한국가금학회지 제 37권 제 3호, 283~287 (2010)
Korean J. Poult. Sci. Vol. 37, No.3, 283~287 (2010)

박테리오파아지 CJø07의 *Salmonella enteritidis* 감염에 대한 SPF 병아리에서의 효능 평가

임태현[1] · 이현정[1] · 김명섭[1] · 김병윤[1] · 양시용[2] · 송창선[1,†]
[1]건국대학교 수의과대학, [2]CJ제일제당 바이오기술연구원

Evaluation of Efficacy of Bacteriophage CJø07 against *Salmonella enteritidis* Infection in the SPF Chicks

Tae-Hyun Lim[1], Hyun-Jeong Lee[1], Myeong-Seob Kim[1], Byoung-Yoon Kim[1], Si-Yong Yang[2] and Chang-Seon Song[1,†]
[1]*College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea*
[2]*BIO-Research Institute, CJ Cheiljedang Co.*

ABSTRACT In the present study we report *in vivo* inhibitory potential of single strain of bacteriophage (CJø07) in day-old SPF chicks experimentally infected with *Salmonella enteritidis* (SE). The bacteriophages prepared by feed additives and drinking water were given to chicks for 20 days starting prior 10 days before challenge with SE. Chicks were euthanized at 10 days after challenge for quantitative salmonella isolation from intestine and determination of environmental contamination level of salmonella. Bacteriophage therapy as additives in feed and drinking water resulted in significant inhibition of the SE replication in intestines of SPF chickens ($P<0.05$). In addition, environmental contamination by SE fecal shedding was decreased in bacteriophage-treated birds. Therefore, bacteriophage CJø07 examined in this study may be a plausible alternative to antibiotics for the reduction of salmonella infection both in poultry.

(Key words : bacteriophage, *Salmonella enteritidis*, chicken, feed additives, water additives)

서 론

식품의 유해 미생물에 의해 야기되는 식중독은 발생이 증가하고 그 양상이 다양화되어 인류의 건강을 위협하고 있다. 통계에 따르면, 2009년 미국에서 17,468건의 식중독이 발생하였으며, 원인별 발생 건수 및 10만명 당 발생 건수로 볼 때 살모넬라 식중독은 전체 식중독 발생 건수 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다(CDC, 2009). 특히, *Salmonella enteritidis*(SE)는 다양한 살모넬라 혈청형 중 식중독 유발 비율이 가장 높고, 다른 식중독 유발 세균에 비해 치사율이 높은 원인균으로 파악되고 있으며(Olsen et al., 2000), 노약자, 환자 그리고 어린이에서 치명적인 질병을 일으킬 수도 있다(Angulo et al., 1998). 따라서 대부분의 국가에서 SE 감염증에 대한 예방 및 근절을 위한 다양한 노력을 시도하고 있으나 많은 어려움을 겪고 있는 것이 현실이다.

계란 및 계육을 포함하는 가금 생산물은 대표적인 살모넬라 식중독의 원인 식품으로 알려져 있다(St Louis et al., 1988). 특히, SE에 감염된 닭의 장에서 증식한 세균은 분변을 통해 다량 배출되어 주변 환경을 오염시켜 가금에 재감염됨으로써 식중독을 일으킬 뿐만 아니라, 종계에 감염 시 난포나 수란관에 침입, 증식함으로써 오염된 난황을 통하여 후대 병아리로 감염이 전달된다. 이 경우, 감염된 병아리로부터 부화기 내 혹은 계군 내 다른 병아리에 수평 감염되어 폐사를 일으키므로 공중보건학적 손실 외에도 직접적인 농가의 손실로 이어지게 된다(Oosterom, 1991). 그러나, 축산물의 항생제 잔류 및 전이(Mee, 1984)와 항생제 내성균 출현(Yang et al., 2002), 무항생제 계육에 대한 소비자 요구 증가 등의 이유로 항생제 사용에 대한 규제가 증가하고 있어, 농가의 세균성 질병의 통제가 어려워지고 있다. 특히, 국내의 경우 2012년부터 정책적으로 사료 첨가용 항생제 사용이 전면 금지되고, 살모넬라 백신, 경쟁적 배제제(competitive exclusion) 및 항균물질(antimicrobials) 등의 방어 효능이 불완전함에 따라 새로

† To whom correspondence should be addressed : songcs@konkuk.ac.kr

운 항생제 대체 물질에 대한 관심과 연구가 증가하고 있다.

박테리오파아지는 숙주세포인 세균에 감염되어 숙주세포의 생체 기능을 이용하여 증식하는 바이러스로서 자연계에 널리 분포하고 있다(Carlton, 1999). 박테리오파아지는 특정 병원성 세균에 선택적으로 작용하기 때문에 다른 정상 세균총에 영향을 미치지 않고, 항생제와 같이 내성균의 출현이 발생하지 않기 때문에 항생제 대체 물질로서 각광을 받고 있다(Oliveira et al., 2009). 최근 축산식품에 대한 안전성이 주요 사회적 현안 문제로 대두되면서 캠필로박터(Goode et al., 2003), 클로스트리디움(Miller et al., 2010), 살모넬라(Borie et al., 2008) 등의 식중독균에 대한 박테리오파아지의 억제 효능에 대한 연구가 증가하고 있다. 본 연구는 SE에 특이적인 박테리오파아지 CJø07의 사료 및 음수 투여가 어린 병아리의 SE 야외 감염에 따른 장내 균 증식과 체외 균 배출에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 시료

본 실험에는 CJ제일제당 BIO기술연구원(서울 강서구)에서 경기도 인근 하천수로부터 분리한 SE에 사멸 효과가 있는 CJø07 박테리오파아지를 이용하였다.

2. 공시 균주

본 실험에는 캐나다의 Salmonella Genetic Stock Center (SGSC)로부터 분양 받은 SE 균주 중 chloramphenicol 저항성을 가진 균주를 사용하였다.

3. 실험 설계

66마리의 1일령 특정 병원체 부재(SPF) 병아리를 무작위로 각 22마리씩 3그룹(그룹 1: 박테리오파아지 투여 및 SE 공격 접종, 그룹 2: 박테리오파아지 무투여 및 공격 접종, 그룹 3: 대조군)으로 구분하여 닭 무균 사육 시설인 HBC2(쓰리샤인, 대전)에서 총 20일간 사육 및 관찰하였다. 박테리오파아지 투여군의 경우 제조 회사의 기준에 의하여 $10^{8.0}$(PFU/kg, PFU/mL) 농도의 박테리오파아지를 사료 및 음수에 각각 첨가하여 투여하였으며, 나머지 그룹의 병아리는 박테리오파아지가 첨가되지 않은 일반 사료 및 음수를 공급하였다. 2개 실험군은 10일령 때 수당 $1.9\times10^{6.0}$ colony forming unit(CFU)의 SE균을 100 μL 피펫(Nichiryo, Japan)을 이용하여 경구로 공격 접종하였으며, 대조군은 인산 완충 식염수(PBS)를 경구로 투여하였다. 공격 접종 10일 후 모든 병아리를 안락사시킨 뒤, 무균적으로 맹장 분변을 채취하였다. 또한 공격 접종 10일 후 멸균 거즈를 이용하여 사육시설의 출입문, 바닥 그리고 배기 필터를 2회 반복하여 swab함으로써 환경 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 SE균을 증균하여 검출 및 정량 분석에 사용하였다.

4. 맹장 분변 내 SE균 정량 분석

감염 병아리 맹장 분변 내 SE균의 증균 및 정량 분석은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 먼저 채취한 맹장 분변 1 g을 10 mL Rapapport-Vassiliadis(RV) broth(Difco, Franklin Lakes, USA)에 첨가한 후 3분 동안 균질화시켰다. 균질화된 시료 1 mL를 RV broth에서 10진 희석한 다음 희석 배수별 100 μL씩 chloramphenicol(20 mg/L)이 첨가된 XLD agar(Difco, Franklin Lakes, USA)에 도말한 뒤 37℃에서 24시간 배양하였다. 검정색 집락만을 측정하였으며, 희석 배수별 균수가 30개에서 300개의 집락이 확인된 희석 배수를 유의성 있는 농도로 판단하고 집락수를 측정하였다.

5. 환경시료 내 SE균 검출

환경시료는 100 mL Buffered pepton water(BPW)(Difco, Franklin Lakes, USA)에 첨가 후 37℃에서 24시간 배양한 뒤 100 μL를 채취하여 10mL RV broth 에 첨가하여 42℃에서 배양하였다. 48시간 후, 배양된 균액을 chloramphenicol이 첨가된 XLD agar에 도말 배양하여 최종적으로 검정색 집락을 통해 SE균의 유무를 판단하였다.

6. 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과에 대한 통계 분석은 SAS(2000)의 fisher's exact test와 paired *t*-test를 이용하여 분산 분석을 실시하였다.

결 과

1. 박테리오파아지 섭취에 따른 장내 SE균 증식 억제 효능 평가

10일령 SPF 병아리에 SE균을 공격 접종한 뒤, 모든 그룹에서 실험 기간 내 임상 증상 및 폐사가 발생하지 않았으며, 부검 소견에서도 특이적인 병변이 관찰되지 않았다. 공격 접종 10일 후 채취한 맹장 분변에 존재하는 SE균 수를 측정한 결과, 박테리오파아지를 투여한 병아리의 맹장 분변 내 SE

균 수(8.08±1.38×10^5 CFU/mL/g)는 박테리오파아지를 투여하지 않은 병아리의 맹장 분변 내 SE균 수(5.02±1.89×10^6 CFU/mL/g)에 비하여 유의성 있게 감소하였다(P<0.05). 음성 대조군 병아리의 맹장 분변에서는 SE균이 검출되지 않았다.

2. 박테리오파아지 섭취에 따른 환경 내 SE균 배출 억제 효능 평가

공격 접종 10일 후 사육 시설 표면의 SE균 오염도를 측정한 결과를 Table 1에 제시하였다. 사육 시설의 출입문, 바닥 그리고 배기 필터 표면을 swab한 멸균 거즈로부터 SE균을 검출한 결과, 비록 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 박테리오파아지를 투여한 그룹의 사육 시설에서 채취한 환경 시료의 SE균 오염율(50%)이 박테리오파아지를 투여하지 않은 그룹의 높은 SE균 환경 오염율(100%)에 비해 감소되는 것을 확인하였다.

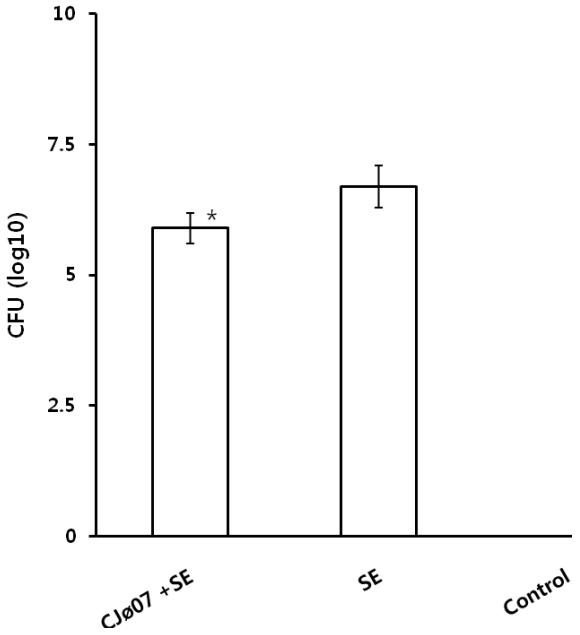

Fig. 1. *Salmonella enteritidis* counts (CFU log_{10}) detected in chicks treated with bacteriophage CJø07 at 10 days post challenge with SE. Quantitative bacteriology was performed from intestines of chicks. Asterisk (*) indicates significant difference (P<0.05) between bacteriophatges CJø07 treated and positive control (SE alone).

고 찰

전 세계적으로 살모넬라 근절을 위한 방안으로 유기산, 경쟁적 배제제, 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 등과 같은 다양한 연구들이 수행되어 왔으나(Dunkley et al., 2009), 최근에는 병원성균에 특이적으로 작용하여 사멸시키는 박테리오파아지의 특성을 이용한 연구들이 진행되고 있다(Huff et al., 2006). 또한, 박테리오파아지의 경우, 항생제 내성균에 대해서도 효과적으로 적용된다고 알려져 있으며, 이미 여러 연구자에 의해 항생제 대체제로서의 박테리오파아지의 효능은 검증된 바 있다(Andreatti Filho et al., 2007).

Borie et al.(2008)은 SE에 특이적으로 반응하는 3종류의 박테리오파아지를 혼합하여 음수 또는 분무 방법으로 투여한 결과 장기 내 SE균 증식을 10배 이상 감소시킴을 확인하였다. 이는 본 연구에서 사용된 박테리오파아지가 닭 장기 내 SE균 증식을 유의성 있게 억제한다는 것과 일치하는 결과이나 본 연구는 단일 종류의 박테리오파아지를 실용적인 방법으로 투여하였다는 점에 차이가 있다. 최근 연구에 의하면 여러 종류의 박테리오파아지를 혼합하여 사용하는 방법이 병원성 세균을 억제하는데 매우 효과적이나(Fiorentin et al., 2005) 단일 박테리오파아지에 비해 높은 생산비용을 필요로 하므로 본 연구에서 효능이 확인된 단일 박테리아파아지 CJø07의 사용은 경제적 이득을 가져올 수 있는 매우 의미있는 결과로 판단된다(Huff et al., 2006). 또한, 박테리오파아지는 음

Table 1. Effect of bacteriophage CJø07 on SE fecal shedding of chicks challenged with SE

Treatment	Challenge[B]	Re-isolation of SE (Number of positive/Number of tested samples)			
		Entrance door	Floor	Ventilation filter	Total (%)
Bacteriophage[A]	SE	0/2	2/2	1/2	3/6 (50)
None	SE	2/2	2/2	2/2	6/6 (100)
None	None	0/0	0/0	0/0	0/0 (0)

[A]Birds were treated with bacteriophage CJø07 as feed additives ($10^{8.0}$ PFU/kg) and water additives ($10^{8.0}$ PFU/mL) for 20 days.
[B]10 days-old chicks were orally challenged with SE (1.9×$10^{6.0}$ CFU/bird).

수, 분무 그리고 근육 등 다양한 방법을 통하여 투여될 수 있지만 투여 방법에 따라 박테리오파아지 효능에 차이가 나타난다고 알려져 있다(Huff et al., 2003; Toro et al., 2005). 따라서 효과적인 야외 적용을 위하여 향후 다양한 접종 경로별 박테리오파아지 CJø07의 효능에 대한 추가 비교 실험이 필요하다고 판단된다.

기존 연구에 의하면 박테리오파아지의 높은 항균 효과에도 불구하고, 경구 투여 시 강한 위산을 통과하여 장에 도달하는 비율이 낮기 때문에 그 실효성에 한계가 있다고 알려져 있다(Chibani-Chennoufi et al., 2004). 그러나 본 실험에 사용된 박테리오파아지 CJø07의 경우 사료에 첨가하여 투여 시 높은 농도로 분변으로 지속 배출되는 것이 확인되어(data not shown) 섭취 후 바로 대사되는 약물과 달리 사료 첨가제로 투여할 경우, 장내 병원성 세균의 증식의 억제가 가능할 것으로 추정된다(Yongsheng et al., 2008). 본 실험에서 확인된 박테리오파아지 CJø07의 유의적인 장내 SE균 감소 효과는 박테리오파아지가 장내에 높은 농도로 존재하기 때문인 것으로 판단되며, 장내 SE균 감소 효과는 환경으로 배출되는 SE균의 농도 감소로 이어져 환경 내 SE균 오염율을 50% 감소시키는 효과를 나타내었다. SE 감염은 주로 SE 감염계의 분변을 통해 배출된 균을 직접 접촉함으로써 계군 내 다른 병아리로의 수평 전파가 이루어지며, SE균에 오염된 환경에서 생산된 계란과 계육의 섭취는 사람에서 식중독으로 이어지게 된다. Goode et al.(2003)는 SE 및 캠필로박터에 오염된 계육에 박테리오파아지를 도포하여 효과적으로 병원성 세균 농도가 감소되었다는 연구 내용을 보고하였다. 또한, 시험 박테리오파아지 CJø07의 높은 체외 배출은 SE균의 환경 오염 억제에 장점으로 작용할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 시험 박테리오파아지 CJø07의 섭취로 인한 환경 내 SE균 오염율 감소효과와 더불어 직접적인 환경 내 살포를 병행할 경우, 가금 생산물의 오염율을 효과적으로 억제할 수 있으며, 추후 소독제 및 육가공품에 적용 시 효과적인 살모넬라 통제가 가능할 것으로 판단된다.

살모넬라는 주변 환경 모든 곳에 존재하고 다양한 경로를 통해 감염될 수 있으며, 수평전파 외에도 난계대 전파가 가능하다. 또한 닭에 감염 시 불규칙하고 지속적인 체외 배출을 일으켜 환경 내 잔류가 가능하며, 종계장 유래의 살모넬라가 부화장, 사육 농장을 거쳐 도축장까지 전달되는 것으로 나타났다(Kim et al., 2007). 이러한 점을 고려할 때, 최초 단계의 농장 내 SE 오염율을 낮추는 것과 사육부터 가공장에 이르기까지 전 단계의 체계적인 SE 오염 감소 노력이 필요하다. 본 연구에 사용한 박테리오파아지 CJø07은 감염된 닭에서의 SE균 증식 감소 효과 외에 환경 내 SE균 오염 저하 효과를 나타냄을 확인하였다. 따라서 추가적인 시험을 통해 박테리오파아지 CJø07을 이용한 장기간 SE균 배출 억제 효능을 확인한다면, 농가에서의 기존 SE 사독 백신의 불완전한 효능을 보완함과 동시에, 환경 및 육가공품 소독제로의 활용을 통한 효과적인 살모넬라 통제 방법으로 유용할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서는 SE에 특이적인 박테리오파아지(CJø07)의 사료 및 음수 투여가 어린 병아리의 SE 감염에 따른 장내 균 증식과 체외 균배출에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다. 박테리오파아지를 투여한 SPF 병아리에 SE균을 공격 접종 한 뒤, 공격 접종 10일 후 채취한 맹장 분변에 존재하는 SE균 수를 측정한 결과, 박테리오파아지를 투여한 병아리의 맹장 분변 내 SE균 수는 양성 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(P<0.05). 또한, 공격 접종 10일 후 사육 시설 표면의 SE균 오염도를 측정한 결과, 박테리오파아지를 투여한 그룹의 사육 시설에서 채취한 환경 시료의 SE균 오염율(50%)이 박테리오파아지를 투여하지 않은 그룹의 SE균 환경 오염율(100%)에 비하여 감소되는 것을 통해 박테리오파아지 CJø07에 의한 장내 균 증식과 체외 균 배출 억제 효능이 확인되었다. 따라서 박테리오파아지 CJø07는 항생제 대체 물질로서 가금에서의 SE 감염을 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 판단된다.

(색인어 : 박테리오파아지, *Salmonella enteritidis*, 사료 첨가제, 음수 첨가제)

인용문헌

Andreatti-Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM 2007 Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella* enterica serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. Poultry Sci 86:1904-1909.

Angulo FJ, Swerdlow DL 1998 Salmonella Enteritidis infections in the United States. J Am Vet Med Assoc 213:1729-1731.

Borie C, Albala I, Sanchez P, Sanchez ML, Ramırez S, Navarro C, Morales MA, Retamales J, Robeson J 2008 Bacteriophage

treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. Avian Dis 52:64-67.

Carlton, RM. 1999 Phage therapy: past history and future prospects. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 47:267-274.

CDC. 2009 Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food --- 10 states, 2009. MMWR 59:418-422.

Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H 2004 *In vitro* and *in vivo* bacteriolsytic activities of *Escherichia coli* phages: Implications for phage therapy. Antimicrob Agents Chemother 48:2558-2569.

Dunkley KD, Callaway TR, Chalova VI, McReynolds JL, Hume ME, Dunkley CS, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC 2009 Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. Anaerobe 15:26-35.

Fiorentin L, Nilson D, Barioni W 2005 Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. Avian Pathol 34: 258-263.

Foulaki K, Gruber W, Schlecht S 1989 Isolation and immunological characterization of a 55-kilodalton surface protein from *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 57:1399-1404.

Goode DV, Allen M, Barrow PA 2003 Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophage. Appl Environ Microbiol 69:5032-5036.

Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM 2006 Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. Poultry Sci 85: 1373-1377.

Kim AR, Lee YJ, Kang MS, Kwag SI, Cho JK 2007 Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. J Vet Sci 8:155-161.

Mee BJ 1984 The selective capacity of pig feed additives and growth promotants for coilform resistance in antimicrobials in agriculture. Woodbine M Ed. Butter Worths, London 349-358.

Oliveira A, Sillankorva S, Quinta R, Henriques A, Sereno R, Azeredo J 2009 Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. J Appl Microbiol 106:1919-1927.

Olsen SJ, MacKinon LC, Goulding JS, Bean NH, Slutsker L 2000 Surveillance for foodborne disease outbreaks -United States, 1993-1997. MMWR Surveill Summ 49:1-51.

Oosterom J 1991 Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. Int J Food Microbiol 12:41-52.

SAS 1996 SAS User Guide. Release 6.12 edition. SAS Inst Inc Cary NC. USA.

Sklar IB, Joerger RD 2001 Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* infection in chickens. J Food Saf 21:15-29.

St Louis ME, Morse DL, Potter ME, DeMelfi TM, Guzewich JJ, Tauxe RV, Blake PA 1988. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of salmonellosis. JAMA 259: 2103-2107.

Toro H, Price SB, McKee S, Hoerr FJ, Khreling J, Perdue M, Bauersmeister L 2005 Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. Avian Dis 49:118-124.

Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, Kim SH, Lee BK, Park YH 2002 Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars *enteritidis* and *typhimurium* isolated from animals in Korea: Comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Vet Microbial 86: 295-301.

Yongsheng M, Pacan JC, Wang Q, Xu Y, Huang X, Korenevsky A, Sabour P 2008 Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan alginate microspheres for oral delivery. Appl Environ Microbiol 74:4799-4805.

(접수: 2010. 9. 7, 수정: 2010. 9. 19, 채택: 2010. 9. 20)