 정확한 살모넬라 분석에 어려움이 있음. 또한, 백신주와 야외주 감염의 판단이 어려운 연유로 인해 아직까지 종계에 대한 살모넬라 백신접종이 금지되고 있어 효율적인 예방에 어려움을 겪고 있음. 따라서, 혈청으로 인한 살모넬라 감염 확인이 아닌 환경 모니터링을 통한 정확한 살모넬라 분석이 요구됨.
- 2) 살모넬라는 조류인플루엔자와 같은 바이러스 질병과 같이 이병률이 높지 않다는 특징을 지니고 있음. 하지만, 현재 HACCP의 미생물검사 시행기준은 1회당 검사 시료수가 26개 이상이며 이중 최대 허용 검출율은 18% 이내로 높은 사육두수에 비하여 턱없이 부족한 검사시료수와 높은 허용 검출율로 인해 정확한 살모넬라 검출이 이루어지지 않고 있음. 따라서, 다수의 환경 내 샘플 채취로 검사 방법을 변경할 것이 필요함.
- 3) 현재까지 정확한 생산단계에서 검출된 살모넬라에 대한 정확한 분석이 이루어지지 않아 적절한 사후 대책이 정립되지 않고 있음. 특히, 여름에는 계육의 판매량이 급증함에 따라 도계장에서의 생산라인이 계속하여 가동되고 있지만 칠러수 교체와 같은 적절한 소독과정이 생략되고 있음. 이와 같은 문제점을 개선하기 위해 선 살모넬라 검출 후 정확한 분석이 중요시 되고 있음. 따라서, 혈청 내 항체가 검사보다는 환경 내 살모넬라의 검출이 더 적절한 검사 방법임.

#### 4. 기대효과

- 가. 국내 농장 및 부화장에 적용 가능한 살모넬라 모니터링 기술 및 살모넬라 제어 모델이 마련되어 있지 않아 현재는 관련 시장이 형성 되어 있지 않으나 각각의 사육 단계별 모니터링 기법과 살모넬라 제어 모델이 확립될 경우 살모넬라 부재 계육의 생산이 가능해지고 이를 통하여 계육시장의 확대기반을 마련할 수 있을 것으로 예상된다.
- 나. 살모넬라 등 식중독 유발 질병 부재 안전 축산물의 시장 형성 및 국내 축산물의 위생과 안전성 수준 향상을 통한 관련 산업 육성이 가능함.
- 다. 살모넬라 부재 병아리 및 계육의 부가가치 증가
- 라. 보다 위생적이고 안전한 계육의 생산과 공급이 원활히 이루어져 공중보건학적 가치가 상당히 크며, 위생적인 양계 생산기반 정착으로 양계농가 보호 및 시민건강 증진을 기대할 수 있음.
- 마. 또한 계육의 생산 및 유통과정에서 살모넬라가 오염될 수 있다는 경각심을 부여하여 차단방역 관련 의식을 고취해 기타 질병에 대한 예방 역시 가능함.

#### <증빙자료 2>

| 시행내용  |
|---|
| <p>정책건의 문서 접수 알림([주식회사 카브] 농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책강구) <span>받은편지함</span></p> <p>"안영창"<br/>나, "도수지", "김준걸"에게<br/>안녕하세요. 김규직 선생님.</p> <p>귀 축에서 보낸 정책건의 1건에 대하여 불임과 같이 문서를 접수하였으며<br/>향후 담당 기관 및 부서에서 정책 추진시 참고하겠습니다.<br/>농림식품축산식품부 조류인플루엔자 방역과<br/>안영창 주무관</p> <p></p> |

## ☐ 문서관리카드(접수용)

### ● 문서정보

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| 제 목   | '농장 내 살모넬라 검출에 따른 대책 강구 및 강화' 정책제안 |
| 과제카드명 | 단위                                 |
|       | 관리                                 |
| 본 문   |                                    |
| 붙 임   | [주식회사 카브] 살모넬라 정책제안 공문.zip         |

### ● 보고경로

| 구분  | 접 수 기 관    |            |      |       |
|-----|------------|------------|------|-------|
|     | 부서명        | 직위/성명      | 처리결과 | 의견/지시 |
| 담당자 | 조류인플루엔자방역과 | 주무관<br>안영창 |      |       |

### ● 시행정보

|        |         |        |                                  |
|--------|---------|--------|----------------------------------|
| 발신기관명  | 주식회사 카브 | 발신명의   |                                  |
| 생산등록번호 |         | 접수등록번호 | 조류인플루엔자방역과-7592<br>(2020.12.21.) |
| 생산기관경로 |         |        |                                  |
| 공개여부   | 대국민 공개  |        |                                  |
| 비공개 사유 |         |        |                                  |
| 수 신    |         |        |                                  |
| (경 유)  |         |        |                                  |

### ● 관리정보

|      |  |
|------|--|
| 지식공유 |  |
|------|--|

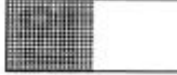
## 3. 지식재산권 성과

### 가. 특허출원

- 개발된 기술을 기반으로 2건의 특허를 출원함

| 출원연도       | 특허명  | 출원인         | 출원국  | 등록기탁번호          |
|------------|--|-------------|------|-----------------|
| 2019-11-28 | 락토케피아노파시엔스 케피아노파시엔스 DN1 균주를 포함하는 사료 첨가제 조성물      | 건국대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2019-015585  |
| 2020-12-11 | 클루이베로미세스 막시아누스 A5를 포함하는 장내 미생물균총 개선용 프로바이오틱스 조성물 | 건국대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2020-0173265 |

발급번호 : 5-5-2021-005043782



## 출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

|  |            |  |                      |                               |                 |
|--|------------|--|----------------------|-------------------------------|-----------------|
| 출원인<br>Applicant   | 성명<br>Name | 건국대학교 산학협력단<br>Konkuk University Industrial Co operation Corp  | 주민번호<br>Residence No |                               |                 |
|  | 주소         |  |                      |                               |                 |
| 발명자<br>Inventor  | 성명<br>Name | 서건호<br>Kun-Ho Seo  | 주민번호<br>Residence No |                               |                 |
|  | 주소         |  |                      |                               |                 |
|  | 성명<br>Name | 배동렬<br>DONGYEOL BAE  | 주민번호<br>Residence No |                               |                 |
|  | 주소         |  |                      |                               |                 |
|  | 성명<br>Name | 김동현<br>Dong-Hyeon Kim  | 주민번호<br>Residence No |                               |                 |
| 주소   |            |  |                      |                               |                 |
| 대리인<br>Agent   | 성명         | 위병갑  | 대리인 번호               |                               | 9-2004-000155-3 |
|  | 주소         | 서울특별시 강남구 테헤란로33길 77층(대영빌딩)(위특허법률사무소)  |                      |                               |                 |
| 출원번호<br>Application Number   |            | 특허-2019-0155585<br>PATENT-2019-0155585   | 출원일자<br>Filing Date  | 2019년 11월 28일<br>NOV 28, 2019 |                 |
| 발명(고안)의 명칭,<br>디자인을 표현할 물품,<br>상품(서비스업)류 구분<br><br>Title of Invention,<br>Product(s) Embodied<br>in Design, or<br>Classification of Mark |            | 락토케피아노파시엔스 케피아노파시엔스 DN1 균주를 포함하는 사료 첨가제 조성물<br>FEED ADDITIVE COMPOSITION CONTAINING LACTOBACILLUS KE FIRANOFACIENS DN1 |                      |                               |                 |
| 용도   | 확인용        | IPC 분류   | A23K 20/00           |                               |                 |
| 최종처분상태   |            | 최종처분일  |                      |                               |                 |
| 심사청구유무   | N          | 심사청구일자   |                      |                               |                 |
| 위 사실을 증명함.   |            |  |                      |                               |                 |



This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office

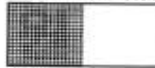
2021년 02월 01일

특 허 청  
COMMISSIONER



◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허권-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서하단의 QR코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

발급번호 : 5-5-2021-005043782



출원사실증명원  
CERTIFICATE OF APPLICATION

|  |            |  |                      |                               |
|--|------------|--|----------------------|-------------------------------|
| 출원인<br>Applicant   | 성명<br>Name | 건국대학교 산학협력단<br>Konkuk University Industrial Co<br>operation Corp   | 주민번호<br>Residence No | [Redacted]                    |
|  | 주소         |  |                      |                               |
| 발명자<br>Inventor  | 성명<br>Name | 서건호<br>Kun-Ho Seo  | 주민번호<br>Residence No |                               |
|  | 주소         |  |                      |                               |
|  | 성명<br>Name | 배동렬<br>DONGYEOUL BAE   | 주민번호<br>Residence No |                               |
|  | 주소         |  |                      |                               |
|  | 성명<br>Name | 송광영<br>Kwang-Young Song  | 주민번호<br>Residence No |                               |
|  | 주소         |  |                      |                               |
|  | 성명<br>Name | 윤혜영<br>Hye-Young Youn  | 주민번호<br>Residence No |                               |
|  | 주소         |  |                      |                               |
| 대리인<br>Agent   | 성명         | 위병갑  | 대리인 번호               | 9-2004-000155-3               |
|  | 주소         | 서울특별시 강남구 테헤란로33길 7 7층(대영빌딩)(위특허법률사무소)   |                      |                               |
| 출원번호<br>Application Number   |            | 특허-2020-0173265<br>PATENT-2020-0173265   | 출원일자<br>Filing Date  | 2020년 12월 11일<br>DEC 11, 2020 |
| 발명(고안)의 명칭,<br>디자인을 표현할 물품,<br>상품(서비스업)류 구분<br><br>Title of Invention,<br>Product(s) Embodied<br>in Design, or<br>Classification of Mark |            | 클루이베로미세스 막시아누스 AS를 포함하는 장내 미생물균총 개선용 프로바이오틱스 조성물<br>PROBIOTICS COMPOSITION FOR IMPROVING INTESTINAL MICROBIOTA CONTAINING KLUYVEROMYCES MARXIANUS AS |                      |                               |

|  |     |        |               |
|--|-----|--------|---------------|
| 용       도  | 확인용 | IPC 분류 | A23L 33/135   |
| 최 종 처 분 상 태  |     | 최종처분일  |               |
| 심 사 청 구 유 무  | Y   | 심사청구일자 | 2020년 12월 11일 |
| <p>위 사실을 증명함.<br/>This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2021년 02월 01일</p> <p>특 허 청<br/>COMMISSIONER</p>  |     |        |               |
| <p>◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허권-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서번호의 바코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.</p>   |     |        |               |

#### 4. 기술실시(이전) 성과

- 건국대학교 산학협력단에서 개발한 기술을 기술료 5,000,000원에 (주)센서젠에 이전하여 기술실시를 진행함

# 기술이전 계약서(통상실시)

■ 계약명 : "락토케피아노파시엔스 케피아노파시엔스 DNI 균주를 포함하는 사료 첨가제 조성물" 특허에 관한 기술이전



2020년 12월 14일

계약당사자

(갑)

주소 : [Redacted]

기관 : 건국대학교 산학협력단

대표 : 단장 송 창 선 (인)

연구개발책임자 : 수의학과 지 건 호 교수

담당자 : 기술사업화팀 김인호 주임, 이동필 변리사

연락처 : [Redacted]  
이메일 : [Redacted]

(을)

주소 : [Redacted]

상호 : 주식회사 센서켄

대표 : 대표이사 서 권 호 (인)

담당자 : 행정직원 조유미

연락처 : [Redacted]  
이메일 : [Redacted]

## 5. 사업화 성과

가. 제품화

- 병원성세균 살모넬라 그룹 D 신속 검출용 PCR 키트 개발
- 현재 최종 제품화를 위해 보관 및 온도에 따른 검출 능력에 대한 평가가 현재 진행 중이어서 올해 9월경에 최종제품화가 이루어질 것으로 예상함.

| 제품명              | 제품사진  | 제품용도                      | 제품 출시일            |
|------------------|---|---------------------------|-------------------|
| 센서젠 SD<br>검출용 키트 |  | 병원성세균 살모넬라<br>그룹 D 신속 검출용 | 2021.9.1.<br>(예정) |

나. 사업화 계획 및 매출 실적 예상

| 항 목            | 세부 항목                                | 성 과  |      |     |     |
|----------------|--------------------------------------|--|------|-----|-----|
| 사업화 계획         | 사업화 소요기간(년)                          | 1  |      |     |     |
|                | 소요예산(백만원)                            | 10   |      |     |     |
|                | 예상 매출규모<br>(억원)                      | 현재까지   | 3년후  | 5년후 |     |
|                |                                      |  | 50   | 150 |     |
|                | 시장<br>점유율                            | 단위(%)  | 현재까지 | 3년후 | 5년후 |
|                |                                      | 국내   |      | 10  | 25  |
| 국외             |                                      |  | 1    | 5   |     |
|                | 향후 관련기술,<br>제품을 응용한 타<br>모델, 제품 개발계획 | 농장 및 주요 식중독 세균에 대한 신속 검출을 위한 상온<br>보존기간이 길며 목적세균에 대한 민감도와 특이도가 향상<br>된 동결건조 PCR 키트 개발 계획 |      |     |     |
| 무역 수지<br>개선 효과 | (단위: 억원)                             | 현재   | 3년후  | 5년후 |     |
|                | 수입대체(내수)                             |  | 0.5  | 1.5 |     |
|                | 수 출                                  |  | 0.5  | 2.5 |     |

6. 고용창출 성과

## 4대 사회보험 사업장 가입자 명부

|         |                |               |                  |               |             |
|---------|----------------|---------------|------------------|---------------|-------------|
| 발급번호    | 20210127991521 | 발급일시          | 2021-01-27 16:50 | 사업장 관리번호      | 20687036820 |
| 구분      | 국민연금           | 건강보험          | 산재보험             | 고용보험          |             |
| 사업자등록번호 | 206-87-03682   | 206-87-03682  | 206-87-03682     | 206-87-03682  |             |
| 사업장 명칭  | 주식회사카브 (KCAV)  | 주식회사카브 (KCAV) | 주식회사카브 (KCAV)    | 주식회사카브 (KCAV) |             |

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)

1 / 2

| 연번 | 주민(외국인)<br>등록번호 | 성명 | 자격취득일      |            |            |            |
|----|-----------------|----|------------|------------|------------|------------|
|    |                 |    | 국민연금       | 건강보험       | 산재보험       | 고용보험       |
| 1  | *****           | 박영 |            | 2020.10.01 | 2020.10.01 | 2020.10.01 |
| 2  | *****           | 송선 |            | 2015.06.01 |            |            |
| 3  | *****           | 박필 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 |
| 4  | *****           | 염숙 | 2017.04.01 | 2017.04.01 | 2017.04.01 | 2017.04.01 |
| 5  | *****           | 남기 | 2020.10.01 | 2020.10.01 | 2020.10.01 | 2020.10.01 |
| 6  | *****           | 윤나 | 2015.04.01 | 2015.04.01 | 2015.04.01 | 2015.09.01 |
| 7  | *****           | 김태 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2021.01.01 |
| 8  | *****           | 이계 | 2018.03.01 | 2018.03.01 | 2018.03.01 | 2018.03.01 |
| 9  | *****           | 송재 | 2021.01.01 | 2021.01.01 | 2021.01.01 | 2021.01.01 |
| 10 | *****           | 주선 | 2015.01.01 | 2015.01.01 | 2015.01.01 | 2015.01.01 |
| 11 | *****           | 한훈 | 2018.08.01 | 2018.08.01 | 2018.08.01 | 2018.08.01 |
| 12 | *****           | 김직 | 2017.12.01 | 2017.12.01 | 2017.12.01 | 2017.12.01 |
| 13 | *****           | 김범 | 2019.03.01 | 2019.03.01 | 2019.03.01 | 2019.03.01 |
| 14 | *****           | 김석 | 2020.10.01 | 2020.10.01 | 2020.10.01 | 2020.10.01 |
| 15 | *****           | 이건 | 2018.04.19 | 2018.04.19 | 2018.04.19 | 2018.04.19 |
| 16 | *****           | 김현 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 |
| 17 | *****           | 이계 | 2017.06.01 | 2017.06.01 | 2017.06.01 | 2017.06.01 |
| 18 | *****           | 최희 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 |
| 19 | *****           | 박은 | 2018.03.01 | 2018.03.01 | 2018.03.01 | 2018.03.01 |
| 20 | *****           | 최리 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 |

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)

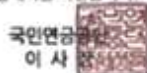
발급번호: 20210127991521    출력일시: 2021.01.27 16:51    2 / 2

| 연번 | 주민(외국인)<br>등록번호 | 성명 | 자격취득일      |            |            |            |
|----|-----------------|----|------------|------------|------------|------------|
|    |                 |    | 국민연금       | 건강보험       | 산재보험       | 고용보험       |
| 21 | *****           | 김주 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 |
| 22 | *****           | 김철 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 |
| 23 | *****           | 고재 | 2017.06.01 | 2017.06.01 | 2017.06.01 | 2017.06.01 |
| 24 | *****           | 박빈 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 |
| 25 | *****           | 김원 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 |
| 26 | *****           | 지진 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 | 2020.07.01 |
| 27 | *****           | 김리 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 | 2020.11.23 |

이 하 여 백

- ▷ 위 사업장 가입자 명부는 [확인용]으로 신청·발급된 것임을 알려드립니다.
- [확인용]은 4대 사회보험의 업무목적에 대해서만 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 공단에 문의하시기 바랍니다.
- 과거 가입내역은 해당 보험별 각 공단에 문의하여 발급받으시기 바랍니다.
- ▷ [산재보험]의 경우, '자격취득일'은 근로자 고용일을 뜻하며, 건설업 및 별첨업 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.



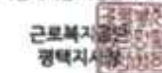
국민연금  
이 사

위와 같이 건강보험  
가입내역을 확인합니다.



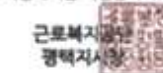
국민건강보  
이 사

위와 같이 산재보험  
가입내역을 확인합니다.

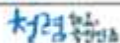


근로복지공  
평택지사

위와 같이 고용보험  
가입내역을 확인합니다.



근로복지공  
평택지사



## 7. 기타 홍보실적 성과

: 본 과제에 통해 두 개의 학술 포스터가 한국축산식품학회 정기학술대회 최우수 논문 발표상을 수상함.

| 번호 | 일자         | 홍보명칭                                   | 주요내용   |
|----|------------|--|--|
| 1  | 2020-11-06 | 최우수논문발표상                               | 최우수논문발표상(포스터 발표 부문)  |
| 2  | 2020-10-30 | the excellence oral presentation award | "Cell Survival, Growth, and Biochemical Characteristics of the Potential Probiotic Yeast Strain Kluyveromyces marxianus Isolated from Kefir" 논문에 대한 수상 |
| 3  | 2020-10-30 | The Excellence Oral Presentation Award | "Cell Survival, Growth, and Biochemical Characteristics of the Potential Probiotic Yeast Strain Kluyveromyces marxianus Isolated from Kefir" 논문에 대한 수상 |

## 제 4 절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

- ◆ 성과 목표 중 제품 개발 후 현장적용 실험을 통한 제품화 및 매출액 부분에 대해 완료되지 못한 부분은 본 과제의 수행내용 중 시제품의 성능 및 유효기간 평가 부분에 의해 장기적 관점에서 수행되어야 하므로 상품화 진행에 있어 기간이 소요로 인한 제품화 및 판매의 지연이 원인으로 사료됨. 하지만, 과제 계획서 상 과제 종료 1년차에 제품 출시가 계획되어 있어 현재 진행상황을 고려해 보면 올해 내에 제품화가 이루어질 것으로 예상함.
- ◆ 본 과제를 통한 제품화에 따른 매출액 부분은 가금 농장 내뿐만 아니라 식품 내 살모넬라 그룹 D 신속 검출을 위해서도 사용가능하므로 향후 5천만원의 매출목표 성과를 달성할 수 있을 것이라 사료되나, 만약 본 제품의 판매부진 시 살모넬라 그룹 D 외 농장 내에서 발생할 수 있는 다양한 유해균들을 동시에 검출할 수 있는 주요 유해균에 대한 검출용 키트의 생산도 고려해 볼 수 있을 것으로 생각됨.

## 제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

- ◆ **제품 판매 및 매출 증대 계획:** 현행법상 사용되고 있는 농장 및 식품 내 살모넬라균의 검출은 PCR 등에 의한 분자생물학적 검사와 함께 살모넬라균이 분리 동정되어야 검출로 판정하므로 분자생물학적 검출에 대한 기술적 개발 등의 제약이 있을 수 있음. 현재 미국과 같은 선진국에서는 살모넬라균의 분리, 배양, 동정에 많은 시간, 노력, 비용의 소요와 함께 이러한 유해균의 가축 또는 사람에게로의 전파로 인한 문제점들을 해결하기 위해 농가 및 식품제조 또는 가공장 등에서는 PCR 기반의 신속하고 정확한 방법을 이용한 검사업체와의 용역 계약에 의해 살모넬라균을 포함하는 유해균의 원인처를 파악하여 이러한 유해균에 대한 저감화에 대한 노력이 기울이고 있는 실정임. 현재 살모넬라균 검출용 배지를 이용한 선택적으로 균분리에

대해서도 폭넓게 이용되고 있으나 PCR 방법에 비교해서는 검출에 대한 민감도 및 특이도에 대한 한계가 있으므로 실험실 외 사용가능한 간편 PCR 기기와 함께 본 과제를 통하여 개발된 동결건조용 PCR kit 제품을 이용하여 농장 내에서도 PCR 기계를 이용하여 살모넬라균 특이성 및 선택성을 증가시킬 수 있으므로 향후 국내·외 시장에서 높은 매출을 기대할 수 있을 것으로 사료되며 특히 미생물 학회, 식품 안전성 학회 등 국내에서 개최되는 국제 학술대회에 참가하여 본 제품의 우수성을 널리 홍보하고 시제품 샘플 등을 배포하여 많은 검사기관 수요를 창출할 계획임.

- ◆ **제품 개선 및 후속 제품 개발 계획:** 개발된 기술을 바탕으로 소비자의 의견 및 요구에 따른 다양한 유해균에 대한 검출용 키트 제품을 출시할 예정이며, 제품의 미흡한 부분을 지속적으로 개선하여 타 제품과 비교되는 고 특이성과 고 민감도의 제품으로 보완할 계획임.
- ◆ **지식재산권 활용계획:** 출원된 지식재산권을 추후 특허로 등록하여 본 제품에 대한 독점적 판매지위를 확립할 예정임.
- ◆ **학술적 활용 계획:** 추가적으로 SCI(E)급 학술지의 논문 투고 및 게재를 통하여 개발된 제품에 대한 우수한 성능을 알리고 이를 판매 및 마케팅에 적극 활용할 예정임.

## 붙임. 참고문헌

1. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Foodborne Disease Active Surveillance Network, FoodNet Surveillance Report, 2015.
2. 식품안전나라: 국내 원인물질별/연도별 식중독 환자수 통계. 2020. Available at [https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu\\_no=3724&menu\\_grp=MENU\\_NEW02](https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02)
3. Cheong HJ, Lee YJ, Hwang IS, Kee SY, Cheong HW, Song JY, Kim JM, Park YH, Jung JH, and im WJ. Characteristics of Non-typhoidal *Salmonella* Isolates from Human and Broiler-chickens in Southwestern Seoul, Korea. J Korean Med Sci, 22: 773-8. 2007.
4. Lee DH, Hyeon JY, Kim J, Kim JS, Kim SJ, Jeon SE, Choi SW, Hong WT, Song CS, and Lee SW. Close genetic relationship between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from patients with diarrhoea and poultry in the Republic of Korea. Clin Microbiol Infect 2015; 21: e68 - e70. 2015.
5. 농림축산식품부: 닭 도축장 HACCP 일반모델, 1999.
6. 윤영선, 이덕용, 정경태: 2015년 국내에서 분리된 살모넬라균의 현황 및 특성 분석, 질병관리본부 감염병센터, 2015

7. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Foodborne Illness Source Attribution Estimates for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 (*E. coli* O157), *Listeria monocytogenes* (Lm), and *Campylobacter* using Outbreak Surveillance Data, Interagency Food Safety Analytics Collaboration (IFSAC) Project, 2015.
8. 식품의약품안전처: 식품공전, 2017.
9. Food Safety Insights. 2017. A look at the microbiology testing market. Available at <https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2017/a-look-at-the-microbiology-testing-market/>
10. Market Report. Frost & Sullivan. 2013. Analysis of the global *in vitro* diagnostics market.
11. Frost & Sullivan. 2013. Analysis of the Aisa-Pacific molecular diagnostics markets.
12. Jacobsen A, Hendriksen RS, Aaresturp FM, Ussery DW, and Friis C. The *Salmonella enterica* Pan-genome. *Microb Ecol* 62:487 - 504. 2011.
13. EU. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Available at <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R2073-20140601>.
14. Bae DR, Kim DH, Chon JW, Song KY, and Seo KH. Synergistic effects of the early administration of *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 and *Kluyveromyces marxianus* KU140723-05 on the inhibition of *Salmonella* Enteritidis colonization in young chickens. *Poultry Science*. 99:5999-6006. 2020.
15. Bae DR, Lee JW, Chae JP, Kim JW, Eun JS, Lee KW, and Seo KH. Characterization of a novel bacteriophage  $\phi$ CJ22 and its prophylactic and inhibitory effects on necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* in broilers. *Poultry Science*. 100:302-313. 2021.
16. Seo KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE, and Holt PS. Rapid, Specific Detection of *Salmonella* Enteritidis in Pooled Eggs by Real-Time PCR. *J Food Protection*. 67:864-869. 2004.
17. Hyeon JY, Park C, Choi IS, Holt PS, and Seo KH. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *International J Food Micro*. 144:177-181. 2010.



18. Markets and Markets. 2019. Food safety testing market by target tested (pathogens, GMOs, mycotoxin, and allergens), technology (traditional and rapid), food tested (meat, poultry, seafood, dairy, processed foods, and fruits & vegetables), and region-global forecast to 2023. Available at <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/food-safety-365.html>.
19. 농림축산식품부: 농림축산식품 주요통계, 2015.
20. 서건호: 식품의약품안전처 2019년도 생산단계 식육의 병원성 미생물 안전관리 방안 마련 연구 최종보고서

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

|                |   |         |                  |                                    |       |  |
|----------------|---|---------|------------------|------------------------------------|-------|--|
| 과 제 명          | (국문) 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발   |         |                  |                                    |       |  |
|                | (영문) Development of comprehensive control measures for reducing <i>Salmonella</i> spp. in poultry |         |                  |                                    |       |  |
| 주관연구기관         | 건국대학교 산학협력단   |         | 주 관 연 구<br>책 입 자 | (소속) 건국대학교                         |       |  |
| 참 여 기 업        | (주)카브   |         |                  | (성명) 서 건 호                         |       |  |
| 총연구개발비<br>(천원) | 계   | 600,000 | 총 연 구 기 간        | 2019. 05. 27~ 2020. 12. 31(1년 8개월) |       |  |
|                | 정부출연<br>연구개발비   | 450,000 |                  | 총 참 여<br>연 구 원 수                   | 총 인 원 |  |
|                | 기업부담금   | 150,000 |                  |                                    | 내부인원  |  |
|                | 연구기관부담금   | -       |                  |                                    | 외부인원  |  |

○ 연구개발 목표 및 성과

- 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 엔테라이티디스(*Salmonella* Enteritidis, SE) 저감화를 위한 종합적 방제 대책 수립에 필요한 조사 및 기초 데이터 확보
- SE 저감화를 위한 진단/검사/방제법 개발, 가이드라인의 설정, 현장 적용 및 산업화
- 개발 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 “살모넬라 국가종합방제대책” 수립

○ 연구내용 및 결과

■ 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립

- 가. 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사 완료
- 나. 효과적인 대응방법 선별 및 국내와의 유사도와 적용 가능성 분석 완료
- 다. 국내 가금류 농장 내 살모넬라 발생 현황 조사
- 라. 차단방역 시설 및 소독제의 농가 환경 내 효능 확인

■ *Salmonella* Enteritidis (SE) 저감화 방법의 실험실 내 평가 및 농장 현장에서 농장별/사육형태별 효능 평가 및 시제품 제작

- 가. 살모넬라 저감화방법 선별(유산균 및 박테리오파지 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험)을 통한 효과 확인
- 나. 케피어 유래 유산균의 분리 확보 및 현장 적용을 통한 기술이전 실시 및 사료첨가제로써 시제품 제작 예정
- 다. 살모넬라 혈청형 D그룹 균주[SE 및 *S. Gallinarum* (SG) 포함] 특이 신속 검출용 PCR 키

트 제작 기술 확립

■ **살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화**

- 가. 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출
- 나. 살모넬라 저감화를 위한 방역 SOP 작성
- 다. 살모넬라 저감화 방제사업에 활용한 유산균 균주 선발
- 라. 선발된 유산균 균주에 대한 살모넬라 저감화 효능 확인

■ **표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화**

- 가. 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 확인을 위한 양계 농장 투여 실험 완료
- 나. 살모넬라 저감화에 효과가 있는 균주의 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 추가 계획 연구 수립
- 다. 도출된 대응방법을 토대로 국가정책 도입을 위한 정책건의 실시

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 방제 프로그램 개발 및 적용을 통한 가금에서의 질병 예방 체계 구축 및 안전축산물 생산
- 야외감염 살모넬라균의 신속 감별 검출법 개발을 통한 효과적인 방제 및 검사체계 확립, 가금 축산물 수출 토대 구축
- 국가 및 OIE 살모넬라 표준실험실과 공동연구로 균주 DB 구축과 국내 살모넬라의 체계적 조사 및 세계적 위상 확대

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

|                     |                              |                               |           |        |         |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------|--------|---------|
|                     |                              | 과제번호                          | 119055-02 |        |         |
| 사업구분                | 가축질병대응기술개발사업                 |                               |           |        |         |
| 연구분야                |                              |                               |           | 과제구분   | 단위      |
| 사업명                 | 가축질병대응기술개발사업                 |                               |           |        | 주관      |
| 총괄과제                | 기재하지 않음                      |                               |           | 총괄책임자  | 기재하지 않음 |
| 과제명                 | 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발 |                               |           | 과제유형   | 개발      |
| 연구기관                | 건국대학교 산학협력단                  |                               |           | 연구책임자  | 서건호     |
| 연구기간<br>연구비<br>(천원) | 연차                           | 기간                            | 정부        | 민간     | 계       |
|                     | 1차연도                         | 2019. 5. 27 ~<br>2019. 12. 31 | 180,000   | 60,000 | 240,000 |
|                     | 2차연도                         | 2020. 1. 1 ~<br>2020. 12. 31  | 270,000   | 90,000 | 360,000 |
|                     | 3차연도                         |                               |           |        |         |
|                     | 4차연도                         |                               |           |        |         |
|                     | 5차연도                         |                               |           |        |         |
|                     | 계                            | 2019. 5. 27 ~<br>2020. 12. 31 | 450,000   |        | 600,000 |
| 참여기업                | (주)카브                        |                               |           |        |         |
| 상대국                 | 상대국연구기관                      |                               |           |        |         |

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2020. 02. 01.

3. 평가자(연구책임자) : 서 건 호

|             |     |     |
|-------------|-----|-----|
| 소속          | 직위  | 성명  |
| 건국대학교 산학협력단 | 정교수 | 서건호 |

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

|            |   |
|------------|---|
| <b>확 약</b> |  |
|------------|---|

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제 수행을 통해 생산단계에서의 살모넬라균 저감화를 위한 신속진단 검사법 개발, 유산균 및 박테리오파지 이용한 저감화 방법 효과 확인 및 현장적용 SOP 표준화 수립을 통한 종합적인 방제법에 대한 연구개발결과는 매우 우수하고 창의적이었다고 사료됨

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

농장 수준에서의 살모넬라균 저감화를 위한 방제법 및 표준화된 SOP에 대한 적용은 닭 질병의 감소 및 생산성 향상을 통한 양계 농가의 소득증대뿐만 아니라 위생적이고 안전한 식품 공급을 통한 국민건강증진 효과가 나타날 것으로 기대함

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

가금류에 대한 살모넬라 방제프로그램의 개발 및 적용을 통해 가금에서의 질병 예방 체계 구축 및 안전축산물 생산, 야외감염 살모넬라균의 신속 감별 검출법 개발을 통한 효과적인 방제 및 검사체계 확립 및 이를 통한 가금축산물 수출 토대 구축함으로써 살모넬라균주의 DB 구축과 국내 살모넬라의 체계적 조사 및 연구 활성화에 기여할 것으로 예상함

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

코로나 19으로 인해 연구활동 등에 대한 제약이 많이 존재하였으나 본 과제의 완벽한 목표 달성을 위한 노력과 성실한 수행이 이루어졌다고 사료됨

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제 수행을 통해 현재까지 세계적으로 저명한 저널에 2개의 SCI 논문과 2개의 비SCI 논문을 게재하였고, 본 과제와 관련된 추가 논문을 SCI 저널에 게재함. 12개의 국내 및 국제학대회에서 연구결과를 발표하였고 3건의 수상실적이 있음. 두 건의 특허출원과 각각 한 건의 정책건의 및 기술이전과 이와 관련된 한 건의 사업화가 진행되고 있음

## II. 연구목표 달성도

| 세부연구목표<br>(연구계획서상의 목표) | 비중<br>(%) | 달성도<br>(%) | 자체평가                       |
|------------------------|-----------|------------|----------------------------|
| 특허출원 (2건)              | 20        | 100        | 달성 완료                      |
| 기술이전 (1건)              | 10        | 100        | 달성 완료                      |
| 기술료 (5백만원)             | 20        | 100        | 달성 완료                      |
| 제품화 (1건)               | 20        | 100        | 진행중 (과제종료 1차년도 내 완료예정)     |
| 인력양성 (3명)              | 10        | 100        | 달성 완료                      |
| 정책활용 (1건)              | 20        | 100        | 진행중 (관련부처에 정책활용 건의 제출한 상태) |
| 합계                     | 100점      |            |                            |

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제 ‘가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발’ 수행을 통해 매우 과학적이고 효과적인 살모넬라 신속진단 방법 및 저감화 방법의 개발, 현장적용 SOP의 표준화와 국내 살모넬라의 체계적 조사 및 연구 활성화에 대한 본 과제의 연구개발결과는 현재 조류독감 등으로 인해 어려움을 겪고 있는 양계산업에 있어서 매우 유용하며 이 연구과제는 매우 시기적절하였다고 판단됨.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

제품화에 대한 사업화 목표는 당초 사업종료 1차년도 내로 완료할 예정이었으며 현재 제품화가 진행 중이며, 정책활용 건은 현재 소관부처로부터 정책활용건의에 대한 결과를 기다리고 있음을 고려해 주실 것을 요구함.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구팀은 가축질병대응기술개발사업 ‘가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발’을 수행을 통해 과학적이고 효과적인 살모넬라 신속진단 방법, 저감화 방법 개발 및 현장적용 SOP의 표준화를 통해 현재 위기를 겪고 있는 양계산업 발전에 기여할 것으로 사료됨. 하지만 현행법상 농장 및 식품 내 살모넬라균의 검출은 PCR 등에 의한 분자생물학적 검사와 함께 살모넬라균이 반듯이 분리와 동정이 되어야 검출로 판정하고 있으므로 분자생물학적 검출에 대한 기술적 개발 등의 제약이 있을 수 있음. 현재 미국과 같은 선진국에서는 살모넬라균의 분리, 배양, 동정에 많은 시간, 노력, 비용의 소요와 함께 이러한 유해균의 가축 또는 사람에게로의 전파로 인한 문제점들을 해결하기 위해 농가 및 식품제조 또는 가공장 등에서는 PCR 기반의 신속하고 정확한 방법을 이용한 검사업체와의 용역 계약에 의해 살모넬라균을 포함하는 유해균의 원인처를 파악하여 이러한 유해균에 대한 저감화에 대한 노력을 기울이고 있는 실정임. 현재 살모넬라균 검출용 배지를 이용한 선택적 균분리에 대한 방법도 부분적으로 이용되고 있으나 PCR 방법과 비교해서는 검출에 대한 민감도 및 특이도에 대한 한계가 있기 때문에 실험실 외에서 사용가능한 간편 PCR 기기와 함께 본 과제를 통하여 개발된 동결건조용 살모넬라균 신속 검출용 PCR kit 제품을 이용하면 농장 내에서도 살모넬라균 검출에 있어서 특이성 및 선택성을 증가시킬 수 있으므로 향후 국내·외 시장에서 높은 매출을 기대할 수 있을 것으로 사료되며 특히 미생물 학회, 식품안전성 학회 등 국내에서 개최되는 국제 학술대회에 참가하여 본 제품의 우수성을 널리 홍보하고 시제품 샘플 등을 배포하여 많은 검사기관 수요를 창출할 계획임.

또한, 개발된 기술을 바탕으로 소비자들의 의견 및 요구에 따라 다양한 유해균에 대한 검출용 키트 제품도 개발할 예정이며, 제품의 미흡한 부분은 지속적으로 개선하여 고 특이성과 고 민감도를 가진 제품으로 보완할 계획임.

현재 출원된 지식재산권을 추후 특허로 등록하여 본 제품에 대한 독점적 판매지위를 확립할 예정이며, 향후 추가적인 SCI(E)급 학술지의 논문 투고 및 게재를 통하여 개발된 제품에 대한 우수한 성능을 알리고 이를 판매 및 마케팅에 적극 활용할 예정임.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

|  |
|--|
|  |
|--|

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

|  |
|--|
|  |
|--|



[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

|        |   |             |            |             |
|--------|---|-------------|------------|-------------|
| 사업추진형태 | <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제<br><input type="checkbox"/> 지정공모과제   | 분 야         | 가축질병대응기술개발 |             |
| 연구과제명  | 가금에서 살모넬라 저감화를 위한 종합방제대책법 개발  |             |            |             |
| 주관연구기관 | 건국대학교 산학협력단   |             | 주관연구책임자    | 서건호         |
| 연구개발비  | 정부출연<br>연구개발비   | 기업부담금       | 연구기관부담금    | 총연구개발비      |
|        | 450,000,000   | 150,000,000 | -          | 600,000,000 |
| 연구개발기간 | 2019. 5. 27 ~2020. 12. 31 (20개월)  |             |            |             |
| 주요활용유형 | <input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(제품개발 및 상품화)<br><input type="checkbox"/> 미활용(사유: ) |             |            |             |

### 2. 연구목표 대비 결과

| 당초목표   | 당초연구목표 대비 연구결과  |
|--|---|
| ① 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 저감화를 위한 방제 대응 방법 수립  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미국 및 EU를 포함한 국외의 가금류 농가 내 살모넬라 저감화 방안 연구조사 완료</li> <li>- 효과적인 대응방법 선발 및 국내와의 유사도와 적용 가능성 분석 완료</li> <li>- 국내 가금류 농장 내 살모넬라 발생 현황 조사</li> <li>- 차단방역 시설 및 소독제의 농가 환경 내 효능 확인</li> </ul>   |
| ② <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) 저감화 방법의 실험실 내 평가 및 농장 현장에서 농장별/사육형태별 효능 평가 및 시제품 제작 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 살모넬라 저감화방법 선발(유산균 및 박테리오파지 적용을 통한 살모넬라 억제능 시험)을 통한 효과 확인</li> <li>- 케피어 유래 유산균의 분리 확보 및 현장 적용을 통한 기술이전 실시 및 사료첨가제로써 시제품 제작 예정</li> <li>- 살모넬라 혈청형 D그룹 균주[SE 및 <i>S. Gallinarum</i> (SG) 포함] 특이 신속 검출용 PCR 키트 제작 기술 확립</li> </ul> |
| ③ 살모넬라 저감화 방법 선발 및 표준화   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출</li> <li>- 살모넬라 저감화를 위한 방역 SOP 작성</li> <li>- 살모넬라 저감화 방제사업에 활용한 유산균 균주 선발</li> <li>- 선발된 유산균 균주에 대한 살모넬라 저감화 효능 확인</li> </ul>  |
| ④ 표준화된 살모넬라 대응 프로그램의 국내 가금류 농장 적용을 통한 효과적인 질병 예방 체계 구축 및 사육 효과의 극대화                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발된 유산균 복합체의 살모넬라 억제능 확인을 위한 양계 농장 투여 실험 완료</li> <li>- 살모넬라 저감화에 효과가 있는 균주의 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 추가 계획 연구 수립</li> <li>- 도출된 대응방법을 토대로 국가정책 도입을 위한 정책건의 실시</li> </ul>   |

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

| 성과목표      | 사업화지표  |      |      |          |     |     |     |     |      |      | 연구기반지표 |      |      |        |      |      |          |      |            |      |
|-----------|--------|------|------|----------|-----|-----|-----|-----|------|------|--------|------|------|--------|------|------|----------|------|------------|------|
|           | 지식 재산권 |      |      | 기술실시(이전) |     | 사업화 |     |     |      |      | 기술인증   | 학술성과 |      |        | 교육지도 | 인력양성 | 정책 활용·홍보 |      | 기타(타연구활용등) |      |
|           | 특허출원   | 특허등록 | 품종등록 | 건수       | 기술료 | 제품화 | 매출액 | 수출액 | 고용창출 | 투자유치 |        | 논문   |      | 논문평균IF |      |      | 학술발표     | 정책활용 |            | 홍보전시 |
|           |        |      |      |          |     |     |     |     |      |      |        | SCI  | 비SCI |        |      |      |          |      |            |      |
| 단위        | 건      | 건    | 건    | 건        | 백만원 | 건   | 백만원 | 백만원 | 명    | 백만원  | 건      | 건    | 건    | 건      | 명    | 건    | 건        |      |            |      |
| 가중치       | 20     |      |      | 10       | 20  | 20  |     |     |      |      |        |      |      |        | 10   | 20   |          |      |            |      |
| 최종목표      | 2      | 1    |      | 1        | 5   | 1   | 50  |     |      |      |        | 2    | 2    |        | 3    | 3    | 1        |      |            |      |
| 연구기내 달성실적 | 2      |      |      | 1        | 5   |     |     |     | 2    |      |        | 2    | 2    |        | 12   | 3    | 1        |      |            |      |
| 달성율(%)    | 100    |      |      | 100      | 100 |     |     |     |      |      |        | 100  | 100  |        | 400  | 100  | 100      |      |            |      |

\* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

#### 4. 핵심기술

| 구분 | 핵심기술명   |
|----|---|
| ①  | 케피어 또는 발효제품으로부터 살모넬라 저감화를 위한 효과적인 유산균 선발 및 확보                               |
| ②  | 살모넬라 혈청형 D그룹 균주 [SE 및 S. Gallinarum (SG) 포함] 특이 신속 검출용 동결건조 PCR 키트 제작 기술 확립 |
| ③  | 가금류 농장 내 살모넬라 저감화를 위한 표준화된 SOP 도출   |

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

| 구분    | 핵심기술 수준 |       |         |            |            | 기술의 활용유형(복수표기 가능) |            |        |      |    |
|-------|---------|-------|---------|------------|------------|-------------------|------------|--------|------|----|
|       | 세계 최초   | 국내 최초 | 외국기술 복제 | 외국기술 소화·흡수 | 외국기술 개선·개량 | 특허출원              | 산업체이전(상품화) | 현장애로해결 | 정책자료 | 기타 |
| ①의 기술 | ✓       | ✓     |         |            | ✓          | ✓                 | ✓          | ✓      |      |    |
| ②의 기술 | ✓       | ✓     |         |            | ✓          |                   | ✓          | ✓      |      |    |
| ③의 기술 |         |       |         |            |            |                   |            | ✓      | ✓    |    |
| ·     |         |       |         |            |            |                   |            |        |      |    |
| ·     |         |       |         |            |            |                   |            |        |      |    |

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

|       |   |
|-------|---|
| 핵심기술명 | 핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과   |
| ①의 기술 | 인수공통전염 가축질병인 가금류 살모넬라 방제 프로그램 개발 및 적용을 통한 가금에서의 질병 예방 체계 구축 및 안전축산물 생산 기여 |
| ②의 기술 | 야외감염 살모넬라균의 신속 감별 검출법 개발을 통한 효과적인 방제 및 검사체계 확립, 가금축산물 수출 토대 구축            |
| ③의 기술 | 살모넬라 저감화 방제사업 효과를 통한 산란계 및 육계 농장으로 방제사업 확대 및 안전한 가금류의 생산에 기여              |

7. 연구종료 후 성과창출 계획

| 성과목표          | 사업화지표    |          |      |           |          |          |           |     |      |      | 연구기반지표 |          |          |      |           |      |          |          |             |
|---------------|----------|----------|------|-----------|----------|----------|-----------|-----|------|------|--------|----------|----------|------|-----------|------|----------|----------|-------------|
|               | 지식 재산권   |          |      | 기술실시 (이전) |          | 사업화      |           |     |      |      | 기술인증   | 학술성과     |          |      | 교육지도      | 인력양성 | 정책 활용홍보  |          | 기타 (타연구활용등) |
|               | 특허출원     | 특허등록     | 품종등록 | 건수        | 기술료      | 제품화      | 매출액       | 수출액 | 고용창출 | 투자유치 |        | 논문       |          | 학술발표 |           |      | 정책활용     | 홍보전시     |             |
|               |          |          |      |           |          |          |           |     |      |      |        | SCI      | 비SCI     |      |           |      |          |          |             |
| 단위            | 건        | 건        | 건    | 건         | 백만원      | 건        | 백만원       | 백만원 | 명    | 백만원  | 건      | 건        | 건        | 건    | 명         |      |          |          |             |
| 가중치           | 20       |          |      | 10        | 20       | 20       |           |     |      |      |        |          |          |      | 10        | 20   |          |          |             |
| 최종목표          | 2        | 1        |      | 1         | 5        | 1        | 50        |     |      |      |        | 2        | 2        |      | 3         |      | 3        | 1        |             |
| 연구기간 내 달성실적   | <u>2</u> |          |      | <u>1</u>  | <u>5</u> |          |           |     |      |      |        | <u>2</u> | <u>2</u> |      | <u>12</u> |      | <u>3</u> | <u>1</u> | <u>2</u>    |
| 연구종료후 성과창출 계획 |          | <u>1</u> |      |           |          | <u>1</u> | <u>50</u> |     |      |      |        | <u>2</u> | <u>1</u> |      | <u>2</u>  |      |          |          |             |

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

|                          |   |                       |          |
|--------------------------|---|-----------------------|----------|
| 핵심기술명 <sup>1)</sup>      | 락토케피아노파시엔스 케피아노파시엔스 DN1 균주를 포함하는 사료 첨가제 조성물   |                       |          |
| 이전형태                     | <input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상  | 기술료 예정액               | 5,000 천원 |
| 이전방식 <sup>2)</sup>       | <input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정<br><input type="checkbox"/> 기타( ) |                       |          |
| 이전소요기간                   | 30일   | 실용화예상시기 <sup>3)</sup> | 2021년 9월 |
| 기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup> | 균주 분양 및 최적의 배양 조건 제공  |                       |          |

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락

한 권리

통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 **가축질병대응기술개발사업**의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 **가축질병대응기술개발사업**의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.