농축2021
-23호

신규
내독소
독성
제거주
이용
범용성
가금
티푸스
백신
개발

2022

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

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

가축질병대응기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004157-01

신규 내독소 독성제거주 이용 범용성 가금티푸스 백신 개발

2022. 9. 26.

주관연구기관 / 서울대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "신규 내독소 독성제거주 이용 범용성 가금티푸스 백신 개발"(개발기간 : 2021. 04 .01 ~ 2022. 03. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 9. 26.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단장 (인)

주관연구책임자 : 권 혁 준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	가축질병대응기술개발	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)	동물의약품개발	연구개발과제번호	121002-01

기술분류							
국가과학기술 표준분류	LB0710 동물질병예방	50 %	LB0701 수의전염병	30 %	LB0704 수의미생물/기생생물	20%
농림식품 과학기술분류	RB0201 동물질병관리	50 %	RB0104 수의미생물·기생생물	30 %	RB0203 수의공중보건	20%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)			
연구개발과제명	신규 내독소 독성제거주 이용 범용성 가금티푸스 백신 개발		
전체 연구개발기간	2021. 04. 01 - 2022. 03. 31(1년 0개월)		
총 연구개발비	총 261,000천원 (정부지원연구개발비: 261,000천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)		
연구개발단계	기초[ ] 응용[√] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]	기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준(4단계) 종료시점 목표(5단계)
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)			
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)			

연구개발 목표 및 내용	최종 목표	- 최근 개발한 병원성 회복 불능 SG9R주(Safe-9R)와 Safe-9R의 내독소 독성제거주를 이용한 양계 전주기 가용 가금티푸스 백신 및 백신 프로그램 개발
	전체 내용	(가) Dtx-9RM-dK 백신주 제작 □ Dtx-9RM-dK 생백신주 제작 및 게놈 분석 - Dtx-9RM strain에서 kanamycin 내성 유전자를 제거한 Dtx-9RM-dK를 작출하였으며 287/91 strain 게놈서열과 비교한 결과 큰 차이 없음. (나) Dtx-9RM-dK 생균 백신의 안전성 확인 □ 증체율에 대한 영향 평가 ○ 산란계 1일령 병아리에 생균백신 접종 - Dtx-9RM-dK와 SG9R 두 가지 접종 용량($1x10^7$cfu/수 & $1x10^8$cfu/수)을 근육접종 후 매주 3주간 체중 측정한 결과 Dtx-9RM-dK는 증체율에 전혀 영향을 미치지 않아 어린병아리에 안전하였음. □ 갈색 산란계 산란율 영향 평가 - HyLine brown 34주령 산란계: SG9R 생균백신 접종(6주령/16주령 백신 접종 완료) - 각 백신주 $1x10^7$cfu/수를 근육접종 후 백신 접종 전후 수당 산란율 측정 결과 시험군간 유의적인 차이 없음. (다) Dtx-9RM-dK의 방어효능 평가 □ Dtx-9RM-dK 생백신의 방어 효능 평가 - 1일령 산란계수평아리에 Dtx-9RM-dK 백신을 접종한 후 2주 후에 병원성변이주인 BPSG64로 공격접종한 결과 폐사율/세균분리율에서 유의적인 방어 효능을 보임.

		(라) 생균/사균 혼합 백신 방어 효능 평가 □ Dtx-9RM-dK 생독백신+heat-inactivated Dtx-9RM-dK 사독백신 혼합백신의 *Salmonella* Gallinarum 병원성 변이주 방어 효능 평가 - 1일령 산란계수평아리에 Dtx-9RM-dK 생균 및 Dtx-9RM-dK 사균 혼합백신을 접종한 후 2주후에 병원성변이주인 BPSG64로 공격접종한 결과 폐사율/세균분리율에서 유의적인 방어 효능을 보임. (마) 분무백신 효능 평가 □ 호흡기 경로 Safe-9R 백신의 효능 평가 - 생독백신의 생균수는 $1x10^7$cfu/dose - 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종 및 4주후 SG9R 기관 접종 ($1x10^7$cfu/수) - OmpA peptide ELISA, total OMPs ELISA를 이용하여 혈청 내 특이 IgG 및 담즙 내 특이 IgA 측정 - 결과에 대한 평가 ▪ OmpA에 대한 Dtx-9RM-dK 프라이밍 백신에 의한 혈청내 anti-OmpA IgG는 증가한 것으로 판단되나 담즙내 anti-OmpA IgA에는 유의적인 차이 없음. ▪ OMPs에 대한 특이 항체는 Dtx-9RM-dk 프라이밍 백신에 의해 혈청 내 특이 IgG 역가가 유의적으로 높은 수준을 유지하였고, SG9R 기관내 백신에 의해 혈청내 특이 IgG 항체 역가의 유의적인 증가가 확인됨. ▪ 따라서, SG9R 기관내 백신 접종에 의한 혈청 항체 상승 효과가 확인되어 향후 분무백신 접종의 가능성이 확인됨. (바) Dtx-9RL 사독오일백신 제조법에 따른 백신 효능 및 접종 반응 비교 □ Dtx-9RL 사독오일백신 제조 및 백신 접종 - Dtx-9RL 제조 ▪ 배양액을 원심분리(13,000xg for 30m)하고, 상층액 제거 후 PBS로 부유한 후 원심분리하여 상층액 제거 후 적정한 세균 농도로 부유함 ▪ 열처리를 통해 불활화 한 후 세균과 Montanide ISA70을 3:7 비율로 혼합하여 사독오일백신 제조($1x10^8$cfu/dose) - Unpurified/non-concentrated OMVs(Unpurified OMVs) 제조 ▪ 배양액을 원심분리(13,000xg for 30m)하고, 상층액만 수확하여 Montanide ISA70과 3:7 비율로 혼합하여 오일백신 제조 - OMV+Dtx-9RL OEV (oil emulsion vaccine) 제조 ▪ 배양액을 적당한 세균 농도로 PBS를 이용하여 희석한 후 열처리 하였고, Montanide ISA70을 3:7 비율로 혼합하여 사독오일백신 제조($1x10^8$cfu/dose) - PBS+oil 제조 ▪ PBS를 Montanide ISA70과 3:7 비율로 혼합하여 오일백신 제조 - 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종 ▪ 각 백신의 1dose를 10수의 시험계 피하 접종 후 3주간 관찰 - OMV의 백신 효능에 대한 보고가 많아 백신 제조 공정을 단순화하고, 백신 효능을 높이기 위해 배양액을 그대로 사용하여 사

			독오일백신을 제작하였고, 기존 백신 제조 공정에서 버려지는 배양액의 OMV을 이용한 백신을 제작하여 기존 세척 균체 이용 백신과 비교한 결과 기존의 세척 균체를 이용한 백신의 접종반응이 가장 낮았고, 면역원성도 가장 높았음.
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	□ Dtx-9RM-dK 생균백신 □ Dtx-9RM-dK 생균 + Dtx-9RL 사균 혼합 백신 □ 어린병아리 백신 접종을 추가한 산란계/육계 백신 프로그램
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	**1. 연구개발성과 활용계획** **(1) 신규 가금티푸스 생균백신 및 조성** □ Dtx-9RM-dK 생균백신 ○ 기존 산란계 6주령/16주령 생균백신(근육접종) - 국내외 동물약품회사에 기술이전 후 야외 임상시험 허가 신청 ○ 신규 산란계 1주령/6주령/16주령 생균백신용(근육접종) - 국내외 동물약품회사에서 야외 임상시험 허가 신청 ○ 신규 육계 1일령 생균백신용(근육접종) - 국내외 동물약품회사에서 야외 임상시험 허가 신청 □ SG9R 생균 분무백신(효능 검증되는 경우 활용) ○ Dtx-9RM-dK 접종계에 한정한 분무백신 - Dtx-9RM 접종한 산란계/육계 병아리에 2주후 분무백신 - 국내외 동물약품회사에서 야외 임상시험 허가 신청 □ 생균 + 사균 혼합백신 조성(아래 두 조성 중 최적 조성 선정) ○ Dtx-9RM-dK 생균 + Dtx-9RL 사균 - 국내외 동물약품회사에 기술이전 - 신규 산란계 1주령/6주령/16주령 생균백신(근육접종) 야외 임상시험 허가 신청 - 신규 육계 1일령 생균백신용(근육접종) 야외 임상시험 허가 신청 **(2) 신규 가금티푸스 백신 프로그램** □ 신규 산란계 백신 프로그램 ○ 신규 산란계 1주령/6주령/16주령 생균백신 프로그램 - Dtx-9RM-dK 근육접종 - 1주령에 조기 백신접종을 통해 초기 수평감염 예방에 활용 □ 신규 육계 백신 프로그램 ○ 육계 1일령 병아리 백신 프로그램 - Dtx-9RM-dK을 1일령 육계 근육백신 접종 **(3) 가금티푸스 백신 평가 모델 및 면역 평가 방법** ○ 가금티푸스 백신 평가 동물 모델 - 내독소 독성 평가 모델: 1일령/1주령 증체율에 대한 영향 평가와 산란 피크기 산란율 영향 평가 결과의 상관성이 있는 경우 향후 어린병아리 증체 모델로 일원화 - 백신효능 평가 모델: 백신 접종 1주후 공격 접종 모델을 통해 가금티푸스 백신 효능의 차이를 세밀하게 구별하는데 활용 2. 연구개발성과 기대효과 **(1) 기술적 측면** □ 백신 개발 기술 발전에 기여 ○ 내독소 독성제거 백신 개발 기술 - 최적화된 내독소 독성제거 기술 검증으로 대장균 백신 등 유사 백신 개발을 위한 기술적 토대 마련

	○ 생균+사균 혼합 백신 조성 기술 - 세포내 감염 세균 백신의 세포성면역과 체액성면역을 모두 활성화 시킬 수 있는 백신 조성 개발로 브루셀라 등 유사한 병원체 백신 개발에 기여 □ 백신 평가 기술 발전에 기여 ○ 산란계 내독소 독성 평가 기술 - 배양 탐식세포와 사이토카인 분석에 기반한 평가 기술 대비 미세한 내독소 독성 차이를 구별할 수 있는 *in vivo* 평가 기술 확립으로 관련 연구 발전에 기여 ○ 조기 형성 면역 평가 기술 - 백신 접종 후 1주 만에 공격 접종하여 백신 간 효능 차이를 구별할 수 있으므로 보다 나은 백신 선정 가능하며 새로운 백신 개발 목표로 제시 기대 □ 양계 백신 프로그램 최적화에 기여 ○ 양계 생애 전주기 최적화된 백신 프로그램 개발 - 기존 산란계/육계 백신 프로그램에 가금티푸스 백신 포함한 최적화된 프로그램 확립 **(2) 경제·산업적 측면** □ 기존 백신대비 부작용이 거의 없고, 방어효능이 뛰어난 신규 백신 제품 개발 ○ 국내 가금티푸스 백신 시장의 대부분을 차지하고 있는 수입 백신 제품 대체 ○ 해외시장 진출을 통한 수출 증대 및 국내 동물용 백신 이미지 제고 ○ 세계 최고 성능 동물백신 제품(best-in-class) 개발 □ 양계산업에서 가금티푸스 피해 최소화 ○ 가장 감염 위험성이 높은 어린 병아리시기에 사용할 수 있는 백신제품 개발로 보다 완벽한 면역 보강 시스템 구축 ○ SG 보균 닭 진드기 흡혈에 의한 체내 감염에 대한 면역 향상으로 닭 진드기 피해 경감 ○ 가금티푸스 뿐 아니라 인체 식중독의 주요 원인인 SE 감염을 예방할 수 있는 육계 백신 개발로 생산성 향상 및 계육 제품 안전성 제고 **(3) 사회적 측면** □ 최근 HPAI 발생으로 인한 양계산업 활력 제고 ○ 현장에서 가장 중요한 민원 해결과제인 가금티푸스 백신 및 백신 프로그램 개선을 통해 양계산업 종사자들의 생산성 제고 □ 국내 소비자들의 양계 제품에 대한 신뢰성 회복 ○ 지속적인 신기술 백신 개발을 통한 안전한 양계 제품 생산 노력 홍보 □ K-VET 이미지 향상 ○ 세계 최고 성능과 품질을 실현하여 대한민국 동물약품에 대한 전세계 소비자들의 선호도 향상
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당사항 없음

연구개발성과의 등록・기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ・장비	기술요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명정보	생물자원		정보	실물
		1	1					1	1			

연구시설・장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설・장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	가금티푸스	생균백신	내독소 독성제거	백신프로그램	식중독 예방
영문핵심어 (5개 이내)	Fowl typhoid	Live vaccine	Endotoxin detoxification	Vaccine program	Prevention of food poisoning

〈 목 차 〉

< 요 약 문 > 2
1. 연구개발과제의 개요 8
1) 신규 가금티푸스 백신 제품 개발의 필요성 8
(1) 가금티푸스 8
(2) 국내 SG 진화 및 고병원성 야외주 출현 8
(3) 기존 백신주의 한계 10
(4) 신규 개발 백신주 및 백신조성의 추가 연구 및 제품화 필요성 11
2) 가금티푸스 백신 프로그램 개선의 필요성 14
(1) 어린 산란계 가금티푸스 감염 위험성 문제 14
(2) 닭 진드기에 의한 감염 문제 14
(3) 육계 가금티푸스 발생 문제 14
(4) Salmonella serovar Enteritidis(SE)에 의한 닭 파라티푸스 및 인체 식중독 지속 발생 문제 15
3) 수출 품목으로써 가금티푸스 백신 상용화 가능성 15
(1) 전 세계적인 가금티푸스 발생 및 SE 식중독 문제 15
(2) 다국적기업 백신과의 차별성 15
(3) 축적된 국내 가금티푸스 백신 노하우의 마케팅 활용 가능성 16
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용 17
1) 닭 품종에 따른 가금티푸스 감수성 비교 평가 17
2) 신규 내독소 독성제거주(Dtx-9RM) 생균백신의 안전성 확인 17
(1) 증체율에 대한 영향 평가 17
(2) 갈색 산란계 산란율 영향 평가 17
3) Dtx-9RM 생균백신의 방어효능 평가 17
(1) SG에 대한 방어효능 평가 18
(2) Salmonella serovar Enteritidis(SE)에 대한 방어 효능 평가 18
4) 생균/사균 혼합 백신 조성 최적화(백신 2주 후 boosting 백신 효과 평가) 18
(1) Dtx-9RM + heat-inactivated Safe-9R 19
5) 분무백신 효능 평가 19
(1) 호흡기 경로 단독백신의 효능 평가 19
(2) Priming-boosting 백신 효능 평가 20
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 21
1) 연구수행 결과 21
(1) 정성적 연구개발성과 21
(가) Dtx-9RM-dK 백신주 제작 21
(나) Dtx-9RM-dK 생균 백신의 안전성 확인 23
(다) Dtx-9RM-dK의 방어효능 평가 24
(라) 생균/사균 혼합 백신 방어 효능 평가 28
(마) 분무백신 효능 평가 30
(바) 사독오일백신 제조법에 따른 백신 효능 및 접종 반응 비교 31
(2) 정량적 연구개발성과 34
(3) 세부 정량적 연구개발성과 35
(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 39
2) 목표 달성 수준 40
4. 목표 미달 시 원인분석 40
1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용 40

2) 자체 보완활동 ····· 41
3) 연구개발 과정의 성실성 ····· 41
5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도 ····· 41
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ····· 41
참고문헌 ····· 43

1. 연구개발과제의 개요

1) 신규 가금티푸스 백신 제품 개발의 필요성

(1) 가금티푸스

□ 원인균 및 생활사

○ 식중독의 원인인 살모넬라균은 균체의 외피(outer- membrane)에서 바깥쪽으로 뻗어있는 지질다당체(LPS)의 항원구조에 따라 2,500개가 넘는 혈청형으로 분류되며 가금티푸스균(*Salmonella* Gallinarum, SG)은 추백리균(*Salmonella* Pullorum)과 파라티푸스의 주요 원인균인 *Salmonella* Enteritidis(SE)와 같은 O-항원형으로 분류됨. 이러한 다양한 혈청형의 살모넬라 중에는 특정 숙주동물에 적응하여 높은 병원성을 획득한 혈청형들이 있는데 사람의 장티푸스균(*Salmonella* Typhi)과 닭의 가금티푸스균이 대표적임.

○ 최근 게놈 염기서열을 이용한 비교 유전체학 연구를 통해 가금티푸스균, 추백리균, SE의 게놈 염기서열이 매우 유사하며 공통의 조상으로부터 유래한 것으로 보고되었고(Langridge 등, 2015), 가금티푸스균과 추백리균은 감염 후 급성적으로 간에서 증식하여 담즙을 통해 장으로 배출되어 수평감염을 일으킴.

○ 숙주의 면역반응이 강한 경우 탐식세포 안에서 오랜 기간 잠복하다 숙주의 면역이 저하되거나 산란을 시작하는 경우 간에서 증식을 시작하여 급성감염과 같은 방식으로 배출되고, 산란 중 외부침입을 막기위해 산란도관에 도열한 탐식세포로부터 가금티푸스균이 증식하여 난계대감염을 초래함.

○ 따라서 가금티푸스균과 추백리균은 닭 탐식세포 내 잠복감염을 위해 탐식세포의 살균기전을 회피할 수 있는 살모넬라 플라스미드 병원성(*spv*) 유전자를 보유하고 있고, 면역반응 자극 최소화를 위해 운동성에 중요한 편모(falgella) 기능을 유전자 돌연변이(염기서열 결손 또는 종결코돈 생성)로 잃어버림. 또한 세포내에서 공급받을 수 있는 영양분들이 있어 스스로 합성하지 않아도 되므로 불필요한 유전자들의 기능을 잃어버리게 되었는데 이들을 가짜유전자(pseudogene)로 정의함. SE는 운동성이 있어 숙주를 옮겨 다니며 스스로 영양분을 합성하거나 받아들이므로 가금티푸스균과 추백리균의 가짜유전자들은 온전하게 기능하고 있음.

○ 살모넬라의 병원성은 다양한 유전자들이 관여하나 특히 병원성이 높은 살모넬라 혈청형들은 공통적으로 spv(salmonella plasmid virulence) 유전자들을 보유하고 있는데 spv 유전자를 싣고 있는 병원성 플라스미드를 제거하는 경우 병원성이 백만 배 감소하고, *spvB*와 *spvC* 만으로 전체 병원성 플라스미드의 병원성을 대체할 수 있어 가장 중요한 병원성 인자임(Matsui 등, 2001). 특히 SpvB는 actin-ADP-ribosylating toxin으로 선천성/후천성 면역반응과 오토파지를 억제하여 살모넬라의 세포내 생존성을 증가시키고(Jo 등, 2013; Chu 등, 2016), SpvB의 N-말단과 C-말단의 구형 구조를 서로 연결하는 polyproline linker(아미노산 프롤린의 반복구조, PPL)의 길이가 길어질수록 병원성이 높아짐(Pust 등, 2007; 권 등, 2011).

□ 국내 발생 특성

○ 가금티푸스는 1992년 국내 최초 발생 보고 후 1994년부터 전국적으로 확산하여 양계산업에 피해를 초래하고 있음.

○ 2001년 약독화 생독백신주인 SG 9R 접종으로 막대한 경제 피해를 상당히 줄였으나 야외주에 의한 발생이 지속되고 있고, 드물게 SG 9R 백신 접종 농장에 면역억제 요인이 있는 경우 백신주에 의한 유사 가금티푸스가 발생하고 있음.

○ 닭 진드기에 의한 흡혈로 섭취한 영양분이 조혈에 주로 사용되어 전체적인 면역계의 기능이 저하되고, 흡혈한 혈액 중에 SG가 존재하는 경우 흡혈한 닭 진드기는 수개월간 흡혈하지 않은 채 보균할 수 있으며 흡혈과정에서 체내 감염을 초래할 수 있어 농장 내 SG 감염의 악순환을 초래함. 따라서 닭 진드기는 가금티푸스 방제를 위해 반드시 고려해야할 중요한 인자임.

○ 최근에는 SG 9R 백신 프로그램을 적용한 농장에서도 야외주에 의한 가금티푸스 피해가 발생하고 있어 병원성과 항원성에 변화가 생긴 변종 야외주 출현이 의심되었음.

(2) 국내 SG 진화 및 고병원성 야외주 출현

○ 국내에 1992년 유입된 가금티푸스균은 생독백신 접종에도 불구하고, 여전히 분리되고 있어 병원성 변이주 출현이 의심되어 서울대학교 수의과대학 조류질병학실/가금의학실, ㈜바이오포아, ㈜녹십자수의약품에서 보유하고 있는 가금티푸스균 야외분리 61주와 SG 9R 백신주의 SpvB PPL의 길이 변화와 가짜유전

자 보유 현황을 조사하였음(김 등, 2019).

○ 그 결과 SG 9R의 PPL은 9개의 프로린으로 구성된 반면 국내 야외주의 경우 11개에서 21개까지 프로린이 두 개씩 증가한 양상(11, 13, 15, 17, 21)을 보임. 이 중 15개짜리 PPL의 빈도가 가장 높았고, 1992년 국내에 처음으로 유입된 가금티푸스균의 PPL이 15개짜리인 것을 감안하면 국내 닭에서의 적응과정을 거치면서 PPL 길이가 길어진 경우와 짧아진 경우가 모두 존재하였음.

○ 26개 야외주에 대해 가짜유전자의 유무와 PPL 길이에 따라 분류한 결과 7개의 유전형 groups(S1-S7)과 10개의 유전형 subgroups (S1-1, S1-2, S1-3, S2, S3, S4-1, S4-2, S5, S6, S7)으로 분류되었고, 이 중 S1-1(53.6%)의 빈도가 가장 높았으며 다음으로 S6(17.9%)의 빈도가 높았음(아래 표 1).

○ 흥미로운 점은 S1-1에 속하는 야외주의 경우 1992년 최초 발생이후 2016년 분리주까지 PPL 길이(15개짜리)의 변화와 가짜유전자 획득 없이('-'로 표시) 유지되고 있다는 것이며 S6로 분류된 1994년 분리주인 BP-8의 경우 13개짜리 PPL을 가지면서 *ygiD* 유전자가 가짜유전자(P로 표시)로 변하여 S1-1과 다르다는 점임. 따라서 PPL 길이 변화와 가짜유전자 획득에 오랜 시간이 걸리는 점을 고려하면 초기 국내 유입된 가금티푸스균은 유전적으로 가깝지만 서로 다른 2개 유전형으로 서로 달랐고, 현재까지 이들이 가금티푸스의 주요 원인인 것으로 사료됨.

표 1. PPL 길이와 가짜유전자 유무에 따른 국내 야외주 분류

Strain	PPL length	Year of isolation	Subgroup	*gspE*	*rfbP*	*SG_ RS06090*	*terC*	*ybdH*	*ygiD*	Frequency (%)
BP1	15	1992	S1-1	-	-	-	-	-	-	15/28 (53.6%)
BP-SG002	15	1993	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP5	15	1994	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP47	15	2000	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP49	15	2000	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP50	15	2000	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP51	15	2000	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP59	15	2001	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP60	15	2001	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP63	15	2001	S1-1	-	-	-	-	-	-	
SNU1111	15	2011	S1-1	-	-	-	-	-	-	
SNU16003	15	2016	S1-1	-	-	-	-	-	-	
SNU16009	15	2016	S1-1	-	-	-	-	-	-	
BP-SG197	15	-	S1-1	-	-	-	-	-	-	
GC-002	15	-	S1-1	-	-	-	-	-	-	
GC-128	17	2015	S1-2	-	-	-	-	-	-	1/28 (3.6%)
16-p16	13	2016	S1-3	-	-	-	-	-	-	1/28 (3.6%)
GC634	15	-	S2	P	-	-	-	-	-	1/28 (3.6%)
16,035	15	2016	S3	P	-	-	P	-	-	1/28 (3.6%)
BPSG64	17	-	S4-1	-	-	P	-	-	-	1/28 (3.6%)
SNU16037	21	2016	S4-2	-	-	P	-	-	-	1/28 (3.6%)
BPSG52	17	-	S5	-	P	P	-	-	-	1/28 (3.6%)
BP8	13	1994	S6	-	-	-	-	-	P	5/28 (17.9%)
BP176	13	-	S6	-	-	-	-	-	P	
BP202	13	-	S6	-	-	-	-	-	P	
BP226	13	-	S6	-	-	-	-	-	P	
BP177	13	-	S6	-	-	-	-	-	P	
BPSG221	11	-	S7	-	-	P	-	P	P	1/28 (3.6%)

○ 국내 가금티푸스 7개 유전형 groups의 진화 과정을 살펴보면(아래 그림 1) S1은 *gspE*, *SG_RS06090*, *ygiD*가 가짜유전자가 되어 각각 S2, S4, S6로 분화하였고, S2는 *terC*가 가짜유전자가 되어 S3로, S4는 *rfbP*가 가짜유전자가 되어 S5로, S6는 *ybdH*가 가짜유전자가 되어 S7으로 분화한 것으로 추정됨. 따라서 국내 야외 가금티푸스균은 가짜유전자를 획득하며 서서히 진화하고 있음.

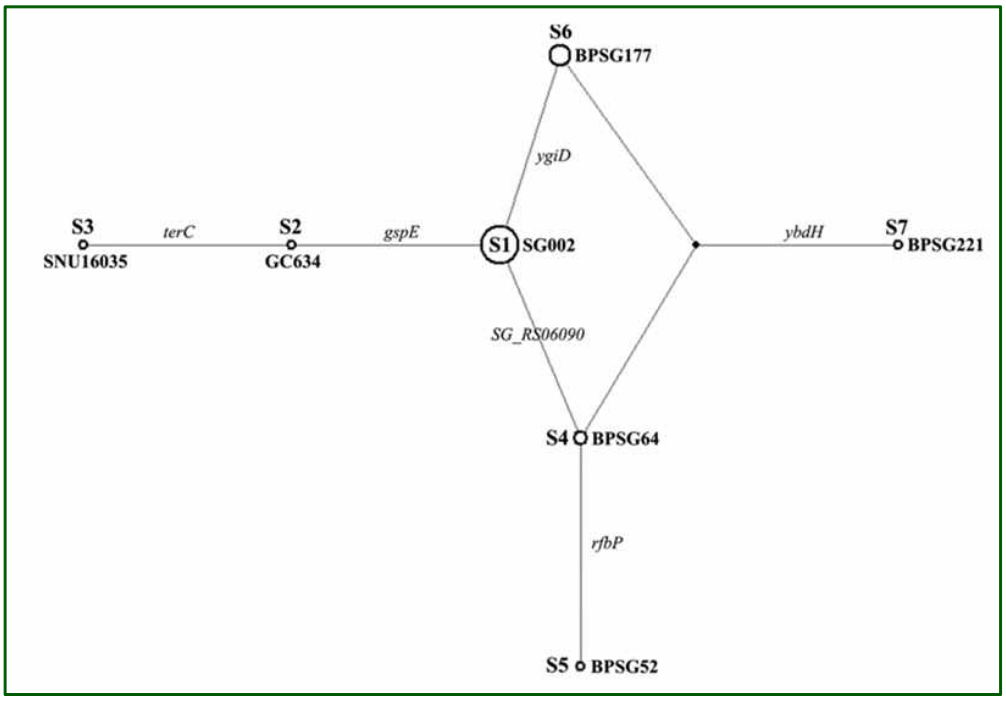


그림 1. 국내 야외주 유전형 groups의 가짜유전자 획득 과정

○ PPL길이와 병원성과의 관계를 알아보기 위해 15개짜리와 17개짜리 PPL을 갖는 야외 가금티푸스균을 반반 섞어 갈색산란계에 접종한 결과 접종 후 7일에 2마리, 8일에 3마리, 9일에 1마리, 10일에 1마리 폐사하였고, 15일부터 급이를 3일간 중단한 경우 1마리가 추가 폐사하였으며 폐사한 모든 닭에서 간종대와 괴사소가 관찰되었음. 간장과 담즙에서 세균을 분리하여 PPL 길이를 조사한 결과 7일과 8일에는 15개와 17개짜리 PPL을 갖는 가금티푸스균이 모두 분리되었으나 9일 부터는 17개짜리 PPL을 갖는 가금티푸스균만 분리되어 닭 체내에서의 잠복감염 능력 면에서 비교우위를 확인하였음(아래 표 2).

표2. 15개 및 17개짜리 PPL을 갖는 가금티푸스균의 닭 체내에서의 경쟁 우위 비교

	접종 후				
	7일	8일	9일	10일	15일
폐사계 수	2	3	1	1	1
간 분리 세균수(15개짜리/17개짜리 PPL)	12/7	13/9	0/10	0/10	0/20
담즙 분리 세균수(15개짜리/17개짜리 PPL)	미검사	미검사	0/7	0/7	0/10

○ 오히려 병원성이 감소할 것으로 예상되는 13개짜리 PPL을 갖는 가금티푸스균이 두 번째로 많이 분리되는 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요한데 닭 진드기 내 잠복하는 SG와 관련성이 있는지에 대한 연구가 필요함.

(3) 기존 백신주의 한계

○ 현재 가금티푸스 생균백신으로는 SG 9R주가 2001년 허가되어 널리 사용되고 있고, 국내에서 개발한 SR2-N6주가 2008년 12월 허가되어 사용되고 있음. SG 9R주와 SR2-N6주는 박테리오파지 감염 수용기인 지질다당체의 O-항원 부분이 결손된 돌연변이주들로 박테리오파지를 감염시켜 생존한 돌연변이주를 골라 확립하였음. SG 9R주와 SR2-N6주의 차이는 가장 강력한 병원성 유전자인 *spvB* 유전자 보유 유무와 서로 다른 O-항원 합성 유전자 돌연변이를 들 수 있음. SG 9R주의 돌연변이는 매우 낮은 확률이지만 정상적인 유전자 기능으로 되돌아가 온전한 병원성을 획득할 수 있지만 SR2-N6주는 병원성 회복이 불가능하여 더 안전함.

○ SG 9R주와 SR2-N6주는 SE 감염을 예방할 수 있으며 이런 이유로 SG 9R은 유럽에서 SE 식중독 예방을 위해 널리 사용되었으나 병원성을 회복한 변이주에 의한 가금티푸스 발생으로 시장에서 철수하였음. 국내의 경우 이러한 보고는 없으나 효능이 낮은 마렉 백신 접종 후 고병원성 마렉 바이러스 감염과 그로 인한 세포성 면역억제가 발생한 후 SG 9R 백신주에 의해 유사 가금티푸스가 발생한 사례가 간혹 보고되었으며

SG 9R 백신주의 잔존하는 병원성은 절식한 닭을 사용하여 증명되었음(권 등, 2011).

○ SR2-N6의 경우 동일한 실험 조건에서 폐사와 간병변을 초래하지 않아 매우 안전한 것으로 평가되었으나 농장의 선택을 받지 못하였음(표3). 이외에도 SG 9R은 접종계에서 배출될 수 있으며 종계에 접종하는 경우 난계대도 가능하지만 야외주 가금티푸스균마저도 사람에 대한 위험성이 전혀 없으므로 SG 9R의 인체 위험성은 전혀 없음.

표 3. 생독백신주의 잔존하는 병원성 비교

시험군	절식	폐사율	병변율	세균분리율
SG 9R	예	80%(5/5)	100%(5/5)	100%(5/5)
	아니오	0%(0/5)	20%(1/5)	20%(1/5)
SR2-N6	예	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)
	아니오	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)

(4) 신규 개발 백신주 및 백신조성의 추가 연구 및 제품화 필요성

□ 최근 개발한 병원성 회복 불능 SG9R주(Safe-9R)의 상품성

○ 가축질병대응기술개발사업(HPAI 발생농가의 전파 위험성 평가 기술 개발)을 통해 개발된 Safe-9R 백신주는 기존 SG9R주의 *rfaJ* 유전자를 knock-out 시켜 병원성 획득 위험성을 제거한 백신주로 방어효능 면에서 SG9R과 동등하고, 게놈 서열 상 *rfaJ*에서만 차이를 보였음.

- Safe-9R *rfaJ* 유전자 knock-out 확인 결과(아래 그림 2; Kim *et al.*, 2020): Safe-9R은 *rfaJ* 유전자 결손으로 결손부위 양끝의 프라이머로 PCR하는 경우 SG9R보다 작은 크리의 증폭산물을 보임(아래 그림 2).

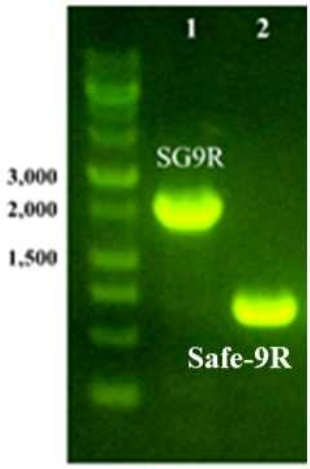


그림 2. SG9R의 *rfaJ* 유전자 knock-out 전기영동 결과

○ Safe-9R 생균백신의 방어 효능: Safe-9R은 1.2 x 10^7cfu/dose 이상에서 기존 SG9R처럼 높은 방어효과를 보였음(아래 표 4).

표 4. Safe-9R 생독백신주의 방어효능

백신구분	개체수	가금티프스균 함량(동결건조백신)	폐사수	방어율 (%)
A	10	2.0 x 10^5cfu/dose	10	0
B	10	3.7 x 10^6cfu/dose	6	40
C	10	1.2 x 10^7cfu/dose	0	100
대조군	10	-	10	0

○ Safe-9R 백신주 추가연구 필요성

- 육계 1일령 병아리 병원성 및 분무백신 효능 평가: 육계는 경구감염 시키는 경우 갈색산란계

대비 SG에 대한 감수성이 상대적으로 낮으나 호흡기를 통해 감염시키는 경우 폐사가 발생하는 것으로 보고됨(Basnet 등, 2008). 따라서 Safe-9R을 분무하여 호흡기를 통해 감염시키는 경우의 병원성과 백신효능 평가를 통해 Safe-9R의 활용성과 육계 백신 방법 개발이 필요함.

- Priming-boosting 백신 전략을 통해 근육주사로 priming하고, 호흡기로 boosting 하거나 반대로 하여 전신면역 뿐 아니라 점막면역도 자극하여 완벽한 방어가 가능하므로 해당 시험을 통한 검증이 필요함.

□ 최근 개발한 Safe-9R 기반의 내독소 독성제거주의 상품성

○ 본 연구팀이 수행한 가축질병대응기술개발사업(HPAI 발생농가의 전파 위험성 평가 기술 개발)을 통해 개발된 Safe-9R 기반의 내독소 독성제거주인 Dtx-9RL과 Dtx-9RM은 lipidA의 fatty acid chain을 결합시켜주는 *lpxL*과 *lpxM* 유전자를 각각 knock-out 시켜 내독소에 의한 닭 대식세포의 염증성 사이토카인 분비를 유의적으로 감소시킨 백신후보주로 1주령 병아리에 접종 시 체중 감소가 적어 내독소 독성을 유의적으로 낮추었고, 사독 또는 생독백신 접종 시 기존 SG9R/Safe-9R 대비 탁월한 백신효과를 보인 유망 백신후보주임(Kim 등., 2021).

- Dtx-9RL/Dtx-9RM 백신주의 닭 대식세포 염증성 사이토카인 분비에 대한 영향(아래 그림 3): Dtx-9RL과 Dtx-9RM은 닭 대식세포주에서 염증성 사이토카인의 발현량이 Safe-9R 대비 유의적으로 낮게 나타나는 것을 확인함.

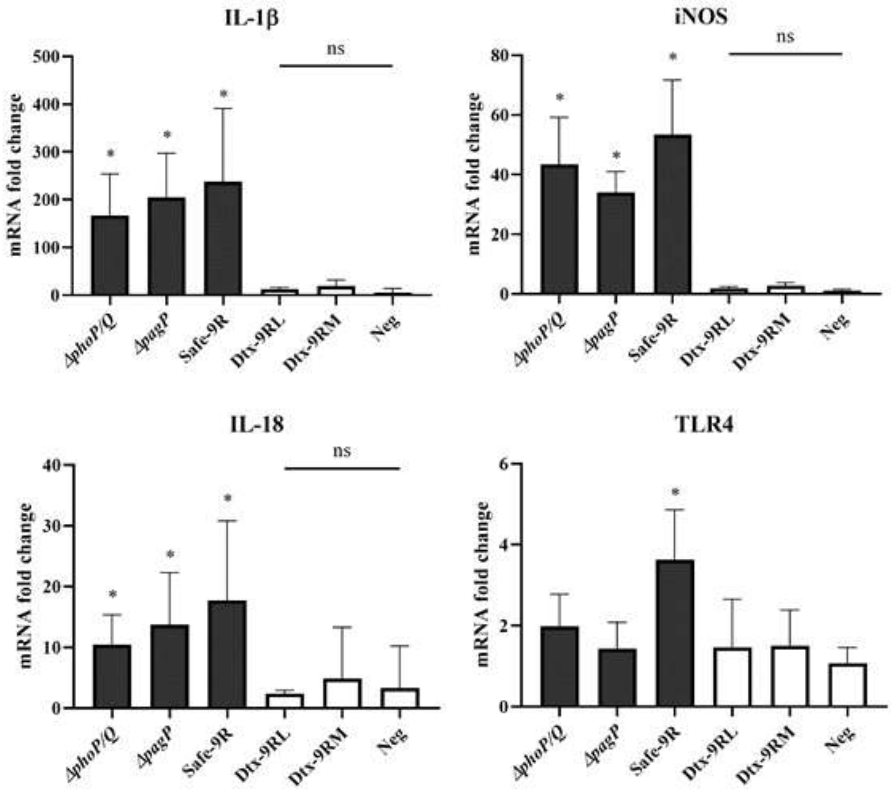


그림 3. Dtx-9RL/Dtx-9RM의 사이토카인 발현량 비교

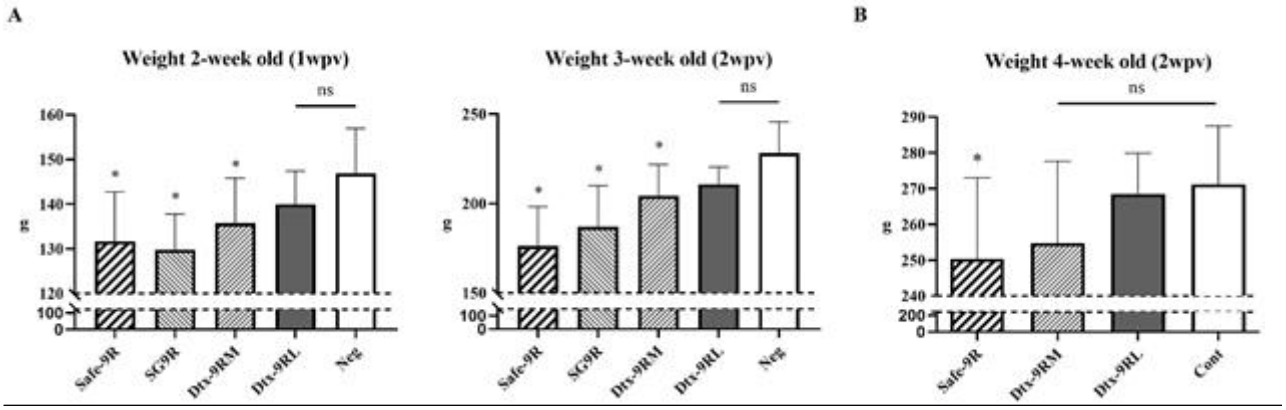
- Dtx-9RLDtx-9RM 사균오일백신의 1주령/2주령 병아리 체중 증가에 대한 영향: Dtx-9RL은 1주령과 2주령 병아리에 접종하였을 때 증체율이 대조군 대비 유의적인 차이가 나지 않았으며, Dtx-9RM은 2주령 병아리에서 차이가 나지 않았음(아래 그림 4).

그림 4. Dtx-9RL/Dtx-9RM의 증체율 비교

○ Dtx-9RL은 생독으로 접종 시 방어효능이 높지 않았으나, Dtx-9RM은 방어효능이 우수하고 다른 그룹에 비해 병변이 약하게 나타남.

- Dtx-9RL/Dtx-9RM 생균백신의 방어 효능(아래 표 6)

표 6. Dtx-9RL/Dtx-9RM의 생균백신 방어 효능 평가



그룹	Dtx-9RL		Dtx-9RM		Safe-9R		SG9R		Negative	
백신 일령	A[1]	B[2]	A	B	A	B	A	B	A	B
0[a]	7	4	2	2	2	2	3	2	4	5
1	1	0	8	4	0	1	1	1	0	1
2	0	1	0	3	3	5	5	3	2	0
3	1	1	0	1	5	2	1	4	2	1
4	1	4	0	0	0	0	0	0	2	3
심대한 간 병변[b]	20%	60%	0%	40%	80%	70%	60%	70%	60%	40%
개체 수	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[1]1주령에 백신접종, 2주령에 공격접종

[2]1일령에 백신접종, 2주령에 공격접종

[a]간 병변 평가는 다음과 같음. 0:정상; 1:5개 미만의 괴사소; 2:100개 미만의 괴사소; 3: 셀 수 없이 많은 괴사소 및 심대한 간비대

□ Dtx-9RL/Dtx-9RM 백신주 추가연구 필요성

○ SG9R은 생균백신을 어린 병아리에 10수분으로 접종 시 유의적으로 증체율에 차이가 나는 것으로 보고됨 (Lee 등. , 2005). 사균으로 접종 시 증체율에 변화가 없음을 확인하였으나 Dtx-9RM 생균백신의 1일령 갈색산란계/육계 증체율에 대한 영향 평가 필요함.

○ 선행 연구결과에서 SG9R 사균백신을 산란중인 닭에 접종 시 산란율에 악영향을 미치는 것으로 나타남. 내독소 제거 백신주를 생균 백신으로 접종 시 산란율에 영향을 미치는지 여부에 대한 평가 필요.

○ 백신 접종의 용이성과 점막면역 강화를 위해 1일령 갈색산란계/육계 생균 분무백신의 방어효능 평가 필요함.

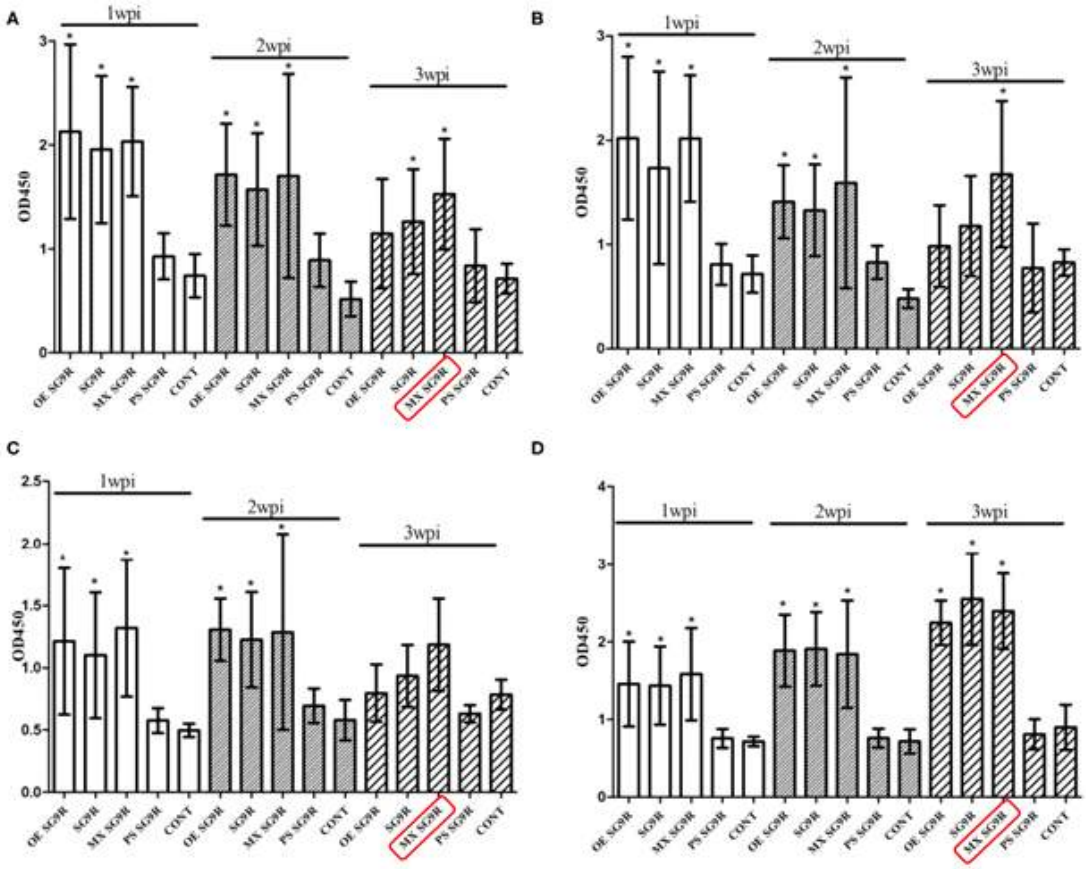
□ 최근 개발한 생균/사균 혼합백신 조성의 상품성

○ 선행연구사업(가축질병대응기술개발사업)을 통해 개발된 생균/사균 혼합백신 조성을 통한 체액성 면역 강화 기술을 이용한 백신 조성 개발 필요함.

- Dtx-9RM(생균)/Dtx-9RL(사균): 생균/사균 조성 뿐 아니라 사균의 세균수에 따른 효능도 조사 필요함.
- Dtx-9RM(생균)/Safe-9R(사균): 생균/사균 조성 뿐 아니라 사균의 세균수에 따른 효능도 조사 필요함.

○ 선행 연구결과(Kim 등., 2020)

- SG9R 사균오일백신(아래 그림의 OE SG9R), 생균 SG9R(아래 그림의 SG9R)과 열처리한 SG9R을 인산완충용액에 부유한 것(야래 그림의 PS SG9R), PS 9R과 생균 SG9R을 혼합한 것(아래 그림의 MX SG9R)을 산란계 수평아리에 접종하여 혈청의 항체를 peptide-ELISA(아래 그림의 A, B, C)와 OMPs-ELISA(아래 그림의 D)로 조사한 결과 MX SG9R의 경우 방어효능과 관련된 peptide-ELISA에서 백신 접종 3주후 다른 것 보다 높은 OD 값을 보였음(아래 그림 B에서는 유의적으로 높음).



2) 가금티푸스 백신 프로그램 개선의 필요성

(1) 어린 산란계 가금티푸스 감염 위험성 문제

○ 어린 병아리는 SG에 대한 감수성이 매우 높아 감염되는 경우 높은 폐사율을 보이고, 일부 개체는 오랜 동안 잠복감염 상태가 됨. 현재 백신 프로그램은 SG9R에 최적화되어 있어 6주령 미만 어린 병아리에는 접종하지 않고 있어 가금티푸스 방역의 사각지대로 남아 있음.

○ 따라서 어린 병아리에 접종할 수 있을 정도로 부작용이 없는 백신주를 이용한 백신 프로그램 개선이 필요함.

(2) 닭 진드기에 의한 감염 문제

○ 닭 진드기가 가금티푸스를 전파시키는 것이 실험적으로 증명되었고 (Giulio 등,. 2020), 동일한 균수의 SG를 구강으로 감염시키는 것 보다 체내에 접종하는 경우 병증이 더 심하게 나타나므로 감염된 닭 진드기가 흡혈과정에서 체내로 SG가 감염될 수 있으므로 닭 진드기 노출 시기를 고려한 백신 프로그램 최적화가 필요함.

(3) 육계 가금티푸스 발생 문제

○ 산란계에서 SG 9R 생균백신이 허용된 후 산란계에서의 발생은 급격히 감소하였으나 육계에서의 발생은 1995년 20% 내외에서 2001년 50% 정도로 급격히 상승하였고, 육계 전체 발생의 70%가 2주령이하의 어린 병아리여서 육용종계의 가금티푸스 감염으로 인한 난계대 감염이 주요 원인으로 추정되었음(Lee 등, 2003; Kim 등, 2003). 최근 3년간 국가가축방역통합시스템(KAHIS)에 신고된 발생사례를 보면 여전히 육계 발생율이 절반이상으로 토종닭, 산란계, 기타 가금(삼계, 종계 등) 보다 높은 것으로 나타나 이에 대한 대책이 필요함 (아래 그림 2). 따라서 적합한 백신이 개발되는 경우 접종을 고려할 필요가 있으므로 육계용 가금티푸스 백신 프로그램 개발이 필요함.

그림 2. 국내 가금 품종에 따른 가금티푸스 발생빈도 비교(2017-2019).

(4) *Salmonella* serovar Enteritidis(SE)에 의한 닭 파라티푸스 및 인체 식중독 지속 발생 문제

○ SG9R 백신이 접종되 이후 국내 식중독 원인균 중 1위를 차지하고 있던 SE의 순위가 급격히 하락하여 산란계 가금티푸스 백신 접종의 효과를 확실히 체감할 수 있었음.

○ 그러나 산란계 농장에서의 가금티푸스 백신 프로그램 최적화가 이루어진다면 SE 식중독 발생율을 보다 낮출 수 있을 것으로 기대됨.

○ 특히 최근 계열화 육계 농장에서 SE가 높은 빈도로 검출되고 있어 인체 식중독의 주요 원인으로 의심되고 있으므로 육계에 대한 가금티푸스 백신 프로그램을 적용하는 경우 SE 식중독 사례를 급감시킬 것으로 예상됨.

3) 수출 품목으로써 가금티푸스 백신 상용화 가능성

(1) 전 세계적인 가금티푸스 발생 및 SE 식중독 문제

○ 가금티푸스는 선진국의 경우 감염 종계 도태 사업을 통해 대규모 농장에서의 발생은 보고되고 있지 않지만 인도, 중동, 남미, 동남아시아 국가에서 발생하고 있어 SG9R 백신을 접종하고 있음.

○ 1980년대 이래로 사람의 살모넬라 식중독 사례의 대부분이 SE에 의한 것으로 오염된 계육, 계란이 주된 원인임.

○ 미국의 경우 백만 건의 살모넬라 식중독이 발생하며 100,000명당 17.6명이 살모넬라 식중독으로 입원 및 사망하며 이 중 SE가 가장 높은 22%를 차지함. EU에서도 2012-2016년 SE에 의한 식중독 사례가 증가하였으며 아르헨티나의 경우도 전체 살모넬라 식중독 중 31.8%가 SE로 그 빈도가 가장 높음(Huberman *et al.*, Poultry Science, 2018). 계육 소비가 많은 사우디아라비아의 경우 SE가 39.4%로 가장 빈도가 높음(El-Tayeb 등, 2017). EU의 경우 2016-2018년 SE 식중독 급증한 바 있으며 계란이 원인인 것으로 의심하고 있고, 향후 지속적으로 발생할 것으로 예측함(European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2020. Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis infections linked to eggs, third update 6 February 2020).

(2) 다국적기업 백신과의 차별성

○ SG9R의 *rfaJ* 유전자 돌연변이로 rough strain이었던 SG9R이 smooth strain으로 병원성을 획득하여 탁월한 SE예방 효능으로 EU 국가에서 대대적으로 접종되던 SG9R 백신이 퇴출됨.

○ SG9R 퇴출로 인한 SE 예방 시장을 Strain Sm24/Rif12/Ssqa(AviPro™ Salmonella VAC E, ELANCO) 등이 점유하였으나 백신 접종군의 경우 백신비접종군 대비 분변 배출율이 29-60%이거나 6-37%로 최근 백신접종군의 분변 배출률이 상대적으로 낮지만 백신 효능이 완벽하지 않음. 경구백신 후 보통 10일 이내에 제거 되는 것으로 알려져 있으나 경우에 따라서는 오랜 동안 잔존하는 것으로 알려짐(Huberman 등, 2018).

○ 따라서 백신 효과가 뛰어나고, 안전한 백신주의 상용화와 백신프로그램 확립을 통해 국제경쟁

력 확보가 필요함.

(3) 축적된 국내 가금티푸스 백신 노하우의 마케팅 활용 가능성

□ 기존 SG9R 백신주의 문제점 해결 노하우 활용

○ EU에서 발생한 SG9R 병원성 회복 문제 원인 규명 결과

- SG9R의 병원성 회복은 rfaJ 유전자의 nonsense mutation 부위가 필드상에서 변이가 일어나면서 다시 smooth strain으로 돌아기기 때문으로 추측됨. Safe-9R은 *rfaJ* 유전자 대부분을 제거하여 병원성 회복이 불가능하도록 설계하였음.

○ SG9R의 잔존하는 병원성 및 방어효능 문제 해결 노하우

- SG9R은 *Salmonella* virulence plasmid의 병원성 유전자들이 모두 온전하게 존재하기 때문에 병원성이 잔존함. 또한 그람 음성균이 보유한 내독소는 균이 불활화 되더라도 그 독성이 나타남. 내독소의 지질사슬 일부를 제거시 내독소의 독성 뿐만 아니라 균의 병원성까지 감소하는 것이 잘 알려져 있음. Dtx-9RL과 Dtx-9RM은 내독소 생합성 유전자를 제거하여 앞서 언급한 문제들을 해결하였으며, 특히 Dtx-9RM은 병원성이 약해지며 숙주가 면역력을 확보하는 기간이 짧아져 백신의 효능이 상승하였음.

□ 산란계 가금티푸스 생균백신 접종을 통한 SE 식중독 저감 노하우 활용

○ 국내 가금티푸스 백신 접종과 SE에 의한 식중독 저감 근거 확보

- 국내에서 가금티푸스 생백신을 적극적으로 도입한 이후 SG 뿐만 아니라 SE의 유병률도 크게 감소하였음. 현재 국내 SE 발병의 대부분은 백신이 접종되지 않는 육계로 알려져 있음. 이는 SG9R이 SG 뿐만 아니라 SE에 대한 방어효능도 있음을 의미함. 또한, SG는 SE를 경쟁적으로 배제시키기 때문에 SG 생백신의 사용은 SE에 의한 식중독을 크게 감소시킬 수 있을 것으로 기대됨.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 닭 품종에 따른 가금티푸스 감수성 비교 평가

(1) 국내 우점 야외주 및 최근 고병원성 야외주에 대한 국내 주요 양계 품종 감수성 평가

○ 갈색산란계 병아리의 가금티푸스 감수성 비교 평가

- Hy-Line brown 산란계 1주령/3주령/7주령 수평아리에 대해 우점 야외주와 고병원성 야외주의 경구 투여 시(7주령은 근육 투여) 50% mean lethal dose(MLD_{50}) 측정

○ 육계 병아리의 가금티푸스 감수성 비교 평가

- Ross 1주령/3주령 병아리에 대해 우점 야외주와 고병원성 야외주의 기관 내 투여 시 MLD_{50} 측정

2) 신규 내독소 독성제거주(Dtx-9RM) 생균백신의 안전성 확인

(1) 증체율에 대한 영향 평가

○ 산란계/육계 1일령 병아리에 생균백신 접종

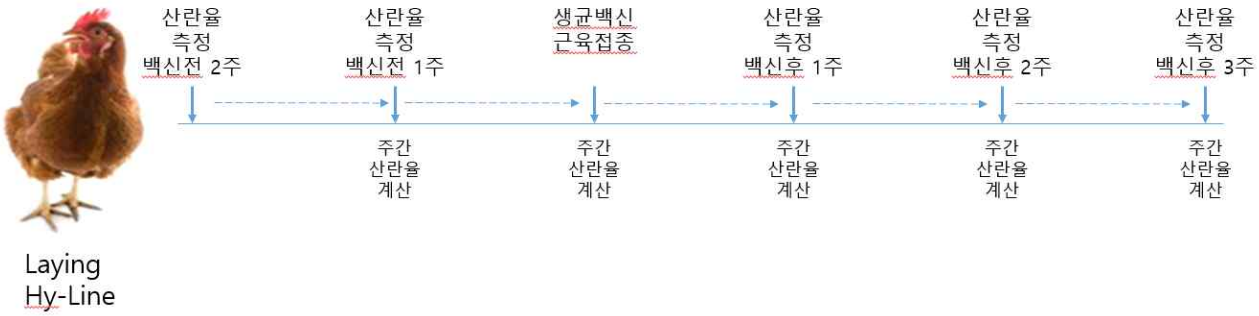
- 두 가지 접종 용량($1x10^7$cfu/수 & $1x10^8$cfu/수)을 근육접종 후 매주 3주간 체중 측정

(2) 갈색 산란계 산란율 영향 평가

○ 갈색 산란계에 생균백신 접종

- 접종 전 2주간 및 두 가지 접종 용량($1x10^7$cfu/수 & $1x10^8$cfu/수)을 근육접종 후 매주 3주간 산란율 측정하여 비교함.

3) Dtx-9RM 생균백신의 방어효능 평가



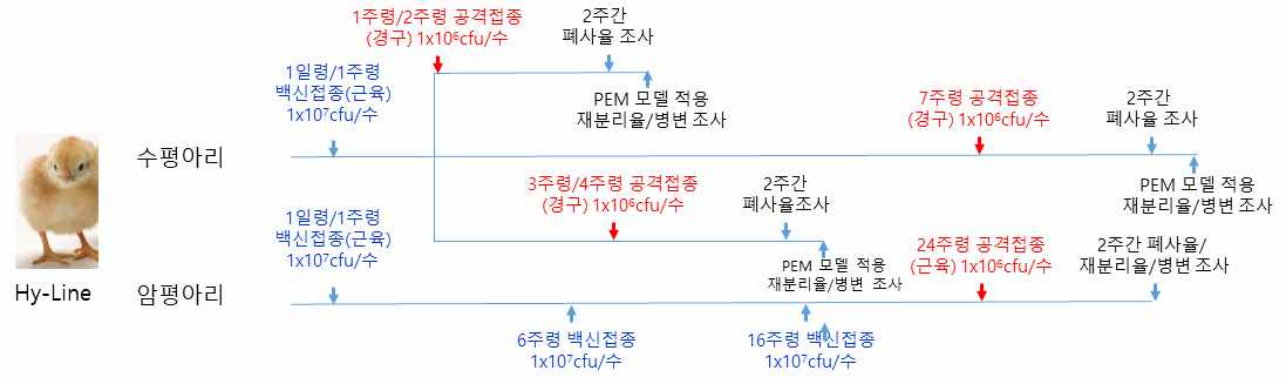
(1) SG에 대한 방어효능 평가

○ 갈색산란계 수평아리 방어효능 평가

-1주령 산란계 수평아리 생균백신 접종(1x10^{7}cfu/수) 1주/3주/7주후 공격접종(공격주 1x10^{6}cfu/수, *Per Os*) 하여 2주간 폐사율 및 세균 재분리율 조사(시험군당 10수 이상 할당)(생존계의 담즙에서 IgA 측정)

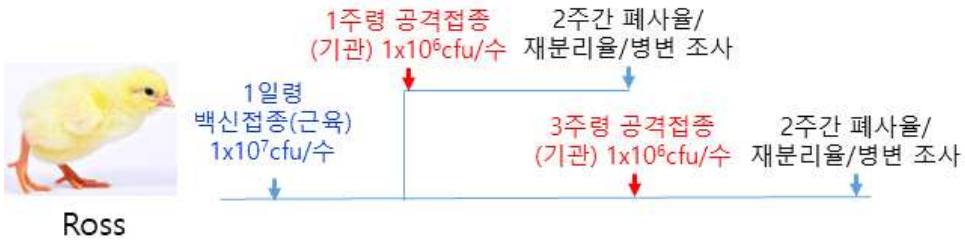
○ 갈색산란계 암평아리 방어효능 평가(닭 진드기 최초 흡혈시점 감안하여 6-16주령 중간 백신 접종 고려)

- 1주령 암평아리 생균백신 1차접종/6주령 2차접종/16주령 3차접종 후 24주령에 공격접종(공격주 1x10^{6}cfu/수, IM) 하여 2주간 폐사율 및 세균 재분리율 조사(시험군당 10수 이상 할당)



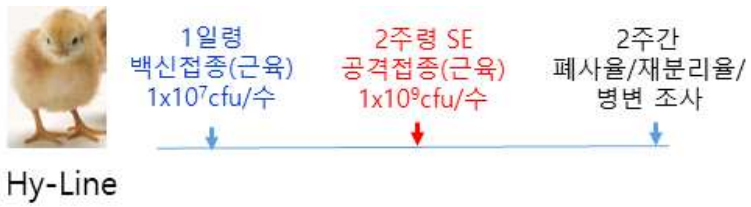
○ 육계 병아리 방어효능 평가

- 1일령 생균백신 근육 접종 1주와 3주후 기관 내 공격(1x10^{6}cfu/수)하여 2주간 폐사율 및 세균 재분리율 조사(시험군당 5수 할당)



(2) *Salmonella* serovar Enteritidis(SE)에 대한 방어 효능 평가

○ 1일령 산란계 수평아리 생균백신 접종(1x10^{7}cfu/수) 2주후 SE 공격접종(공격주 1x10^{9}cfu/수, 피하접종) 하여 2주간 폐사율, 세균 재분리율 및 병변 조사(시험군당 10수 이상 할당)

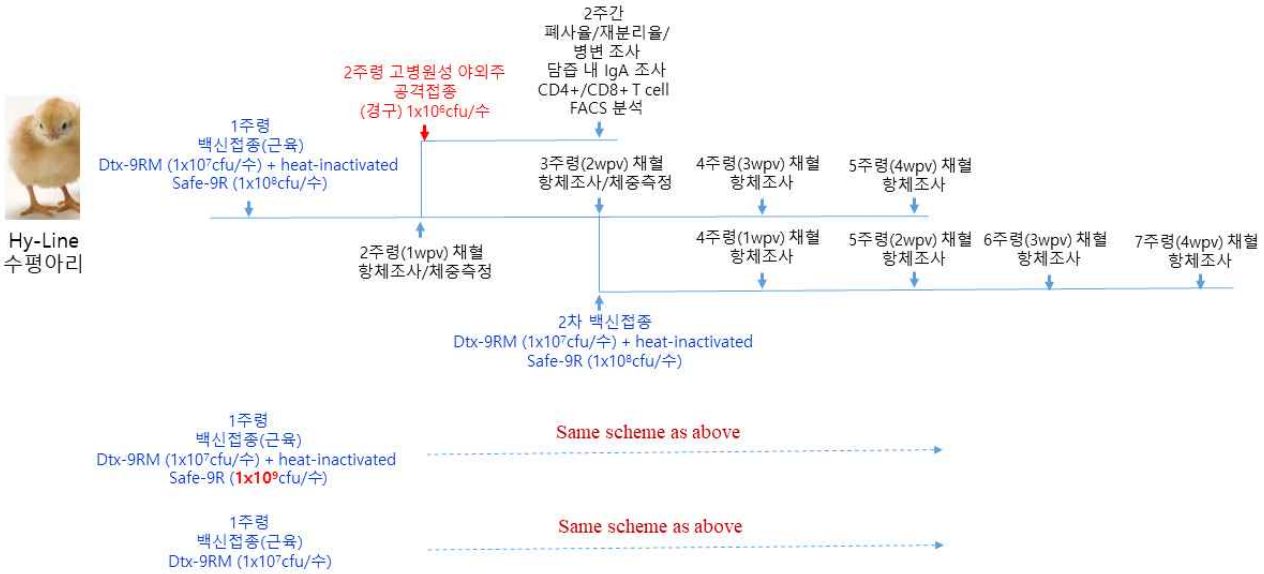


4) 생균/사균 혼합 백신 조성 최적화(백신 2주 후 boosting 백신 효과 평가)

(1) Dtx-9RM + heat-inactivated Safe-9R

○ 갈색산란계(1주령) 수평아리 백신 접종 1주후 고병원성 야외주 공격접종

- 2종 백신: Dtx-9RM ($1x10^7$cfu/수) + heat-inactivated Safe-9R ($1x10^8$cfu/수) & Dtx-9RM ($1x10^7$cfu/수) + heat-inactivated Safe-9R ($1x10^9$cfu/수)
- 2주간 폐사율 관찰 및 담즙내 IgA 측정
- 혈액내 CD4+/CD8+ T cells FACS 분석
- 1차백신 접종 후 매주 4주간 혈청검사(peptide-ELISA)
- 2주후 2차백신 접종하고, 매주 4주간 혈청검사(peptide-ELISA)

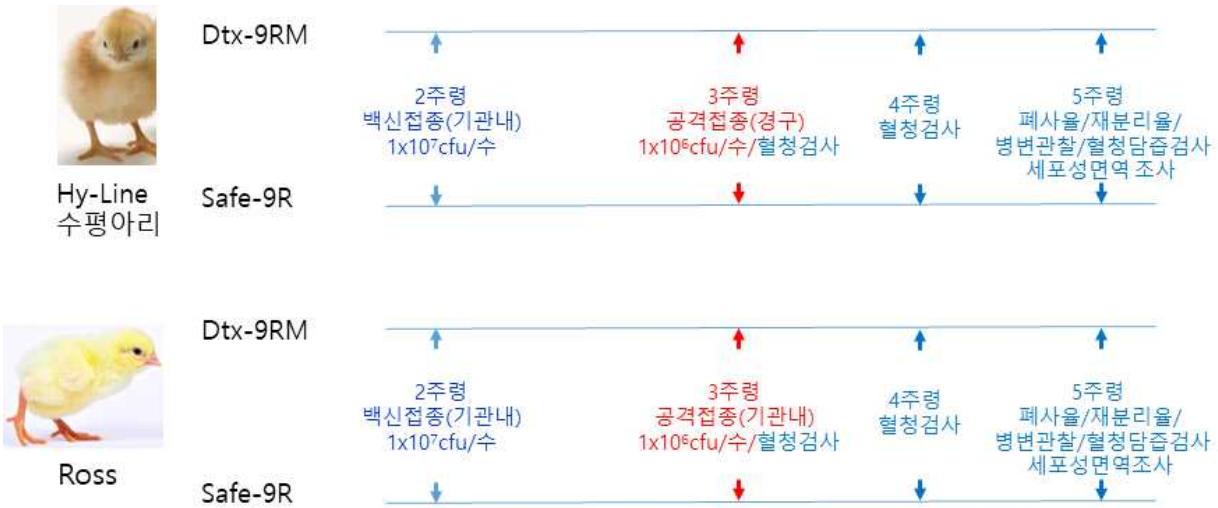


5) 분무백신 효능 평가

(1) 호흡기 경로 단독백신의 효능 평가

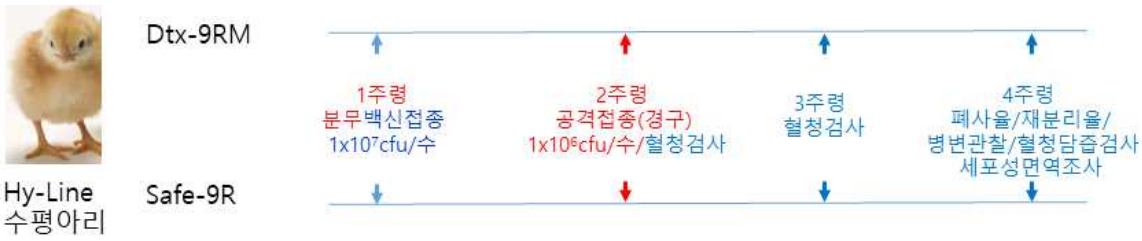
○ 2주령 산란계/육계 기관 내 백신 효능 평가

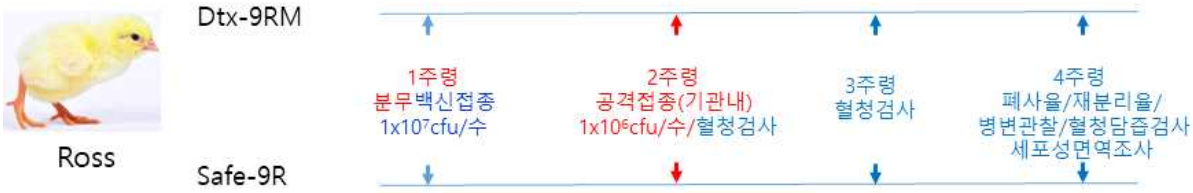
- Dtx-9RM & Safe-9R 기관 내 백신 접종
- 공격접종: 백신 1주후 고병원성 야외주 경구 또는 기관 내 접종하여 2주간 관찰
- 혈청/담즙검사: 백신 접종 1주/2주/3주간 항체 검사



○ 1주령 산란계/육계 분무백신 효능 평가

- Dtx-9RM & Safe-9R 분무백신 접종
- 공격접종: 백신 1주후 고병원성 야외주 경구 또는 기관 내 접종하여 2주간 관찰
- 혈청/담즙검사: 백신 접종 1주/2주/3주간 항체 검사
- 세포성면역 조사: 혈액 내 CD4+/CD8+ T cells FACS 분석(효과 확인되는 경우 실시)





(2) Priming-boosting 백신 효능 평가

○ 1주령 산란계/1일령 육계 Dtx-9RM 근육백신(생균 단독 또는 생균/사균 혼합백신 효과 있는 것 선택하여 접종)

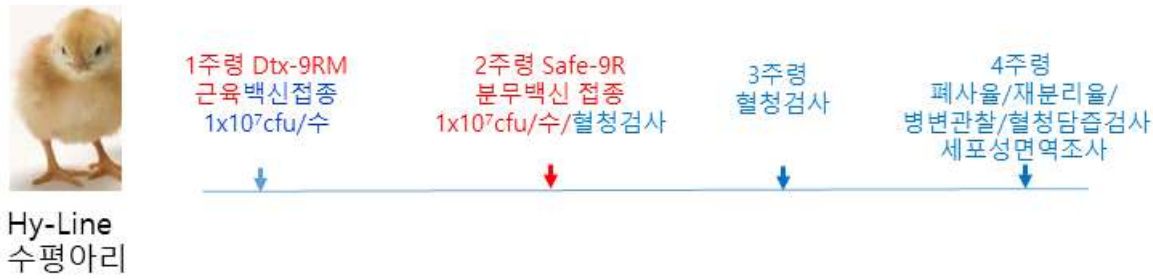
- $1x10^7$cfu/수 접종

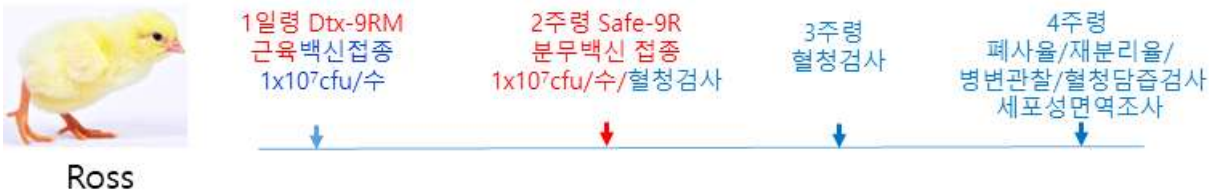
○ 2주령 산란계/육계 Safe-9R 2차 분무백신

- $1x10^7$cfu/수 접종(분무백신 역가 최적화 후 결정)

○ 백신 효능 평가

- 혈청항체 조사/점막항체 조사
- 세포성면역 조사: 혈액 내 CD4+/CD8+ T cells FACS 분석(효과 확인되는 경우 실시)





3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

(가) Dtx-9RM-dK 백신주 제작

□ Dtx-9RM-dK 생백신주 제작 및 게놈 분석

- Dtx-9RM으로부터 kanamycin 내성 유전자 제거하여 Dtx-9RM-dK 신규 백신주 제작

○ 내독소 독성 제거 가금티푸스 백신주의 항생제 내성 유전자 제거

- 내독소 독성 제거 가금티푸스 백신주 Dtx-9RM은 제거한 내독소 위치(*lpxM*)에 kanamycin 내성 유전자가 삽입되어 있음. 백신주로 사용하기에 항생제 내성 유전자는 적절하지 않기 때문에 이를 제거해야함.

- 내독소 제거를 위해 사용한 *E. coli* gene deletion kit (Gene Bridges, Heidelberg, Germany)는 삽입된 항생제 유전자 양쪽에 Flippase recognition target (FRT) site를 남겨 flippase (FLP)로 추후 제거할 수 있도록 하였음. FRT site가 특정 sequence 양쪽에 존재할 시 FLP를 통해 해당 sequence를 제거(exclusion)하거나 뒤집는 (inversion) 등의 recombination이 가능함.

그림 1. Dtx9RM 균주 안의 항생제 내성 유전자와 FRT site

- FLP가 삽입된 plasmid를 Dtx-9RM에 transformation 후 발현시켜 kanamycin 내성 유전자를 제거함. LB agar와 LB-kana agar에 균을 모두 접종하여 LB-kana에서 자라지 않는 균주를 선별.

- 선별한 균 (이하 Dtx-9RM)과 항생제 내성이 남아있는 균 (이하 Dtx-9RM-kana), 그리고 내독소가 제거되지 않은 Safe-9R을 electrophoresis하여 size를 비교

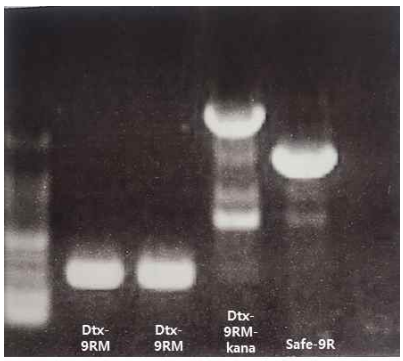


그림 2. Dtx-9RM, Dtx-9RM-kana, 그리고 Safe-9R의 *lpxM* 유전자 위치 크기 비교

- 항생제 내성 유전자가 삽입되어 있는 Dtx-9RM-kana이 가장 크며, 기존 *lpxM* 유전자와 항생제 내성 유전자 모두 제거된 Dtx-9RM이 가장 작은 크기를 보임. 항생제 내성 유전자의 제거는

sequencing으로도 확인하였음.

○ 내독소 독성 제거 가금티푸스 백신주의 게놈 분석

- *Salmonella* Gallinarum의 게놈 크기는 약 4.6Mb로 고전적인 유전자 분석법으로는 분석이 어려움. Next generation sequencing (NGS)을 통해 Dtx-9RM의 게놈의 기존 백신주 SG9R 대비 변이가 일어난 부위를 확인.

- 두 균주를 NCBI의 NC_011274.1 (Salmonella Gallinarum 287/91)를 reference 균주로 삼고 re-sequencing으로 비교하였음. 총 40개의 single nucleotide polymorphism (SNP)가 확인되었으며, 그 중 coding region은 9개로 확인됨. 하지만 silent mutation이나 pseudogene 등을 배제하고 나머지를 직접 sequencing을 통해 분석한 결과 1개의 missense mutation만이 다른 것으로 확인.

- Aminodeoxychorismate synthase component 1 유전자의 7번째 아미노산이 proline에서 leucine으로 바뀜. 이는 SG9R과는 다르지만 reference 균주 287/91과 동일하여 기능적으로 큰 변화가 있을 것으로 기대되지는 않음.

표 1. Dtx-9RM-dk vs. SG9R의 SNP

SG9R	Dtx9RM-dk	mutation	function
	600352		
	620451		Non-coding
	643923		
951765	951764		frame shift로 모두 pseudogene
1358660		missense mutation	aminodeoxychorismate synthase component 1
1678477	1678471		
1857683			Non-coding
2079770	2079783		
2386646	2386644		
	2411842	inframe deletion	NADH-quinone oxidoreductase subunit M
	2495707	inframe deletion	hypothetical protein
2768479	2768480		
2928428	2928426		Non-coding
3596603	3596600		silent mutation
3933392	3933391	missense mutation	trimeric autotransporter adhesin SadA
	4278435	frame shift	capsule biosynthesis GfcCfamility protein
4555538			
4555544			
4555559			
4555575			
4555600			
4555604			
4555607			
4555611			
4555655			
4555658			
4555661			
4555667			yjiK
4555670			
4555799			
4555809			
4555814			
4555815			
4555817			
4555849			
4555850			
4555853			
4555863			
4555874			
4576333		missense mutation	DUF455 domain containing protein

(표의 숫자는 reference strain 287/91에서의 nucleotide 위치를 의미)

(나) Dtx-9RM-dK 생균 백신의 안전성 확인

□ 증체율에 대한 영향 평가

○ 산란계/육계 1일령 병아리에 생균백신 접종

- 두 가지 접종 용량(1x10^{7}cfu/수 & 1x10^{8}cfu/수)을 근육접종 후 매주 3주간 체중 측정

○ Dtx-9RM-dK의 안전성 평가 - 체중비교

- 1주령에 Dtx-9RM-dK과 SG9R을 생독 1dose와 10dose로 각각 접종, 음성대조군을 포함하여 총 5그룹에 대한 증체율을 비교함.
- 1주령 접종 전 미리 닭의 체중을 측정하여 그룹 별 평균 체중을 비슷하게 맞춤.

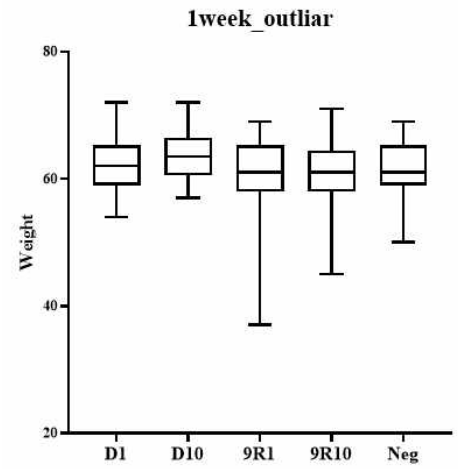


그림. 1주령 백신 접종 전 닭의 평균 체중

- D1: Dtx-9RM-dK 1dose, D10: Dtx-9RM-dK 10dose, 9R1: SG9R 1dose, 9R10: SG9R 10dose, Neg: Negative; 표준편차가 커서 각 그룹의 최대 최소를 한 마리씩 제거하여 비교

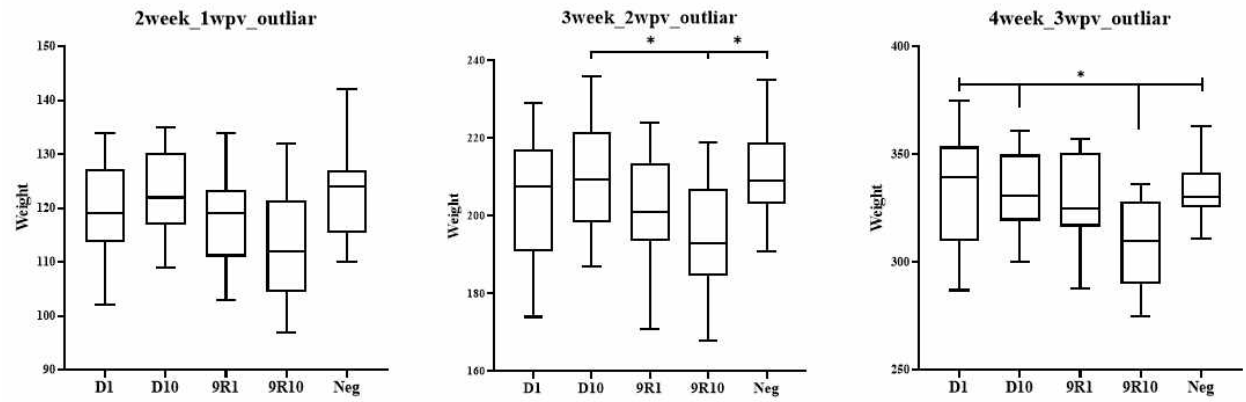


그림. 백신접종 후 1~3주의 체중 평균 그래프

- 1wpv: week post vaccination, *: p값이 0.05보다 작아 유의적인 차이가 나타남
- 백신 접종 후 시간이 지날수록 9R10의 체중 평균값이 다른 그룹에 비해 낮아지는 것이 관찰됨. 2wpv에는 9R10이 D10과 Neg 대비 유의적으로 낮은 평균값을 보였으며, 3wpv에서는 9R1을 제외한 모든 그룹과 유의적인 차이를 확인할 수 있었음.

- Dtx-9RM-dK을 10dose로 접종한 D10은 Negative 대비 체중의 유의적인 차이가 나타나지 않아 Dtx-9RM-dK은 안전성 면에서 기존 백신 SG9R대비 우월함.

□ **갈색 산란계 산란율 영향 평가**

- **HyLine brown 34주령 산란계: SG9R 생균백신 접종(6주령/16주령 백신 접종 완료)**
- 각 백신주 **1x10^{7}cfu/수를 근육접종 후 백신 접종 전후 수당 산란율 측정**

시험군	백신접종 전	백신접종 후		
	산란율(일간수당, 7일간 15수)	산란율(일간수당, 6일간 14수 또는 15수)	백신 전후 산란율 변화	전기간 산란율
Dtx-9RM-dK	19.0%(20/105)	16.7%(14/84)*	-2.3%	18.0%(34/189)
Dtx-9RL	21.9%(23/105)	22.2%(20/90)	+0.3%	22.0%(43/195)
Negative	16.2%(17/105)	17.8%(16/90)	+1.6%	16.9%(33/195)
Safe-9R	21.0%(22/105)	13.3%(12/90)	-7.7%	17.4%(34/195)

*** 1수 폐사: 백신 접종과 관련 없는 병변 보임.**

- **결과 분석**
  - ■ 시험군간 유의적인 산란율 변화 없음.
  - ■ 케이지에서 산란중인 실용계를 평사로 옮기고 산란율 60% 이상 급감: 순위 다툼 심하고, 밀사의 영향(케이지 대비 공간은 넓으나 실험 종료후 동일 공간에서 3수 사육 시(기존 15수) 수당 산란율 증가
  - ■ 산란계에서 SG9R 백신 접종에 의한 산란율 저하는 관찰되지 않으므로 Dtx-9RM-dK 접종에 의한 산란율 저하는 예상되지 않으며 안전성 평가 실험으로는 어린 병아리 증체율 비교 평가를 추천

(다) Dtx-9RM-dK의 방어효능 평가

□ **Dtx-9RM-dK 생백신의 방어 효능 평가-1**

- 생독 백신의 생균수는 1x10^{7}cfu/dose
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종-2주 후 SG197 및 BPSG64 경구 공격 접종 (1x10^{6}cfu/수)
- 세균분리: MacConkey 한천배지에 간 절단부위 도말하여 37℃ 종야 배양
- 폐사율 및 공격주 재분리율

	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군		SG9R 생독백신 접종군		무백신 공격대조군
	SG197	BPSG64	SG197	BPSG64	SG197
폐사율	2/10	2/5	0/10	0/5	5/10
재분리율	3/10	3/5	8/10	5/5	5/10

- 육안 간병변 비교
  ■ 백신 접종 2주후 3일간 절식을 실시하여 일반적인 평가 방법과 달리 병변이 과다 반영될 수 있음.

Group	Dtx-9RM-dK		SG9R		Negative
Liver Lesion Scoring	SG 197	SG 64	SG 197	SG 64	SG 197
0	4	0	0	0	5
1	2	0	2	0	0
2	2	2	2	2	0
3	0	1	6	3	0
4	2	2	0	0	5
Number of Chickens	10	5	10	5	10

* 간 병변 scoring: 괴사 반점 없음 (0 점); 5개 이내의 괴사 반점 (1점); 5-20개 이내의 괴사 반점 (2점); 20개 이상의 괴사 반점 (3점); 폐사 (4점)

- 결과에 대한 평가
  ■ 백신접종군과 대조군간 유의적인 폐사율/세균 재분리율 차이 관찰되지 않음 (P>0.05).
  ■ 시험군간 백신 세균수와 공격균주 세균수 관리 필요
  ■ 기존의 공격주인 SG197을 이용한 병원성 모델의 경우 사용하는 병아리에 따라 폐사율의 차이가 있으며 과거 대비 매우 낮은 폐사율을 보임. 따라서 공격 세균수 상향 필요함.

□ **Dtx-9RM-dK 생백신의 방어 효능 평가-2**
- 생독 백신의 생균수는 $1x10^7$cfu/dose
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종-2주 후 SG197 및 BPSG64 경구 공격 접종 ($1x10^6$cfu/수)
- 세균분리: MacConkey 한천배지에 간 절단부위 도말하여 37℃ 종야 배양
- 폐사율 및 공격주 재분리율

	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군		SG9R 생독백신 접종군		무백신 공격대조군	
	SG197	BPSG64	SG197	BPSG64	SG197	BPSG64
폐사율	0/10	2/5	0/10	0/5	0/10	1/5
재분리율	1/10	3/5	5/10	1/5	3/10	1/5

- 육안 간병변 비교
  ■ 백신 접종 2주후 3일간 절식을 실시하여 일반적인 평가 방법과 달리 병변이 과다 반영될 수 있음.

Group	Dtx-9RM-dK		SG9R		Negative	
Liver Lesion Scoring	SG 197	BPSG 64	SG 197	BPSG 64	SG 197	BPSG 64
0	5	0	1	1	7	4
1	2	2	1	2	1	0
2	1	0	3	0	0	0
3	2	1	5	2	2	0
4	0	2	0	0	0	1
Number of Chickens	10	5	10	5	10	5

* 간 병변 scoring: 괴사 반점 없음 (0 점); 5개 이내의 괴사 반점 (1점); 5-20개 이내의 괴사 반점 (2점); 20개 이상의 괴사 반점 (3점); 폐사 (4점)

- 결과에 대한 평가
  ■ 백신접종군과 대조군간 유의적인 폐사율/세균 재분리율 차이 관찰되지 않음 (P>0.05).
  ■ 시험군간 백신 세균수와 공격균주 세균수 관리 필요
  ■ 기존의 공격주인 SG197을 이용한 병원성 모델의 경우 사용하는 병아리에 따라 폐사율의 차이가 있으며 과거 대비 매우 낮은 폐사율을 보임. 따라서 공격 세균수 상향 필요함.

□ **Dtx-9RM-dK 생백신의 *Salmonella* Gallinarum 병원성 변이주 방어 효능 평가-3**
- 생독백신의 생균수는 $1x10^7$cfu/dose
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종-2주 후 BPSG64 경구 공격 접종 ($1x10^7$cfu/수)
- 세균분리: MacConkey 한천배지에 간 절단부위 도말하여 37℃ 종야 배양
- 폐사율 및 공격주 재분리율

관찰 항목	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군	무백신 공격대조군
폐사율	1/10	8/10
재분리율	1/10	10/10

- 육안 간병변 비교
  ■ 백신 접종 2주후 3일간 절식을 실시하여 일반적인 평가 방법과 달리 병변이 과다 반영될 수 있음.

간병변 병변점수	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군	무백신 공격대조군
0	2	
1	7	1
2		1
3		
4	1	8
시험계 수	10	10

* 간 병변 scoring: 괴사 반점 없음 (0 점); 5개 이내의 괴사 반점 (1점); 5-20개 이내의 괴사 반점 (2점); 20개 이상의 괴사 반점 (3점); 폐사 (4점)

- 결과에 대한 평가
  ■ 1일령 백신 접종 후 2주후 공격 접종에도 불구하고, Dtx-9RM-dK 생백신의 병원성 변이주인 BPSG64에 대한 방어효능이 확인됨.

□ **Dtx-9RM-dK 생백신의 *Salmonella* Gallinarum 병원성 변이주 방어 효능 평가-4**
- 생독백신의 생균수는 $1x10^7$cfu/dose
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종-2주 후 BPSG64 경구 공격 접종 ($1x10^7$cfu/수)
- 세균분리: MacConkey 한천배지에 간 절단부위 도말하여 37℃ 종야 배양
- 폐사율 및 공격주 재분리율

관찰 항목	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군	무백신 공격대조군
Mortality rate	1/10	3/10
Re-isolation rate	4/10	4/10

- 육안 간병변 비교
  ■ 백신 접종 2주후 3일간 절식을 실시하여 일반적인 평가 방법과 달리 병변이 과다 반영될 수 있음.

Group Liver Lesion Scoring	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군	무백신 공격대조군
0	2	3
1		2
2	4	
3	3	2
4	1	3
Number of Chickens	10	10

* 간 병변 scoring: 괴사 반점 없음 (0 점); 5개 이내의 괴사 반점 (1점); 5-20개 이내의 괴사 반점 (2점); 20개 이상의 괴사 반점 (3점); 폐사 (4점)

- 결과에 대한 평가
  - ▪ 1일령 백신 접종 후 2주후 공격 접종에도 불구하고, Dtx-9RM-dK 생백신의 병원성 변이주인 BPSG64에 대한 방어효능이 확인됨.

□ *Salmonella* serovar Enteritidis/serovar Typhimurium에 대한 방어 효능 평가
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신/1주후 공격 모델
- 공격주: SE38 (*Salmonella* serovar Enteritidis) 피하로 10^7cfu/수 접종
- 공격주: ST09-51 (*Salmonella* serovar Typhimurium) 피하로 10^7cfu/수 접종(pilot study)
- 세균분리: MacConkey 한천배지에 간 절단부위 도말하여 37℃ 종야 배양
- 결과에 대한 평가
  - ▪ 동물모델 최적화를 통한 방어효능 평가 필요

Group	Dtx-9RM-dK 생독백신 접종군	무백신 공격대조군
SE re-isolation (Liver)	0/10	2/10
SE re-isolation (Liver)	0/2	1/2

(라) 생균/사균 혼합 백신 방어 효능 평가

□ **Dtx-9RM-dK 생독백신+heat-inactivated Dtx-9RM-dK 사독백신 혼합백신의 *Salmonella* Gallinarum 병원성 변이주 방어 효능 평가**
- Dtx-9RM-dK 생독백신 생균수: $1x10^7$cfu/dose
- Dtx-9RM-dK 사독백신 균수: $1x10^9$cfu/dose
- 1일령 백신 접종-2주 후 BPSG64 공격 접종 ($1x10^7$cfu/chicken PO)
- 세균분리: MacConkey 한천배지에 간 절단부위 도말하여 37℃ 종야 배양
- 폐사율 및 공격주 재분리율

관찰 항목	Dtx-9RM-dK 생독백신+Dtx-9RM-dK 사독백신	무백신 공격대조군
폐사율	1/10	8/10
재분리율	1/10	10/10

- 육안 간병변 비교
  ■ 백신 접종 2주후 3일간 절식을 실시하여 일반적인 평가 방법과 달리 병변이 과다 반영될 수 있음.

Group Liver Lesion Scoring	Dtx-9RM-dK 생독백신+Dtx-9RM-dK 사독백신	무백신 공격대조군
0		
1	7	1
2	1	1
3	1	
4	1	8
Number of Chickens	10	10

* 간 병변 scoring: 괴사 반점 없음 (0 점); 5개 이내의 괴사 반점 (1점); 5-20개 이내의 괴사 반점 (2점); 20개 이상의 괴사 반점 (3점); 폐사 (4점)

- 생백신+사백신 혼합백신에서 유전자 재조합 가능성
  ■ 사백신의 사균 유래 유전자가 생백신의 게놈에 재조합이 일어날 수 있는 가능성에 대해 인식해야 하며 본 백신 조성의 경우 동일한 게놈 조성이므로 gain-of-function 위험성은 없음.

□ **Dtx-9RM-dK 생독백신+heat-inactivated Dtx-9RL 사독백신 혼합백신의 *Salmonella* Gallinarum 병원성 변이주 방어 효능 평가**
- Dtx-9RM-dK 생독백신 생균수: $1x10^7$cfu/dose
- Dtx-9RL 사독백신(열처리) 균수: $1x10^9$cfu/dose
- 1일령 백신 접종-2주 후 BPSG64 공격 접종 ($1x10^7$cfu/chicken PO)
- 폐사율 및 공격주 재분리율

관찰 항목	Dtx-9RM-dK 생독백신+Dtx-9RL 사독백신	무백신 공격대조군
Mortality rate	1/10	3/10
Re-isolation rate	5/10	4/10

- 육안 간병변 비교

■ 백신 접종 2주후 3일간 절식을 실시하여 일반적인 평가 방법과 달리 병변이 과다 반영될 수 있음.

Group Liver Lesion Scoring	Dtx-9RM-dK 생독백신+ Dtx-9RL 사독백신	무백신 공격대조군
0	1	3
1	1	2
2	3	
3	5	2
4		3
Number of Chickens	10	10

* 간 병변 scoring: 괴사 반점 없음 (0 점); 5개 이내의 괴사 반점 (1점); 5-20개 이내의 괴사 반점 (2점); 20개 이상의 괴사 반점 (3점); 폐사 (4점)

- 생백신+사백신 혼합백신에서 유전자 재조합 가능성
  ■ 사백신의 사균 유래 유전자가 생백신의 게놈에 재조합이 일어날 수 있는 가능성에 대해 인식해야 하며 본 백신 조성의 경우 Dtx-9RM-dk 생백신과 게놈이 거의 같으면서 lpxL 유전자 knock-out 되어 병원성이 더 낮은 Dtx-9RL과의 혼합백신이므로 gain-of-function 위험성은 없음.

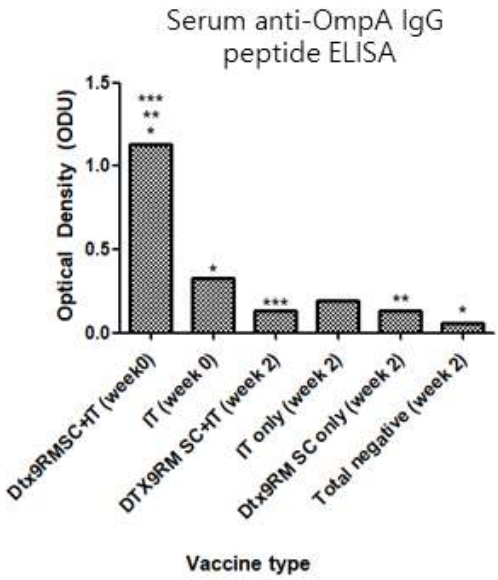
□ ***Salmonella* serovar Enteritidis/serovar Typhimurium에 대한 방어 효능 평가**
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신/1주후 공격 모델
- 공격주: SE38 (*Salmonella* serovar Enteritidis) 피하로 10^7cfu/수 접종
- 공격주: ST09-51 (*Salmonella* serovar Typhimurium) 피하로 10^7cfu/수 접종(pilot study)
- 결과에 대한 평가
  ■ 동물모델 최적화를 통한 방어효능 평가 필요하나 백신 접종군에서는 SE와 ST가 분리되지 않음.

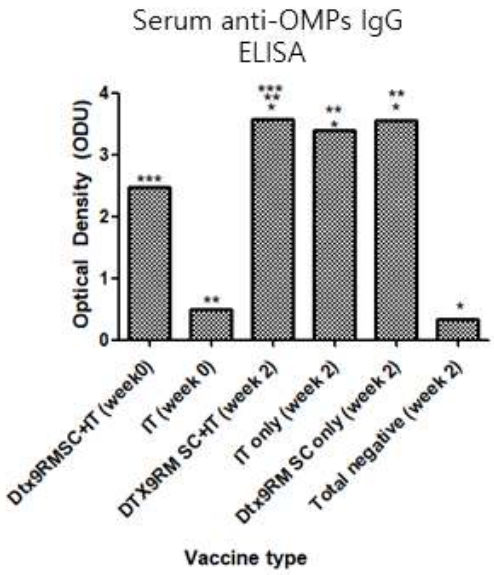
Group	Dtx-9RM-dK 생독백신+ Dtx-9RL 사독백신	무백신 공격대조군
SE re-isolation (Liver)	0/10	2/10
SE re-isolation (Liver)	0/2	1/2

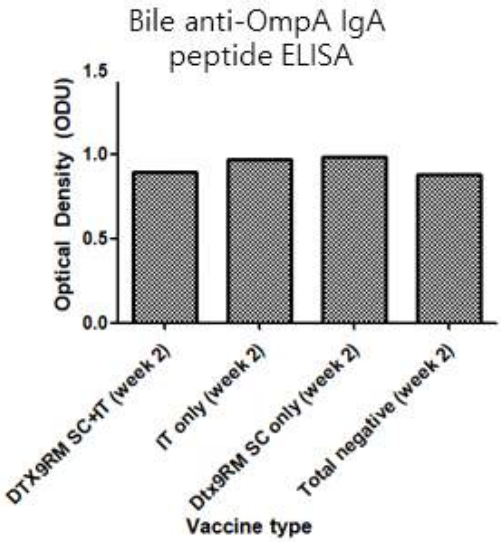
(마) 분무백신 효능 평가

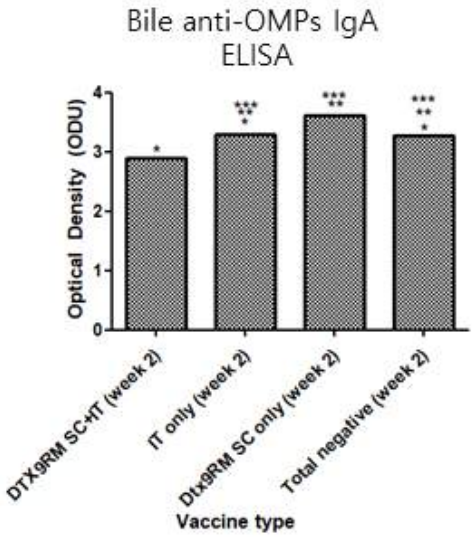
□ 호흡기 경로 Safe-9R 백신의 효능 평가
- 생독백신의 생균수는 $1x10^7$cfu/dose
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종 및 4주 후 SG9R 기관 접종 ($1x10^7$cfu/수)

- OmpA peptide ELISA, total OMPs ELISA를 이용하여 혈청 내 특이 IgG 및 담즙 내 특이 IgA 측정
- 결과에 대한 평가
  - ■ OmpA에 대한 Dtx-9RM-dK 프라이밍 백신에 의한 혈청내 anti-OmpA IgG는 증가한 것으로 판단되나 담즙내 anti-OmpA IgA에는 유의적인 차이 없음.
  - ■ OMPs에 대한 특이 항체는 Dtx-9RM-dk 프라이밍 백신에 의해 혈청 내 특이 IgG 역가가 유의적으로 높은 수준을 유지하였고, SG9R 기관내 백신에 의해 혈청내 특이 IgG 항체 역가의 유의적인 증가가 확인됨.
  - ■ 따라서, SG9R 기관내 백신 접종에 의한 혈청 항체 상승 효과가 확인되어 향후 분무 백신 접종의 가능성이 확인됨.









(바) 사독오일백신 제조법에 따른 백신 효능 및 접종 반응 비교

□ 사독백신 제조 및 백신 접종

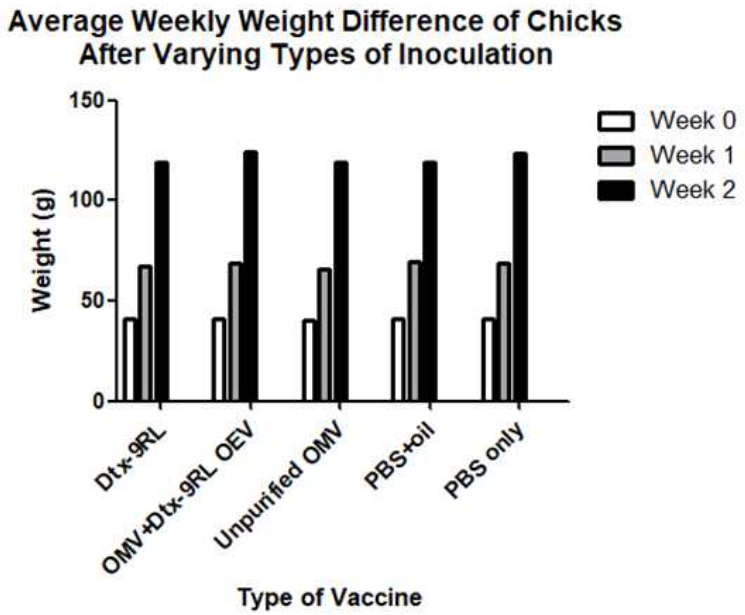
- Dtx-9RL 제조
  - ■ 배양액을 원심분리(13,000xg for 30m)하고, 상층액 제거 후 PBS로 부유한 후 원심분리하여 상층액 제거 후 적정한 세균 농도로 부유함

■ 열처리를 통해 불활화 한 후 세균과 Montanide ISA70을 3:7 비율로 혼합하여 사독오일백신 제조(1x10^8cfu/dose)

- Unpurified/non-concentrated OMVs(Unpurified OMVs) 제조
  ■ 배양액을 원심분리(13,000xg for 30m)하고, 상층액만 수확하여 Montanide ISA70과 3:7 비율로 혼합하여 오일백신 제조
- OMV+Dtx-9RL OEV (oil emulsion vaccine) 제조
  ■ 배양액을 적당한 세균 농도로 PBS를 이용하여 희석한 후 열처리 하였고, Montanide ISA70을 3:7 비율로 혼합하여 사독오일백신 제조(1x10^8cfu/dose)
- PBS+oil 제조
  ■ PBS를 Montanide ISA70과 3:7 비율로 혼합하여 오일백신 제조
- 갈색산란계 수평아리(HyLine brown) 1일령 백신 접종
  ■ 각 백신의 1dose를 10수의 시험계 피하 접종 후 3주간 관찰

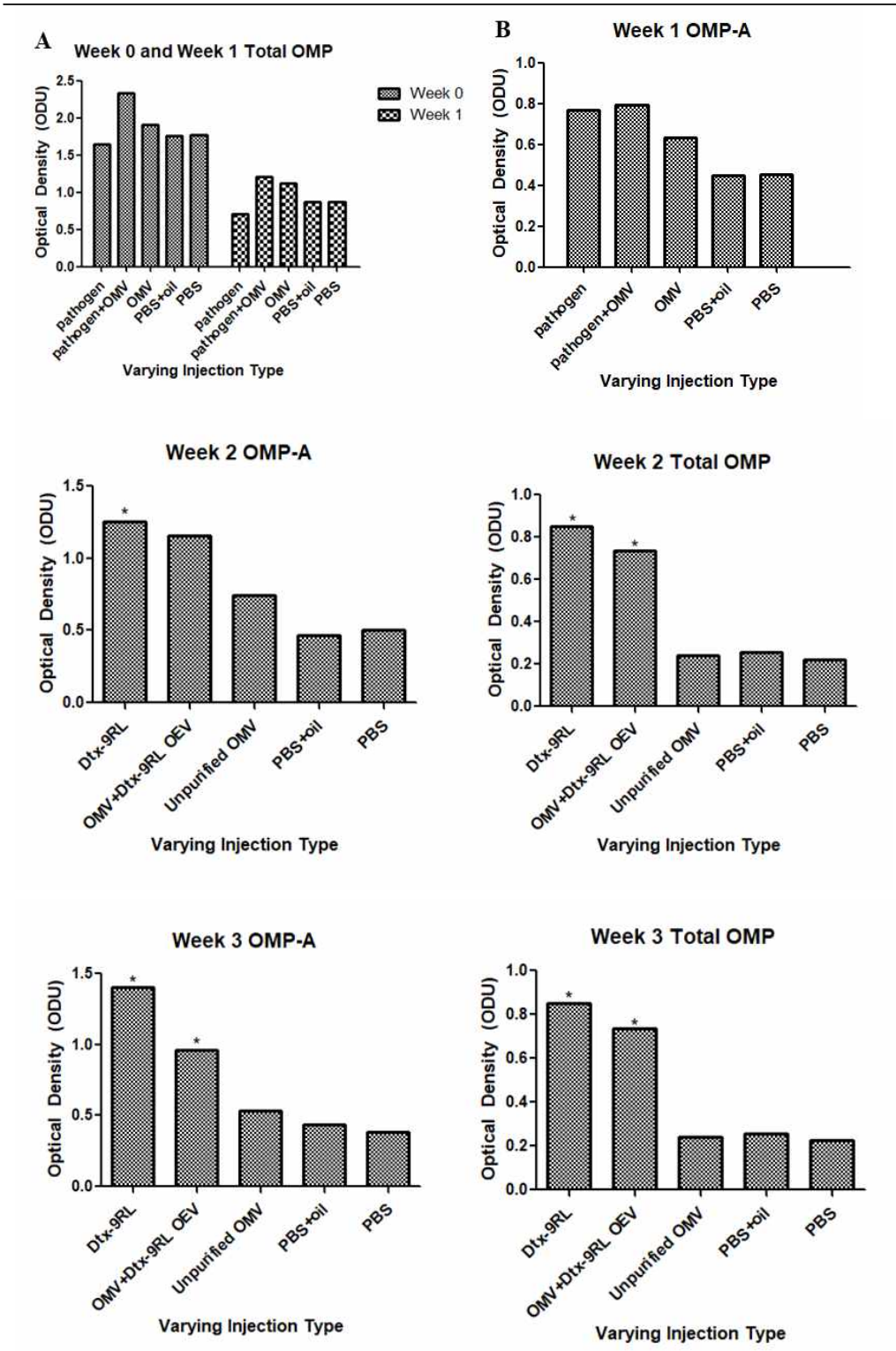
□ 증체율에 대한 영향

- 백신 접종 1주 및 2주후 체중을 측정한 결과 Dtx-9RL, OMV+Dtx-9RL OEV, Unpurified OMV, PBS+oil 접종군은 PBS only 시험군 대비 유의적인 체중의 변화를 보이지 않음 ($P<0.05$)
- Week 0(1일령), Week 1(백신접종 1주후), Week 2(백신접종 2주후)



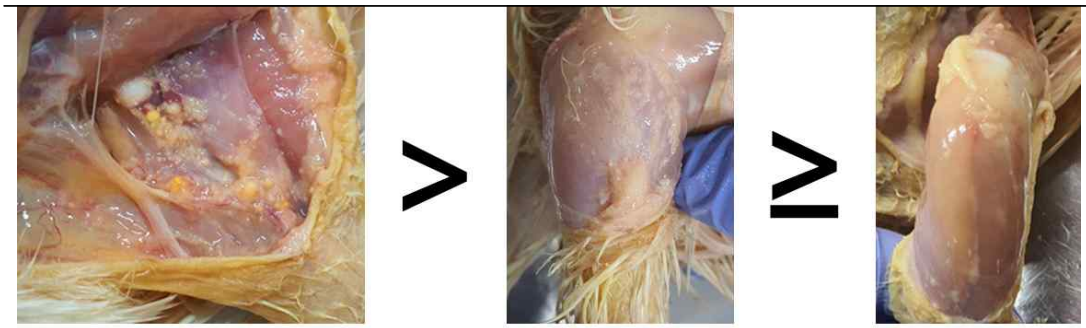
□ 특이적인 혈청 항체 검출(Week 2?/Week 3?)

- Dtx-9RL 백신 접종군은 OMV+Dtx-9RL OEV, Unpurified OMV 대비 백신 접종 2주 및 3주후 OmpA peptide ELISA, OMPs ELISA를 이용한 항체 역가 비교 결과 높은 수준을 보였고, PBS 접종군 대비 유의적으로 높은 항체 역가를 보임($P<0.05$).
- Unpurified OMV의 경우 PBS 접종군 대비 유의적인 항체역가를 보이지 않아 백신 효능이 없었음.



□ 접종반응 비교

- 백신 접종 부위의 염증반응 정도를 비교한 결과 배양액을 그대로 사용한 OMV+Dtx-9RL OEV(아래 그림, 백신+OMV)에서 염증반응이 가장 심했고, 예상 외로 항체역가가 거의 없었던 Unpurified OMV(아래 그림, OMV)가 다음으로 심했고, Dtx-9RL(아래 그림, 백신)의 경우 상대적으로 낮은 염증반응을 보임.



백신+OMV
(균체+균체 키운 LB broth)

OMV
(원심 14000rpm 30분 한 상층액)

백신

□ 결과에 대한 평가

- OMV의 백신 효능에 대한 보고가 많아 백신 제조 공정을 단순화하고, 백신 효능을 높이기 위해 배양액을 그대로 사용하여 사독오일백신을 제작하였고, 기존 백신 제조 공정에서 버려지는 배양액의 OMV을 이용한 백신을 제작하여 기존 세척 균체 이용 백신과 비교한 결과 기존의 세척 균체를 이용한 백신의 접종반응이 가장 낮았고, 면역원성도 가장 높았음.

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명 \ 연도			1단계 (2021~2022)	계	가중치 (%)
전담기관 등록・기탁 지표[1]	학술발표	목표(단계별)	2	2	60
		실적(누적)	2	2	60
연구개발과제 특성 반영 지표[2]	인력양성	목표(단계별)	1	1	10
		실적(누적)	1(셀트리온 취업)	1	10
	정책제안	목표(단계별)	1	1	20
		실적(누적)	0	0	0
	홍보	목표(단계별)	1	1	10
		실적(누적)	0	0	0
계					70

* 1」 전담기관 등록・기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
* 2」 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능[1])		단위	전체 항목에서 차지하는 비중[2] (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치	목표설정 근거
				보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2021~2022)	
1	안전성	증체율	50	없음	없음	없음	대조군 대비 유의적인 차이 없음	어린병아리 적용 시 필수
2	효능	폐사율/세균 재분리율	50	없음	없음	없음	대조군 대비 유의적인 차이 있음	백신 평가의 기본 항목

* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	안선민	2022. 4. 28	H호텔세종시티	대한민국
2	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	안선민	2022. 4. 28	H호텔세종시티	대한민국

□ 기술 요약 정보

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

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Dtx-9RM-dK(Dtx-9RM-delNeo)	KCTC14577BP	KCTC	2021.5
2	Dtx-9RM-dK(Dtx-9RM-delNeo) 유전자 서열(SNPs)	-	-	2021.5

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

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

o 지식재산권 활용 유형

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

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

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

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

□ 표준화

ㅇ 국내표준

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

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

ㅇ 국제표준

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

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

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

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

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1]	사업화 형태[2]	지역[3]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

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

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과			어린 병아리용 가금티푸스 생독백신(Dtx-9RM-dK)		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(천원)		-		
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
			-	500백만원	4,500백만원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0%	10%	50%
		국외	0%	0%	5%
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 가금티푸스 생균+사균 혼합백신 - 가금티푸스 생균+대장균증 사균 혼합백신		
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
			-	500백만원	4,500백만원
	수출		-	-	1,000백만원

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

□ 법령 반영

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

□ 정책활용 내용

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

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

□ 전문 연구 인력 양성

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

□ 산업 기술 인력 양성

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

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ **홍보 실적**

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ **포상 및 수상 실적**

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ **연구시설·장비**

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

- 대한수의학회 2022. 4. 28. 우수포스터상 수상

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

- OMV 활용성 평가 실험: 생독백신주 생산공정에서 OMV 유무에 의한 백신 효능에 대한 영향 평가 수행하여 백신 공정 최적화

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설 ·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
닭 품종에 따른 가금티푸스 감수성 비교평가	- 국내 우점 산란계인 HyLine brown에 대한 야외주 감수성 검사 완료 - 육계 병아리에 대한 실험은 제품 허가서류 제출 후 진행	50
Dtx-9RM-dK 생균백신의 안전성 확인	- 어린 병아리 증체 모델을 통해 안전성 확인 완료함. - 산란율 모델을 통해 시험군간 유의적인 차이 확인 안 됨.	100
Dtx-9RM-dK 생균백신의 방어효능 평가	- 병원성 변이주에 대한 방어효능 평가 완료함.	66.7
생균/사균 혼합 백신 조성 최적화	- Dtx-9RM-dK 생균과 Dtx-9RL 사균 혼합백신의 방어효능을 확인함.	100
분무백신 효능 평가	- SG9R 기관 접종을 통해 특이적인 OMPs 항체 형성을 확인하여 어린 병아리에 Dtx-9RM-dK 접종 후 저항성을 확보한 중추 이상 닭에 대해 분무백신 효능 평가를 위한 임상시험 필요함.	100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 육계에 대한 실험은 어린병아리용 가금티푸스 생독백신 야외임상시험 허가 신청 후 허가를 받으면 임상실험 과정에서 보완할 수 있으며 중요 목표는 모두 달성하여 제품화를 위한 절차를 진행함.
- 정량성과 미달 항목인 인력 양성의 경우 박사 1명 목표 달성 시점을 2023년 2월 또는 2023년 8월에 완료할 수 있을 것으로 판단되며 홍보의 경우 국내외 동물백신 회사와의 기술이전 협상을 진행하여 계약을 체결하는 시점(2022년 12월)에 언론매체에 기사화할 계획임.

2) 자체 보완활동

- 수행하지 못한 실험들 중 제품 허가 관련 중요한 실험에 대해서는 이미 중요 데이터를 확보하였으므로 제품 임상시험 허가를 받으면 수행하여 보완 할 계획임.

3) 연구개발 과정의 성실성

- Dtx-9RM-dK 작출 후 기본 특성 확인 실험을 진행하였고 본격적인 동물실험을 수행하는 과정에서 9차 HPAI 발생으로 동물실험 진행에 어려움이 있었으나 최선을 다해 수행하여 제품화를 위해 필요한 모든 데이터를 확보함.
- 제품화를 위해 기술이전 과정을 성실히 진행해왔는데 Dtx-9RM-dK 특허기술을 ㈜지나이너에 양도하기 위한 대략의 기술가치 평가를 외부기관에 의뢰하여 수행하였음. 또한, 통상실시권을 국내 동물약품회사 2개사와 협의함.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 어린 병아리에서 부작용이 전혀 없어 증체율에 영향을 주지 않으면서 *Salmonella* Gallinarum과 *Salmonella* Enteritidisd (SE) 예방 효과가 있는 백신주를 최초로 개발함.
- Rough strain이기 때문에 SE 야외 감염 시 나타나는 D-group O-항원에 대한 항체를 형성하지 않아 감별이 가능하다는 장점과 함께 혈청형이 다른 *Salmonella* Typhimurium 예방 효능에 대한 가능성을 확인하여 추가적인 실험을 통해 개발한 백신의 범용성을 증명할 계획임.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 기존 산란계 백신의 경우 기존 SG9R 백신주의 잠재적인 병원성으로 어린 병아리 백신 접종이 불가능하였으나 이젠 산란계/육계 어린 병아리에서 백신 접종이 가능하므로 기존에 없던 백신 시장 형성 예상되며 가장 감수성이 높은 어린 병아리를 가금티푸스/SE로부터 방어할 수 있으므로 보다 완성도 높은 백신 프로그램의 현장 적용 가능하여 가금 생산성 향상과 식품안전성 향상 기대되므로 활용 가능성 높음.
- 연구성과 활용(산업화)을 위해 국내외 동물백신 회사에 기술 설명회(현재 진행중)를 완료하고, 통상실시권 계약을 체결한 후 농림축산검역본부에 임상시험계획서를 제출할 계획이며 농장임상시험계획서에는 대규모 농장시험(임상시험)이 포함되어 있음.
- EU 등 선진국에서 SE 예방을 위해 사용되었던 효과적인 SG9R 백신의 병원성 회복 문제로 시장에서 퇴출되었던 상황에서 비교적 효과가 낮은 SE 생백신을 사용하고 있어 수출용 백신으로서 국가 산업 발전 및 위상 제고 기대됨.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		종료 1년(2편)
	비SCIE		
	계		2
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		종료 3년(1건)
	국외		
	계		1
인력양성	학사		
	석사		
	박사		종료1년(1명 이상)
	계		1
사업화	상품출시		
	기술이전		종료 1년[1건(기술료 500백만원)]
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			어린병아리용 가금티푸스 생독백신/닭 가금티푸스 백신 프로그램/가금티푸스 생균/사균 혼합백신

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

참고문헌

Basnet H, Kwon HJ, Cho SH, Kim SJ, Yoo HS, Park YH, Yoon SI, Shin NS, Youn HJ. (2008) Reproduction of Fowl Typhoid by Respiratory Challenge with *Salmonella* Gallinarum. Avian Diseases, 52:156-159.

Chu Y, Gao S, Wang T, Yan J, Xu G, Li Y, Niu H, Huang R, Wu S. (2016) A novel contribution of *spvB* to pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium by inhibiting autophagy in host cells. Oncotarget, 7:8295-8309.

Cocciolo G, Circella E, Pugliese N, Lupini C, Mescolini G, Catelli E, Borchert-Stuhlträger M, Zoller H, Thomas E, Camarda Giulio AC. (2020) Evidence of vector borne transmission of Salmonella enterica enterica serovar Gallinarum and fowl typhoid disease mediated by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). Parasit Vectors. 13:513.

Huberman YD., Velilla AV. Terzolo HR. (2019) Evaluation of different live Salmonella enteritidis vaccine schedules administered during layer hen rearing to reduce excretion, organ colonization, and egg contamination. Poultry Science 98:2422-2431.

Jo EK, Yuk JM, Shin DM, Sasakawa C. (2013) Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. Froniters in Immunology 4: 97.

Kim NH, Ha EJ, Ko DS, Chung-Young ee CY, Kim JH, Kwon HJ (2019) Molecular evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum in the field. Veterinay Microbiology. 235: 63-70.

Kim NH, Ha EJ, Ko DS, Choi KS, Kwon HJ. (2020) Comparison of Humoral Immune Responses to Different Forms of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovar Gallinarum. Frontiers in Veterinary Science 7, 598610.

Kim NH, Ko DS, Ha EJ, Ahn S, Choi KS, Kwon HJ. Optimized Detoxification of a Live Attenuated Vaccine Strain (SG9R) to Improve Vaccine Strategy against Fowl Typhoid. Vaccines 2021, 9, 122.

김애란, 김재홍, 이영주, 조영미, 권준헌, 권용국, 이윤정, 최준구, 조성준, 김민철, 이은경, 김창섭, 양흥구, 곽상익, 성환우, 모인필. (2006) 2003년 국내 원종계 및 종계의 추백리-가금티푸스 감염실태. Korean Journal of Veterinary Research 46: 347-353.

Kwon HJ, Cho SH. (2011) Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. Vaccine, 29:1311-1318.

Langridge GC, Fookes M, Connor TR, Feltwell T, Feasey N, Parsons BN, Seth-Smith HMB, Barquist L, Stedman A, Humphrey T, Wigley P, Peters SE, Maskell DJ, Corander J, Chabalgoity JA, Barrow P, Parkhill J, Dougan G, Thomson NR. (2015) Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in Salmonella. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112:863-868.

Lee YJ, Kim KS, Kwon YK, Kang MS, Mo IP, Kim JH, Tak RB. Prevalent characteristics of fowl typhoid in Korea. Journal of Veterinary Clinics, 2003, 20:159-165.

Lee YJ. Kang MS. (2005) Safety and efficacy of *Salmonella* Gallinarum 9R vaccine in young laying chickens. Avian Pathology, 34, 362-366.

Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. (2001) Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to Salmonella enterica serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. Journal of Bacteriology. 183:4652-8.

Pust S, Hochmann H, Kaiser E, von Figura G, Heine K, Aktories K, Barth H. A cell-permeable fusion toxin as a tool to study the consequences of actin-ADP-ribosylation caused by the salmonella enterica virulence factor SpvB in intact cells. Journal of Biological Chemistry, 2007. 282:10272-82.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.