

# 關節炎과 發育不全症을 보이는 닭으로부터 Avian Reovirus의 分離와 性狀調查

金 善 中 · 徐 鈺 洙  
서울大學校 獸醫科大學  
(1985. 11. 4. 接受)

## Isolation and Characterization of Avian Reoviruses from Chickens with Arthritis or Stunted Growth

Sun Joong Kim and Ik Soo Seo

College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Received November 4, 1985)

### SUMMARY

A total of eight strains of avian reoviruses were isolated from chickens with arthritis or stunted growth. The isolations were made from broilers or broiler breeders under 12 weeks of age.

The viruses had a typical morphology of reoviruses with double capsid layers and 81nm of diameter. In agar gel precipitation tests, the isolates reacted with antisera prepared against S-1133 or R-1 strains of avian reoviruses and cross reacted with S-1133 antigen. They did not agglutinated RBC's from day-old chicks, adult chickens, guinea pigs, and horses. The isolates showed strong resistance against the treatments of chloroform, IUdR, and heat.

When infectivities of the viruses were titrated in cell cultures of chicken embryo fibroblast, chicken embryo liver, and Vero cells, similar end points reached four to five days after inoculation, regardless of cell types and virus inoculation time, either inoculated simultaneously at the time of cell seeding or on confluency. Mean times of mortality of chicken embryos inoculated with the isolates via the chorio-allantoic membrane ranged from 54 to 59 hours and that of S-1133 strain was 73 hours.

### I. 緒 論

Avian reovirus는 닭에서 주로 바이러스성관절염 (viral arthritis) 또는 腱鞘炎 (tenosynovitis) 을 일으키는 것으로 알려져 왔다 (Jones 등, 1981; van der Heide, 1977; van der Heide 등, 1974; Vertommen 등, 1980). 근년에 avian reovir-

us는 이 밖에도 大腿骨頭炎(femoral head necrosis 또는 brittle bone disease)(van der Heide 등, 1981), 창백증(pale bird syndrome)(Odor 등, 1981; Page 등, 1982), 깃털발육불량증(Hieronimus 등, 1983a; van der Heide 등, 1981), 항문막힘증(Deshmukh와 Pomeroy, 1969), 吸收不良症(malabsorption syndrome)(Hieronimus 등, 1983a; Kouwenhoven 등, Page 등, 1982), 發育不全症 (Page 등, 1982; Vertommen 등, 1980), 腺胃

本論文은 1984年度 文敎部 學術研究造成費에 依하여 研究되었음.

炎 (Kouwenhoven등, 1978; Page등, 1982), 肝炎 (Mandelli등, 1976; van der Heide등, 1980), 心囊炎 (Jones, 1976; Mustaffa-Bafjee등, 1973; Spradbrow와 Bains, 1974), 腸炎 (Kouwenhoven등, 1978) 등을 일으키는 것으로 보고되고 있다. Avian reovirus 감염증은 卵繼代傳染이 되면서 (Menendez등, 1975; van der Heide와 Kalbac, 1975) 주로 브로일러와 브로일러種鷄에서 전술한 여러가지 病症을 일으키나 (Ide와 Dewitt, 1979; Itakura등, 1977; Jones등, 1975; MacKenzie와 Bains, 1976; Olson과 Kerr, 1966) 간혹 산란계에서도 산란피로증과 유사한 증상을 보이면서 산란율의 감소를 가져온다 (Schwartz등, 1976).

Avian reovirus는 1954년 Fahey와 Crawley가 호흡기증상을 나타내는 닭에서 여과성인 병원체를 분리하고 1967년 Petek등이 이 병원체를 reovirus로 同定한 이래 여러나라에서 분리 보고된바 있다 (Carboni등, 1975; Jones등 1975; Kawamura등, 1965; Mustaffa-Babjee등, 1973; Olson등, 1966). 그러나 아직까지 국내에서는 avian reovirus의 분리보고가 없다. 저자들은 가끔질병 진단과정중 사살한 avian reovirus 감염증과 유사한 병증을 나타내는 닭으로부터 수주의 reovirus가 분리되었기에 그 성상을 파악하여 보고한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 發育鷄卵, 바이러스 및 抗血清

바이러스 분리 및 細胞培養에 사용한 發育鷄卵은 일반 부화장에서 공급받은 백색산란계 중란을 실험실에서 부화하면서 사용하였으며 avian reovirus 표준주로 S-1133株 (van der Heide와 Kalbac, 1975) (SPAFAS Inc.)를, avian reovirus 면역혈청은 토끼에서 만든 抗R-1株 (Jones등, 1975) 및 抗S-1133株 血清을 Dr. R.C. Jones (University of Liverpool)로부터 공여받아 사용하였다.

### 2. 細胞培養

Chicken embryo fibroblast (CEF), chicken embryo liver (CEL) 및 cell line인 Vero cell 배양세포를 사용하였다. CEF 배양은 Kim (1982)의 방법에 따라 배양하였으며 CEL 배양은 14 일령의 鷄胎兒肝組織을 0.25% trypsin으로 37

°C에서 10분간씩 4~5회 반복소화하였다. 소화된 간세포는 4겹의 거즈로 여과하고  $Ca^{++}$ 과  $Mg^{++}$  free인 Dulbecco의 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고 增殖培地에 부유, 1500 rpm으로 10분간 원심분리하고 packed cell volume을 측정하여 증식배지에 1:200으로 희석하여 분注하였다. Vero cell은 antibiotics-trypsin-versene 용액으로 소화하고 세척한후 증식배지 ml 당 세포수가  $5 \times 10^4$  개 되게 희석하여 분注하였다. 세포부유액 분주는 처방병 (8oz)에는 20 ml씩, 시험관 (13×100)에는 0.8 ml씩, flat bottom microtiter tray에는 well當 0.1 ml씩 하였으며 처방병과 시험관은 37°C의 일반배양기에서, microtiter tray는 CO<sub>2</sub>가 5%되게 공급되는 humidified CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Monolayer 형성은 CEF 배양세포는 배양 1일 후에, CEL과 Vero cell배양세포는 배양 2~3일 후에 형성되었다. 처방병과 시험관에 배양한 세포는 monolayer가 형성된후 2~4일 간격으로 維持培地로 교환하였으며 microtiter tray는 배지교환 없이 배양하였다.

증식배지는 modified Eagle's minimum essential medium (Earle's base)에 calf serum이 10%, tryptose phosphate broth가 10%, gentamycin을 100 µg/ml되게 추가하고 7.5% 중조 (NaHCO<sub>3</sub>) 용액으로 pH 7.2되게 조절하였으며 유지배지는 증식배지와 동일하나 calf serum을 2%, pH를 7.4로 조절하여 사용하였다.

### 3. 바이러스 분리방법

바이러스 분리용 조직재료를 ml당 1000 µg의 gentamycin을 함유한 PBS에 약 10%가 되게 유제 한후 1500 rpm으로 10분간 원심분리하여 CEL 배양세포나 9~11령 발육계란 漿尿膜上 (CAM)에 접종하였다. 접종한 세포배양이나 발육계란은 6~7일간 관찰한 후 CPE나 CAM상에 병변이 출현하지 않을때는 3대까지 盲目繼代하였다.

### 4. 電子顯微鏡觀察

전자현미경에 관찰할 바이러스 재료는 처방병에 배양한 CEL 배양세포에 바이러스를 접종하고 37°C에서 3일간 배양한 후 배양액을 채취하여 (20 ml) 3000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 11000×g에서 45분간 원심분리하여 침전물을 0.2

ml의 PBS에 부유시킨후 한방울을 carbon coating된 grid에 적하시키고 건조한후 2% phosphotungstic acid로 1분간 negative staining 하여 走射電子顯微鏡 (Model JEM-100 CXII, Joel)으로 觀察하였다.

### 5. 寒天겔 沈降反應

沈降反應用 항원은 바이러스를 9~11일령 발육 계란의 CAM에 接種하여 3일간 배양한후 CAM을 採取하여 PBS로 씻고 CAM 1個當 1ml의 PBS-chloroform 混合液 (1:1)을 가하여 유제하고 2,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 aqueous phase를 취하여 使用하였다. 沈降反應은 식염농도가 8%인 PBS에 Difco Noble Agar를 1%되게 용해한 겔을 사용하였다. 5ml의 겔을 직경 60mm인 Plastic dish에 넣어 굳히고 well을 만들었다. Well은 中央에 1개, 中央 well 주위에 6개의 well이 동등한 간격이 되도록 배치하였으며 well의 직경은 4.5mm, 中央 well의 중심과 周邊 well의 중심간의 간격은 9mm로 하였다. Well에 항혈청과 항원을 채운후 室溫에서 96시간동안 반응시키면서 觀察하였다.

### 6. 血球凝集反應

電子顯微鏡 檢査材料을 만들때와 같은 方法으로 바이러스를 培養하여 그 培養液을 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 血球凝集反應用 항원으로 使用하였다. Macroplate에서 PBS로 2진 희석한 바이러스材料과 0.5% 血球를 同量으로 混合하고 37℃, 室溫 (18℃) 및 4℃에서 1시간 反應시킨후 血球凝集與否를 判定하였다. 使用한 血球는 1일령 병아리, 성계, 기니피그, 말 血球였다.

### 7. Chloroform에 대한 감수성

Rovozzo와 Burke (1973)의 方法에 依據하여 實施하였다. 바이러스材料를 2등분하여 한쪽은 크로로포름이 10%되게 處理하고 다른 한쪽은 크로로포름 處理를 하지 않은 대조로 使用하였다. 處理한 材料는 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 바이러스 材料로 使用하였다. 크로로포름에 대한 감수성試驗은 既知의 감수성이 있는 바이러스 (Newcastle disease virus, 교정원株)와 抵抗성이 있는 바이러스 (avian adenovirus, 83-5株)를 같은 方法으로 處理하여 대조하였다. 試驗에 使

用한 培養細胞는 microtiter tray에 培養한 CEF 培養細胞였으며 avian adenovirus는 CEL 培養細胞를 使用하였다.

### 8. 5-iodo-2-deoxyuridine (IUdR)에 의한 증식抑制 및 熱에 대한 安定性

IUdR에 의한 增殖抑制試驗과 熱에 대한 安定性試驗은 Rovozzo와 Burke (1973)의 方法에 따랐으며 IUdR濃度는 50 µg/ml로, 熱處理는 56℃에서 30분간 實施하였으며 두試驗 모두 microtiter tray에 培養한 CEF 培養細胞에서 實施하였다.

### 9. 發育鷄卵致死時間

發育鷄卵致死時間 調査에 使用한 바이러스는 CEL 培養細胞에서 5~10대 계대배양한 것으로 10일령의 CAM에  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>의 바이러스를 接種하고 37℃에서 培養하면서 8시간 간격으로 4일간 觀察하면서 致死時間을 調査하였다. 바이러스 株當 30개의 發育鷄卵을 使用하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. Avian reovirus의 分離

1982年 3월부터 1985年 3월까지 8株의 avian reovirus를 分離하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 모든 reovirus는 12주령 이하의 닭에서 分離되었으며 8株중 5株는 關節염을 앓고 있는 브로일러種鷄에서, 나머지 3株는 發育不全症狀을 보이면서 심한 腺胃炎, 腸炎, 心囊炎, 또는 肝의 壞死所見을 보여주는 브로일러에서 分離되었다. 分離株 82~88과 84~63은 韌帶組織뿐만 아니라 발바닥, 肝, 骨髓나 腸에서도 reovirus가 分離되었다. 또한 分離株 84-75는 두마리 可檢例로부터 인대 조직을 별도로 採取하여 바이러스 分離를 시도한바 두예 모두에서 reovirus를 分離할 수 있었다. 本研究에서 비록 分離된 바이러스를 使用하여 병을 재현하는 試驗을 시도하지는 않았으나 외국에서 이미 報告된바 있는 (Jones, 1976; Jones 등, 1981; Kouwenhoven 등, 1978; Mandelli 등, 1976; Mustaffa-Babjee 등, 1973; Page 등, 1982; Spradbrow와 Bains, 1974; van der Heide 등, 1974, 1980; Vertommen 등, 1980) reovirus 감염으로 초래되는 여러 가지 병증을 보여주는 병계에서 分離되었다는 점에

Table 1. History and organs of chickens from which reoviruses were isolated.

Isolate	Type of chicken	Age (wk)	Clinical conditions	Isolation system and passage level <sup>1)</sup>	Materials from which virus was isolated
82-14	BB	3	Femor head necrosis, nephritis, air sacculitis	CAM, 1st CEL, 1st	Tendon
82-22	BB	7	Arthritis	CAM, 1st	Tendon
82-84	B	5	Stunting, proventriculitis	CEL, 2nd	Proventriculus
82-88	BB	8	Arthritis, swollen foot pad, necrotic liver	CEL, 1st	Tendon, foot pad, liver, bone marrow
84-63	BB	9	Arthritis, swollen foot pad, intestinal hemorrhage	CEL, 1st	Tendon, foot pad, intestine
84-75	BB	12	Arthritis	CEL, 1st	Tendon(2)
85-26	B	5	Stunting, enteritis, pericarditis	CEL, 1st	Intestine
85-44	B	3	Stunting, liver necrosis, pericarditis	CEL, 1st	Liver

1) Passage level at which virus isolation was noticed.

BB: broiler breeder; B: broiler; CAM: chorioallantoic membrane of chicken embryo; CEL: chicken embryo liver cell culture.

서 국내에서도 reovirus 감염으로 인한 被害를 입고 있는 것으로 推測된다.

本 研究에서 브로일러種鷄에서보다 브로일러에서 分離된 reovirus의 수가 적으나 이는 診斷意頼例數가 적은데서 연유되었을 뿐만 아니라 브로일러농가에서 폐사율이 높고 증상이 比較的 뚜렷한 급성 전염병에 비하여 증상이 뚜렷하지 않은 發育不全症과 같은 경우 간과하는 경우가 많은 때문으로 풀이된다.

바이러스 分離 system으로 發育鷄卵 CAM 接種法과 CEL 培養細胞를 利用하였는 바 모든 例에서 두 system의 分離效率性을 比較하지는 않았으나 82-14 株의 例에서는 CAM과 CEL 培養細胞에서 모두 初回에 分離되었으나 85-44 株의 例에서는 CAM에서는 分離되지 않았으나 CEL 培養細胞에서는 初回에 分離되었다. 특히 CEL 培養細胞의 경우 總 13例의 바이러스 分離材料 接種例에서 1例(82-84 proventriculus)를 除外하고는 모두 初回接種에서 바이러스 分離를 認定할수 있었다. CEL 培養細胞는 CEF, chicken(embryo) kidney, chicken embryo lung 및 duck embryo fibroblast 培養細胞보다 reovirus 分離效率이 높을 뿐만 아니라(Guneratne 등, 1982; Jones 등, 1975; McFerran 등, 1976; Mustaffa-Babjee 등, 1973; Spradbrow와 Bains, 1974) CAM에 비하여 細

胞變性效果와 그 特徵을 觀察할수 있는 잇점이 있어 reovirus 分離에 適合한 system으로 간주 되었다.

## 2. 發育鷄卵 病變 및 培養細胞 變性

Reovirus 分離材料를 直接 發育鷄卵의 CAM에 接種하거나 CEL 培養細胞에서 分離된 reovirus를 發育鷄卵의 CAM에 接種하였을때 산발적인 폐사가 있었으나 대부분 5~7日間の 培養期間동안 生存하였다. 生存한 發育鷄卵의 CAM은 接種部位가 심하게 肥厚되고 浮腫을 觀察할수 있었으나 接種 部位에서 먼 곳에 轉移된 病變은 觀察할수 없었다. 鷄胎兒는 萎縮되고 심한 빈혈소견을 보였으며 肝은 黃色으로 壞死되거나 綠色을 띠고 있었으며 心臟은 半熟된 形態를, 그리고 脾臟은 정상보다 위축된 소견을 보였다.

CEL 培養細胞에서는 接種 3日째부터 特徵의인 巨大細胞를 形成하였으며 培養時間이 增加하면서 그數가 增加하고 單層細胞로부터 떨어지는 變化를 볼수 있었다. 감염된 培養細胞를 giemsa 染色하였을때 giant cello이 觀察되고 무감염 정상세포에 비하여 細胞質이 전반적으로 진하게 염색되었으나 뚜렷한 封入體는 核이나 細胞質 어디에서도 觀察할수 없었다. 이러한 發育鷄卵 및 培養細胞의 變化는 Bagust와 Westbury(1975), Guneratne 등(1982),

Hieronymus 등 (1983 a, b), Kawamura 등 (1965), van der Heide 등 (1981)의 報告와 일치하였다.

### 3. 電子顯微鏡觀察에 의한 virus의 形態

CEL 培養細胞에서 培養한 바이러스를 negative staining 하여 電子顯微鏡으로 觀察하였을때 전형적인 reovirus의 形態를 보여 주었다 (Figure 1). Virion은 球形의 形態를 취하고 있었으며 nucleocapsid는 2중의 膜으로 싸여 있으며 이러한 2중 막구조는 nucleocapsid가 빠져나간 empty particle (화살표)에서 더욱 뚜렷하게 觀察되었다. 2중막의 바깥층은 수레바퀴살과 같은 形態를 취하고 있었으며 내부 nucleocapsid는 음복 들어간 점모양의 capsomere로 덮혀 있었다. Virion의 直徑은 平均 80.7nm로 均一하였다.

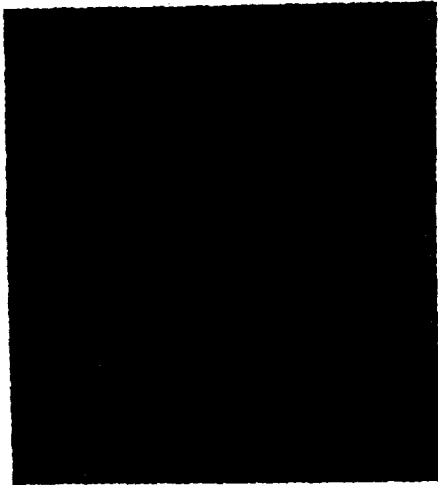


Fig. 1. Electron micrograph of reovirus isolate 82-14 negatively stained with 2% phosphotungstic acid. One of the particles is empty (arrow). (Bars represent 100 nm)

이러한 virion의 形態는 先人들의 보고와 일치하나 그 크기는 다소 큰 편에 속하였다. van der Heide 등 (1980)과 Vertommen 등 (1973)은 avian reovirus virion의 크기를 58-65 nm로, Hieronymus 등 (1983 a, b), McFerran 등 (1976), Mustafa-Babjee 등 (1973), van der Heide와 Kalbac (1975), van der Heide 등 (1981)은 68-75 nm로, Baroni 등 (1980), Glass 등 (1973), Jones 등 (1975)은 75-85 nm로 報告한바 있다.

本 研究에서 모든 아의분리 reovirus 뿐만 아니라 표준바이러스株로 사용한 S-1133株도 모두 같은 크기를 보여줌으로서 virion크기에 대한 다양한 報告는 바이러스株간의 差異라기 보다는 電子顯微鏡 檢査를 위한 材料準備상의 差異때문일 可能性이 높은 것으로 생각된다.

### 4. 寒天결 沈降反應에 分離株間的 關聯性

寒天결 沈降反應에서 모든 分離株는 抗家鬼 R-1株 및 S-1133株 면역혈청과 沈降線을 形成하였으며 S-1133株 抗原과 一致反應 (reaction of identity)을 보여 주었다. 침강선은 反應 48시간후부터 식별되었으나 96시간후에도 反應程度는 미약하였다.

Avian reovirus는 寒天결 沈降反應에서 公同의 抗原을 가지는데 (Leers 등, 1968; van der Heide와 Kalbac, 1975) 本 研究에서 分離된 바이러스株들은 標準抗血清으로 사용하 R-1株 및 S-1133株 면역혈청과 反應할 뿐만아니라 S-1133株 抗原과 同一反應을 보여 줌으로서 혈청학적으로도 avian reovirus임을 알 수 있었다.

### 5. 分離株의 性狀

分離된 reovirus株는 1일령의 병아리, 成鷄, 기니피그 및 말의 혈구를 凝集하지 않았으며 Table 2에서 보는바와 같이 chloroform 處理, IUdR

Table 2. Characterization of avian reovirus isolates.

Isolate	Treatment and infectivity titer			
	Untreated control	Chloroform	IUdR	56 °C 30 min.
82-14	5.17	5.38	5.50	4.50
82-22	5.83	5.83	6.17	5.17
82-84	5.67	5.17	5.88	5.00
84-75	5.50	5.23	5.67	5.23
S-1133	5.50	5.20	6.12	4.71

\* log TCID<sub>50</sub> / 0.025 ml

處理 및 56 °C에서 30분간의 熱處理에 대하여 강한 抵抗性을 보여 주었다. 크로로포름 處理時 대조로 使用한 뉴갯슬병바이러스 (교정원株)는 크로로포름 處理를 하지 않았을때 감염역가가 10<sup>6.8</sup> TCID<sub>50</sub> / 0.025 ml에서 處理後에 10<sup>2.5</sup> TCID<sub>50</sub> / 0.025 ml이하로 감염역가가 소실된 반면 avian adenovirus

(83-5株)는 크로로포름處理에 의한 감염역가의變動이 없었다( $10^{7.3}$  TCID<sub>50</sub>/0.025 ml). 이러한 분리주의 성상은 既存의 報告와 일치하였다(Deshmukh와 Pomeroy, 1969; Glass 등, 1973; Hieronymus 등, 1983; Jones 등, 1975; Kawamura 등, 1965; Mustaffa-Babjee 등, 1973; Sahu 등, 1980; van der Heide와 Kalbac, 1975; van der Heide 등, 1981).

### 6. 感染力價測定時 培養細胞의 感受性

分離된 reovirus는 CEF, CEL 및 Vero cell 培養細胞에서 syncytial type CPE를 이르기면서 증식하였으며 감염역가측정시 cell type이나 接種方法을 동시 또는 單層細胞가 形成되었을때 接種하거나 間に 別다른 차이없이 감염 4~5日後에 end point를 보여주었다(Table 3). Sahu와 Olson (1975)은 여러가지 line cell에서 avian reovirus의 증식성을 조사한바 Vero cell line에서는 대부분 증식하였다고 報告하였으며 Guneratne 등 (1982), Jones 등(1975), Mustaffa-Babjee 등 (1973)은 CEL, CEF 및 chicken(embryo) kidney 등의 培養細胞에서 avian reovirus의 증식을 調査한바 CEF 培養細胞가 증식성이 가장 不良하였다고 報告하였다. 그러나 本 試驗에서와 같이 바이러스 증식의 目的이 아니라 감염성의 測定時에는 cell type 간에 別다른 감수성의 差異를 보이지 않음으로서 virus의 성장조사나 중화시험을 實施할때는 培養이 간편한 CEF나 Vero cell을 利用할수 있을뿐만 아니라 세포분주와 동시에 바이러스 接種을 實施할수 있으므로 試驗期間의 短縮은 물

론 노력과 材料를 節約할수 있는 장점이 있었다.

Table 3. Sensitivity of different cell types in reovirus infectivity titrations.

Days after inoculation	Cell types and inoculation time				
	CEF		CEL		Vero
	SI	CI	SI	CI	CI
2	UD	UD	UD	UD	UD
3	3.1	4.5	4.2	4.7	UD
4	5.8	6.1	6.4	6.6	4.1
5	6.0	6.3	6.4	6.8	5.5
6	6.0	6.3	6.4	6.8	5.7

CEF: chicken embryo fibroblast cell culture  
 CEL: chicken embryo liver cell culture  
 SI: inoculated simultaneously at the time of cell seeding  
 CI: inoculated virus when cell cultures became confluent  
 UD: no detectable cytopathic effect at  $10^{-2}$  dilution  
 \*  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/0.025 ml

### 7. 發育鷄卵 致死時間

國內 分離株 3株(82-14, 82-22, 84-75)와 S-1133株를 10일령 發育鷄卵의 CAM에 接種하였을때(接種量:  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/embryo) 平均致死時間은 國內分離株가 53.8-58.9 시간이었으며 S-1133株는 72.8시간으로 國內分離株보다 12時間 이상 길었다(Table 4). 폐사한 發育鷄卵은 CAM의 肥厚는 뚜렷하지 않았으나 태아와 더불어 심한 充出血所見을 보여 주었다.

Table 4. Time of mortality of chicken embryos after inoculation via the chorioallantoic membrane with reovirus isolates.

Isolate	Inoculum ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> )	No. of embryos	Hours after inoculation								mean	S.D.
			40	48	56	64	72	80	88			
82-14	5.0	29	0	15	8	5	1	0	0	53.8	7.1	
82-22	5.0	29	0	12	9	4	3	1	0	56.3	9.2	
84-75	5.0	30	0	10	8	5	5	2	0	58.9	10.4	
S-1133	5.0	30	0	1	3	6	5	12	3	72.8	10.6	

Hieronymus 등(1983 a)은 5주의 avian reovirus를 9일령 SPF 發育鷄卵의 漿尿膜上, 漿尿膜腔內 및 卵黃內로 接種한 結果(接種量:  $10^{5.4}$  -  $10^{6.0}$  PFU/embryo) 致死時間은 接種經路에 關係

없이 비슷하였으나 바이러스株에 따라서 致死時間이 2~3日 또는 4~6日 程度라고 報告하였다. 本 研究에서 分離初期에는 發育鷄卵 漿尿膜上으로 接種하였을때 5~7日 동안의 培養期間中 대부분 生存하

였으며 CAM은 充出血보다 심한 肥厚와 浮腫을 보였던 점을 감안할때 鷄胎兒致死時間의 短縮과 病變의 變化가 分離 初期에 비하여 發育鷄卵 致死時間 試驗에서 接種한 바이러스의 量이 많았기 때문인지 또는 CEL 培養細胞 계대회수가 增加된 接種材料 (5-10대 繼代)를 使用함으로 해서 比例하여 鷄胎兒에 대한 病原성이 增大된 때문인지는 確實치 않다. 뿐만 아니라 鷄胎兒에 대한 病原성과 닭에서의 병원성이나 免疫原性간에 어떤 關聯성이 있는지 앞으로 추구할만한 課題로 본다.

#### IV. 摘 要

關節炎(또는 腱鞘炎), 發育不全症을 보이는 12주령 이하의 브로일러 種鷄와 브로일러에서 8株의 바이러스를 分離하여 avian reovirus로 同定하였다. 分離된 reovirus는 電子顯微鏡에서 二重膜을 갖

는 球形으로 virion의 직경은 81nm였으며 寒天 凝沈降反應에서 既知의 reovirus(S-1133株) 및 抗血清(抗S-1133株 및 R-1株)과 反應하였다. 分離된 reovirus는 血球凝集能力이 없었으며 chloroform, IUdR 및 熱處理(56℃, 30分)에 강한 抵抗성을 나타내었다.

Reovirus의 감염성 測定時 鷄胎兒纖維芽細胞 및 肝細胞培養과 Vero cell 培養에서 細胞分注와 동시에 바이러스를 接種하거나 單層細胞가 形成된 後 接種하거나 간에 별다른 差異없이 감염 4~5日後에 end point에 到達되었다.

分離된 reovirus를 鷄胎兒肝細胞培養에 5~10대 繼代培養한후  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>의 바이러스를 10일령 發育鷄卵의 漿尿膜上에 接種하였을때 平均致死時間이 國內分離株는 54-59時間인데 반하여 S-1133株는 73時間으로 약간 길었다.

#### V. 引用文獻

1. Bagust, T.J. and H.A. Westbury. 1975. Isolation of reoviruses associated with diseases of chickens in Victoria. Aust. Vet. J. 51: 406-407.
2. Baroni, A., P. Bertoincin, P.N. D'aprile, and B. Felluga. 1980. Ultrastructural histopathology of chick embryo chorioallantoic membrane infected with an avian reovirus. Avian Path. 9:341-354.
3. Carboni, A., G. Cervio, D. Cessi, E. Lodetti, G. Mandelli, and A. Valleri. 1975. Studies on viral arthritis (tenosynovitis) in Italy. Avian Path. 4: 87-96.
4. Deshmukh, D.R. and B.S. Pomeroy. 1969. Avian reoviruses. I. Isolation and serological characterization. Avian Dis. 13: 239-243.
5. Fahey, J.E. and J.F. Crawley. 1954. Studies on chronic respiratory disease of chickens. II. Isolation of a virus. Canad. J. Comp. Med. 18: 13-21.
6. Glass, S.E., S.A. Naqi, C.F. Hall, and K.M. Kerr. 1973. Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens. Avian Dis. 17: 415-424.
7. Guneratne, J.R.M., R.C. Jones, and K. Georgiou. 1982. Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. Avian Path. 11: 453-462.
8. Hieronymus, D.R.K., P. Villegas, and S.H. Kleven. 1983a. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with malabsorption syndrome. Avian Dis. 27: 246-254.
9. Hieronymus, D.R.K., P. Villegas, and S.H. Kleven. 1983b. Characteristics and pathogenicity of two avian reoviruses isolated from chickens with leg problems. Avian Dis. 27: 255-260.
10. Ide, P.R. and W. Dewitt. 1979. Serological incidence of avian reovirus infection in broiler breeders and progeny in Nova Scotia. Canad. Vet. J. 20: 348-358.

11. Itakura, C., Y. Matsukawa, and M. Goto. 1977. Pathology of tenosynovitis with ruptured gastrocnemius tendon in young and adult broiler chickens. *Jap. J. Vet. Sci.* 39:509-520.
12. Jones, R.C. 1976. Reoviruses from chickens with hydropericardium. *Vet. Rec.* 99:458.
13. Jones, R.C., J. R. M. Guneratne, and K. Georgiou. 1981. Isolation of viruses from outbreaks of suspected tenosynovitis (viral arthritis) in chickens. *Res. Vet. Sci.* 31:100-103.
14. Jones, R.C., F.T.W. Jordan, and S. Lioupis. 1975. Characteristics of reoviruses isolated from ruptured gastrocnemius tendons of chickens. *Vet. Rec.* 96:153-154.
15. Kawamura, H., F. Shimizu, and H. Tsubahara. 1965. Avian reovirus: its properties and serological classification. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* 5:115-124.
16. Kim, S.J. 1982. Studies on infectious bursal disease. II. Persistence of maternally derived neutralizing antibody and its effect on susceptibility of young chickens. *Korean J. Virol.* 12:55-63.
17. Kouwenhoven, B., F.G. Davelaar, and J. van Walsum. 1978. Infectious proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Path.* 7:183-187.
18. Leers, W.D., K.R. Rozee, and H.C. Wardlow. 1968. Immunodiffusion and immunoelectrophoretic studies of reovirus antigens. *Canad. J. Microbiol.* 14:161-164.
19. MacKenzie, M.A., and B.S. Bains. 1976. Tenosynovitis in chickens. *Aust. Vet. J.* 52:468-470.
20. Mandelli, G., T. Rampin, and M. Finazzi. 1978. Experimental reovirus hepatitis in newborn chicks. *Vet. Pathol.* 15:531-534.
21. McFerran, J.B., T.J. Connor, and R.M. McCracken. 1976. Isolation of adenoviruses and reoviruses from avian species other than the domestic fowl. *Avian Dis.* 20:519-524.
22. Menendez, N.A., B.W. Calnek, and B.S. Cowen. 1975. Experimental egg transmission of avian reovirus. *Avian Dis.* 19:104-111.
23. Mustaffa-Babjee, A., P.B. Spradbrow, and A.R. Omar. 1973. Characterization of an avian reovirus isolated in Queensland. *J. Comp. Pathol.* 83:387-400.
24. Odor, E.M., R.K. Page, O.J. Fletcher, and P. Villegas. 1981. Pale bird syndrome-clinical picture and etiology. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179:273.
25. Olson, N.O., and K.M. Kerr. 1966. Some characteristics of an avian arthritis viral agent. *Avian Dis.* 10:470-476.
26. Page, R.K., O.J. Fletcher, G.N. Rowland, D. Gaudry, and P. Villegas. 1982. Malabsorption syndrome in broiler chickens. *Avian Dis.* 26:618-624.
27. Petek, M., B. Felluga, G. Borghi, and A. Baroni. 1967. The Crawley agent: an avian reovirus. *Arch. ges. Virusforsch.* 21:414-424. (Cited from van der Heide, L., 1977).
28. Rovozzo, G.C. and C.N. Burke. 1973. *A manual of basic virological techniques*. Prentice-Hall, Inc., pp. 139-151.
29. Sahu, S.P. and N.O. Olson. 1975. Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract, with viruses isolated from the synovia. *Am. J. Vet. Res.* 36:847-850.
30. Sahu, S.P., N.O. Olson, and R.W. Townsend. 1980. Characterization of avian reoviruses isolated from the synovia and breast blister. *Avian Dis.* 24:896.



31. Schwartz, L.D., R.F. Gentry, H. Rothenbacher, and L. van der Heide. 1976. Infectious tenosynovitis in commercial White Leghorn chickens. *Avian Dis.* 20:769-773.
32. Spradbrow, P.B. and B.S. Bains. 1974. Reoviruses from chickens with hydropericardium. *Aust. Vet. J.* 50:179.
33. van der Heide, L. 1977. Viral arthritis/tenosynovitis; a review. *Avian Path.* 6:271-284.
34. van der Heide, L. and M. Kalbac. 1975. Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.* 19:683-688.
35. van der Heide, L., J. Geissler, and E.S. Bryant. 1974. Infectious tenosynovitis: serologic and histopathologic response after experimental infection with a Connecticut isolate. *Avian Dis.* 18:289-296.
36. van der Heide, L., M. Kalbac, M. Brustolon, and M.G. Lawson. 1980. Pathogenicity for chickens of a reovirus isolated from turkeys. *Avian Dis.* 24:989-997.
37. van der Heide, L., D. Lutticken, and M. Hofzinek. 1981. Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis ("brittle bone disease"; "femoral head necrosis") in broiler chickens. *Avian Dis.* 25:847-856.
38. Vertommen, M., J.H.H. Van Eck, B. Kowvenhoven, and N. Van Kol. 1980. Infectious stunting and leg weakness in broilers: I. pathology and biochemical changes in blood plasma. *Avian Path.* 9:133-142.

---

○

謝辭：本 研究의 電子顯微鏡 觀察에 수고해주신 李榮純 教授任께 심심한 感謝를 드린다.