

## 國內에서 分離한 닭 레오바이러스의 성상에 關한 研究

김성식, 박병옥, 김순재\*

경기도가축위생시험소, 건국대학교 수의학과\*

## Studies on Properties of Avian Reovirus Isolated in Korea

Sung-Shik Kim, Byoung-Ok Park, Soon-Jae Kim\*

Kyeonggi Veterinary Service Laboratory, Kon-Kuk University\*

### Abstract

Avian reoviruses have been implicated in respiratory disease enteric conditions including Cloacal pasting in young chicks, pericarditis, hydropericardium, anaemia with swollen spleen and liver and petechiation of skeletal muscle and viral arthritis.

This study was conducted to examine properties of reovirus field 3 strains isolated from affected broiler from several farms.

An infectious agent was isolated from leg tendons and intestine of broiler with clinical tenosynovitis. The agent grew well on the chicken embryo kidney cells(CEK). One of them produced cytopathic effects(CPE) of round type and formed intranuclear inclusions, and the other was characterized by CPE of syncytical type and cytoplasmic inclusion.

The properties and serological classification of field strains were examined by hemagglutination test, virus neutralization test, agar gel precipitin, electropherotype.

They showed no hemagglutination reactions and not well neutralization and to possess common antigens detectable by AGP test. RNA electropherotype presented 10 segment band as the previous report.

These data suggest that the field strains and standard strains(1133, 1733) may be the same group.

**Key words** : isolated reovirus, culture, inoculum, serological classification.

## 緒 論

Reo 바이러스는 double stranded(DS) RNA 바이러스로 숙주세포에서 세포질내 증식성을 가지며 사람 및 대부분의 온혈동물에서 불현성 감염을 일으키나 포유자돈과 가금류에서는 그 병인이 인정된다.<sup>1, 2, 3, 4, 5)</sup>

양계에 있어서 Reo 바이러스 감염증은 임상적으로 *Mycoplasma gallisepticum*<sup>6, 7)</sup>과 *Staphylococcus aureus*<sup>8)</sup>와 유사하며 관절염, 건초염 등을 주증으로 하고 만성경과에 의한 체중손실, 파행, 호흡기 및 위장관의 증상도 수반한다.<sup>4, 5, 9)</sup>

병리 해부소견으로는 심막염, 수심낭증, 간, 비장 등의 비대, 드물게는 골격근의 점상출혈도 수반한다고 하였다.<sup>9, 10, 11, 12, 13)</sup>

병원 바이러스는 감염계의 장관, 관절 등에 다량 함유되어 드물게 접촉전염을 하며, 주전염원은 Reo 바이러스 감염증에 이환된 모계로부터의 수직전파이다.<sup>14, 15)</sup> 감염에서 회복한 가금은 일정기간후 능동면역이 형성되나, 상당한 기간 바이러스를 배출하여 주요 감염원이 된다. 모계로부터 이행된 감염증은 부화 1~2주령의 초생추에서는 폐사가 발생하는데, 주된 소견은 간, 신장, 비장의 괴사, 심막염 등이다.<sup>10, 16)</sup>

한편 Avian reo 바이러스는 1954년 Olson<sup>17)</sup> 등이 성계의 tarsal joint에서 분리하였으며, 그 이전의 발생에 있어서는 대부분 *Mycoplasma Synovia*으로 분류하였다.<sup>7, 18)</sup> 그후 Dalton과 Henry<sup>19)</sup>는 영국에서 Olson과 Solomon<sup>20)</sup>은 미국 각지에서 발생되고 있음을 보고하였고, Krasselt와 Voute<sup>21)</sup>는 이탈리아에서 Johnson과 van der Heide<sup>22)</sup>는 뉴질랜드에서, 또는 가까운 일본에서는 1966년 Kawamura<sup>23)</sup>가 성계의 장관에서 바이러스를 분리하여 공통항원을 가지는 5가지의 혈청형을 보고하였다.

그 이후 많은 연구자들에 의해 바이러스의 생화학적 성상, 혈청학적 성상, 병원성 및 RNA, polypeptide 관련연구가 진행되고 있다.<sup>24, 25, 26, 27, 28)</sup>

Reo 바이러스는 바이러스 항원의 구성 성분

에 따라 혈청형을 분류하면 닭에서만 적어도 5가지 이상으로 보고하였다.<sup>10)</sup> 그러나 Reo 바이러스는 다른 혈청형과 공통항원 구조를 가지고 있으므로 혈청학적으로 동정시 서로 교차반응을 나타낸다.<sup>12, 29)</sup> 따라서 일반적인 혈청반응으로 Reo 바이러스 감염증을 진단할 수 있으며 현재까지 보고된 항체를 증명하는 방법으로 초기에는 hemagglutination test,<sup>29, 30)</sup> agar-gel precipitation test<sup>18, 31)</sup> 등을 이용했으나 조직배양에 의한 혈청중화시험법<sup>6, 10, 32)</sup>이 개발되어 진단의 정확도가 비약적으로 높아졌다. 그러나 Avian reo 바이러스에서 혈청중화시험은 항원, 항체의 중화능에 있어서 큰 제약이 있었다. 또다른 방법으로는 immunofluorescence test<sup>23, 31)</sup>와 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)<sup>33)</sup> 등이 대표적이며 최근에는 단클론성 항체를 이용한 진단법이 각광을 받고 있다.<sup>34, 35)</sup>

한편 우리나라에서는 본 병에 대한 체계적인 추이가 없어 과거 발생역학에 대해서는 불명하며 김<sup>36)</sup> 등에 의하면 현재에도 전국의 양계농장에서 산발적으로 발생되고 있다 한다. 이 병을 성공적으로 방제하기 위해서는 국내 Reo 바이러스를 각 지역에서 분리하여 바이러스 성상조사가 필수적인데, 이에 본 실험에서는 경기도 일원의 양계농가에서 Reo 바이러스 감염증에 급성으로 이환된 육계의 장관과 관절에서 바이러스를 분리하여 그 성상을 시험한 바 약간의 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 공시 바이러스

본 실험에 사용된 바이러스는 현재 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양, 계대, 보관중인 Avian reo virus-1133, 1733 주를 표준주로 사용하였다. 그리고 경기도 일원의 양계농가에서 Reo 바이러스 감염증이 있는 8예의 육계에서 바이러스가 분리된 3 예를 실험에 공시하였다.

### 바이러스 분리 및 증식

Avian reo 바이러스에 급성으로 감염된 8~12주령 육계의 장관과 관절을 무균적으로 분리, grinding 하여 penicillin(100 Unit)과 streptomycin( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 PBS를 15ml 붓고  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  무균필터로 여과하였다.

SPF(Specific-pathogen-free) 18일령 CEK(Chicken embryo kidney) 세포를 배양한 뒤 PBS(Phosphate-buffered-saline)로 3회 세척한 다음, 분리된 Reo 바이러스를 각각 접종하여 1시간동안  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 감작한 후 2% BCS(Bovine calf serum), 0.11%  $\text{NaHCO}_3$  및 TPB(Tryptose phosphate medium)가 혼합된 EMEM(Eagle's minimum essential medium) 배지를 사용하여 3일동안 배양하였다.

CPE(Cytopathic effect : 세포변성효과)가 관찰될 때까지 4번 blinding passage를 계속하여 각각의 배양용기에서 세포변성효과를 완전히 관찰한 다음 역가를 측정하였다.

대량 배양을 위해 SPF 10일령 CEF(Chicken embryo fibroblast) 세포를 이용 하루간 배양한 다음  $100\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  되게 바이러스를 접종하여, 3회 계대 배양한 후 세포변성효과가 완전히 관찰될 때 세포를 수확하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 3회 동결융해 처리하였다.

동결처리된 바이러스 배양액을 3,000rpm 20분간 원심하여, 상층액을 모아  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관, 바이러스 재료로 사용하였다. 표준주 1133, 1733도 배양하여 대조재료로 사용하였다.

### 바이러스의 증식성 조사

고 역가의 Reo 바이러스를 생산하기 위해 표준 Avian reo 바이러스 1733주를 사용하여 배지의 pH, 배양온도, 시간별 및 바이러스의 접종량, 혈청량별 증식성을 조사하였다.

### 항원정제

표준주와 분리주간의 cross reaction을 위해 CPE가 확인된 각 세포주를 3,000rpm 20분간 원

심하여 상층액을 모아 다시 26,000rpm에 2시간 30분(SW-28 rotor,  $4^{\circ}\text{C}$ )동안 초고속원심(Beckman Ultracentrifuge Model L<sub>2</sub>-658) 분리하여 최초의 바이러스 부유액량(Original volume)의 1/100의 PBS로 침적시켜 항원으로 사용하였다.

### 항혈청 생산

Reo 바이러스에 대한 항체음성인 어미토끼 18마리를 선정하여, 각 독주별로 3마리씩 접종하고, 나머지 3마리는 대조군으로 두었다. 바이러스 접종량은  $10^{4.0}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  되게 하여 1차 근육 접종하고 3주후 다시  $10^{5.0}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 씩 재접종하였다. 재접종 2주후에 각 군별로 채혈하여 혈청을 분리,  $56^{\circ}\text{C}$ 에 30분동안 비동화시켜 항혈청으로 공시하였다.

### 혈구응집성 조사

바이러스가 감염된 세포들은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 3번 동결융해처리하고 나서 그 상층액을 분주하여 혈구응집성을 조사하였다.

U형 96-well plate에 바이러스액을  $50\mu\text{l}$ 씩 분주, 2진 희석하여 동량의 1% 닭혈구, 사람 O형 혈구, Guinea pig 혈구, 거위혈구를 첨가하여 잘 섞은 다음 실온 및  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 감작시켜 혈구응집성을 관찰하였다.

### 병원성 조사

계태아에 대한 병원성을 조사하기 위해 Dale<sup>10)</sup>의 방법에 준하여 Reo 바이러스 각주별 6, 10일령의 SPF계란에 30개씩 접종하여 시간별 치사율을 측정하였다. Chorioallantoic sac(CAS)와 Chorioallantoic membrane(CAM)의 접종은 SPF 10일령 난을 각각 10개씩 사용하였고, yolk sac의 접종은 SPF 6일령 난을 각각 10개씩 사용하여  $0.1\text{ml}$ 를 접종하였다.

### 각 독주별 교차반응시험

Heide<sup>12)</sup>의 방법에 준하여 agar gel precipitin

### Method of virus treatment

Preparation of virus pellet treated with 1ml 0.01M Tris-HCl

↓

Transfer 200 $\mu$ l to a tube

↓

Add 20 $\mu$ l phenol

Add 200 $\mu$ l chloroform / isoamylalcohol (24 : 1) (mix well)

↓

Microfuge 5 min (at room temperature)

↓

Transfer top aqueous phase to a new tube (avoid CHCl<sub>3</sub>)

↓

Add 20 $\mu$ l 3.0M sodium acetate, vortex to mix.  
Put tube on ice

↓

Add 0.25ml cold (−20°C) 95% ethanol, vortex to mix

↓

Incubate 30min in a −70°C freezer

↓

Microfuge 10min, gently pour off supernatant  
(not pellet) and discard

↓

Dry pellet with tube inverted on a paper towel

↓

Resuspend pellet in 25 $\mu$ l TE, store at −20°C

↓

Use 5 $\mu$ l to examine on a gel

반응시험을 실시하였다. pH 7.4의 PBS에 1% special agar noble를 첨가하여 끓인 다음, 100×15mm plastic petridish에 agar solution을 펴고 항원과 항혈청을 교차반응시켜 실온에서 over-night 후 반응결과를 판독하였다.

#### 바이러스의 전자현미경적 조사

표준주와 국내분리주의 전자현미경적 조사를 위해 Smith 방법에 준하여 먼저 전술한 방법에 따라 세포변성효과를 확인한 표준주 1133, 1733과 국내 분리주의 세포주를 3,000rpm 20분간 원심하여 상층액을 모아, 다시 26,000rpm에 2시간 30분동안 초고속 원심분리하여 0.1ml의 PBS를 잘 침적시킨 다음, 농축된 바이러스를 grid에 한 방울 떨어뜨려 건조한 후, 2% phosphotungstic acid에 1분동안 처리하여 전자현미경 50,000배에서 관찰하였다.

#### 바이러스의 RNA electropherotype 조사

야외분리 바이러스에 대한 RNA의 전기영동 pattern을 관찰하기 위해 Smith 등이 기술한 방법에 의하여 바이러스를 농축하였다. 핵산추출과 전기영동은 Diana<sup>24)</sup> 등이 기술한 방법에 준하여 시행하였다. 즉 RNA는 phenol-chloroform 처리에 의해서 추출하여 0.85% agarose gel에서 15mA 6시간 동안 전기영동을 실시한 후 각 band의 이동상을 확인하였다.

#### 바이러스의 protein electropherotype 조사

분리주간의 단백질 양상을 알아보기 위해 plastic 세포 배양기에 계태아세포를 1일간 단층 배양한 후 Reo 바이러스를 감염시켜 CPE가 80%정도 진행되었을 때 PBS로 3회 세척하여 세포들을 수확하였다.

수확된 세포를 lysis buffer(0.5% Nonidet p40, 0.5M NaCl, 0.05M Tris, 1mM PMSF, PH8.0)로 처리한 후 3,000rpm에 20분간 원심한 후 상층액을 시료로 사용하였다.

공시시료와 SDS sample buffer를 동량 혼합

하여 100℃에서 5분간 가열한 후 원심, 상층액을 7.5% polyacrylamide gel에 충전, 7.5mA에서 16시간정도 전기영동을 실시하였다.

## 結 果

#### 바이러스 분리

Reo 바이러스에 급성으로 감염된 8예의 육계 중 3예에서 바이러스가 분리되었다. 먼저 분리 재료를 CEK 세포에 접종하여 4대 계대배양했을 때 3예에서 CPE를 관찰할 수 있었고 CPE는 감염 14시간 후부터 시작되었다.

CPE는 정상세포와 쉽게 구별이 가능하였으며 일반적으로 감염후 40시간이 지나면 심한 세포 탈락현상을 보였다.

표 1에서 보는 바와 같이 분리바이러스의 3주에 대한 CPE, F.A, S.N, AGP 등의 정상시험 결과 모두 양성으로 인정되었다.

#### 바이러스 증식성조사

고역가의 Reo 바이러스를 생산하기 위하여 표준주 1733주를 이용하여 배지의 pH, 배양온도, 배양시간별 증식성을 조사하였던 바 표 2에서 보는 바와 같다.

20mM HEPES와 0.11% NaHCO<sub>3</sub>를 함유한 pH 7.0~7.5의 EMEM 배지를 공시하여 3일간 배양하였을 시 가장 높은 역가를 얻을 수 있었으며, pH 7.5의 배지와 37℃의 배양온도에서 바이러스 접종량과 혈청농도를 달리한 실험에서는 표 3에서 보는 바와 같이 100TCID<sub>50</sub>/ml를 접종하여 1~2% BCS를 함유한 배지에서 3일간 배양했을 때 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml의 높은 역가를 얻을 수 있었다.

#### 혈구응집성 조사

Reo 바이러스 항원 및 바이러스 배양액을 microplate에 2진 희석하여 4℃ 및 실온에서 1% 혈구와 반응시켰을 때 표 4에서 보는 바와 같이 닭에서 분리된 표준주 및 분리주는 혈구응집이

Table 1. Detection of avian reovirus field isolates using four different diagnostic methods

Field isolates*	Isolation lesions	Cell culture	Diagnostic method			
			CPE	F · A	S · N	AGP
1	Small intestine	CEK	+	+	+	+
2	Small intestine	CEK	+	+	+	+
	Leg	CEK	+	+	+	+
3	Small intestine	CEK	+	+	+	+
4	Small intestine	CEK	-	-	-	-
5	Small intestine	CEK	-	-	-	-
6	Leg	CEK	-	-	-	-
7	Small intestine	CEK	-	-	-	-
8	Small intestine	CEK	-	-	-	-
Control	1133, 1733	CEK	+	+	+	+

\* Virus : 4th passage level

Table 2. Effect of environmental factors on growth of avian reovirus.

Temp.	Hours	pH of Media			
		6.5	7.0	7.5	8.0
37°C	48	6.0*	6.5	6.5	5.0
	72	6.5	7.5	7.5	5.0
	120	6.0	7.0	7.0	4.0
30°C	48	3.0	4.0	4.0	3.0
	72	3.5	5.0	5.0	3.0
	120	3.5	5.0	5.0	3.0

\* Reovirus titers are expressed as  $\log_{10}TCID_{50} / ml$

Table 3. Effect of serum concentration and dose of inoculum on growth of avian reovirus.

Virus inoculated ( $TCID_{50} / ml$ )	Serum concentration in media			
	0%	1%	2%	5%
10	6.0*	6.0	6.0	5.5
100	6.5	7.5	7.5	6.5
1000	6.5	7.0	7.0	6.0

\* Reovirus titers are expressed as  $\log_{10}TCID_{50} / ml$

Table 4. Hemagglutination determination of reovirus strains.

Temp.	Strains	R B C			
		Chicken	Human O-type	Guinea pig	Goose
4°C	1133	—*	—	—	—
	1733	—	—	—	—
	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
	3	—	—	—	—
Room Temp.	1133	—	—	—	—
	1733	—	—	—	—
	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
	3	—	—	—	—

\* Negative

일어나지 않았다.

병원성 조사

Reo 바이러스를  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 정도로 희석하여 6일령과 10일령 난의 계태아에 인공감염시켜 각 독주별, 접종부위별 치사율을 시간별로 조사한 결과 표 5에서와 같이 계태아의 치사율은 접종부위에 따라 큰 차이없이 2~6일 사이로 나타났으며 각 독주별 치사율은 다소 불규칙하였

으나 표준주 및 분리주간에 거의 비슷한 결과를 얻었다.

그러나 분리주 3과 전체주를 비교했을 때는 1 일간의 차이를 볼 수 있었다.

각 독주별 교차반응시험

토끼에서 Reo 바이러스에 대한 항혈청을 생산하여 CEK, CEF 세포에서 혈청 중화시험을 실시하였으나 항원, 항체의 특이성 때문에 end-

Table 5. Time of mortality of chicken embryo after inoculation in the chorioallantoic sac (CAS) chorioallantoic membrane(CAM) or yolk sac(YS) with avian reovirus.

Reovirus strains	Titer of inoculum (logTCID <sub>50</sub> /ml)	Mortality(routes of inoculation)		
		CAS	CAM	YS
1733	5.0	4~6*	3~4	4
1133	5.0	3~5	5	3~4
1	5.0	4~5	5	4
2	5.0	4	3	4
3	5.0	2~3	2	4

\* Days post inoculation

Table 6. Cross reaction of reovirus strains.

Antigen	Anti-serum				
	1133	1733	1	2	3
1133	+	+	+	+	+
1733	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+

point를 결정할 수 없었으므로 AGP법을 이용하여 교차반응을 실시하였다.(표 6)

#### 전자현미경적 조사

그림 1과 2에서와 같이 표준주와 분리주의 전자현미경적 조사에서 핵은 분명하게 구분되며

virus의 직경은 약 60-80nm인 것으로 추정할 수 있었다.

그러나 Reovirus의 icosahedral symmetry 구조 및 capsid는 50,000 배의 전자현미경에서는 관찰할 수 없었다.

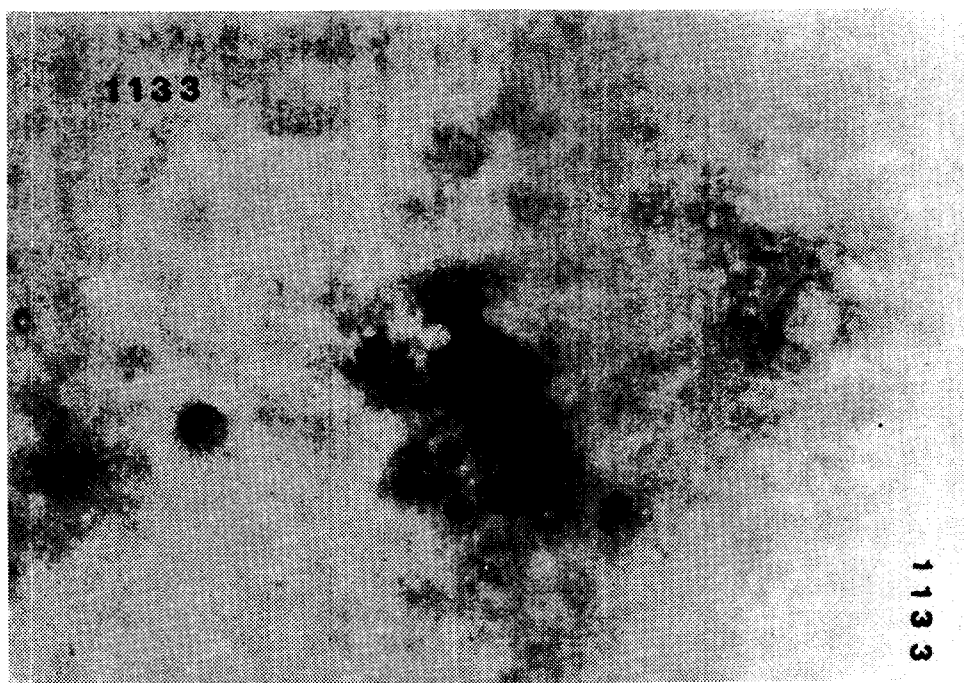


Fig 1. Electron micrograph of PTA stained standard strain - 1133 of avian reovirus(50,000x)



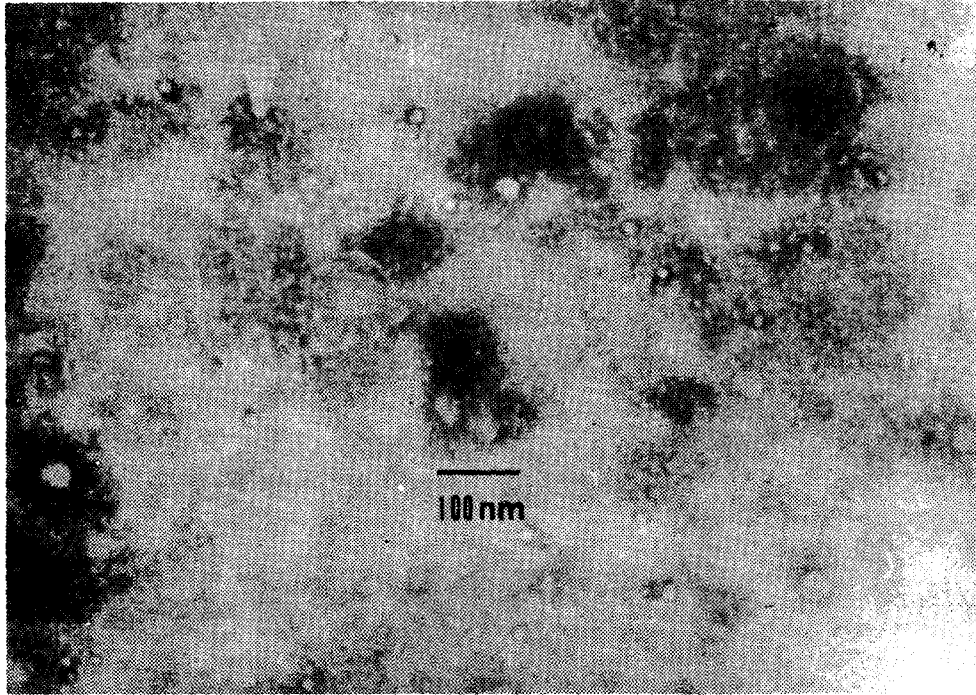


Fig 2. Electron micrograph of PTH stained field isolated strain of avian reovirus(50,000x)

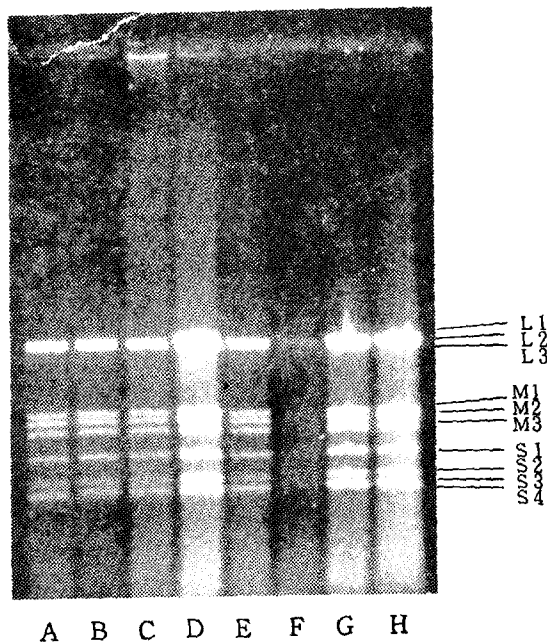


Fig 3. Electrophoretic patterns of avian reovirus RNA on a 0.85% agarose gel. lane A(1133) lane B(1733) lane C, D(1) lane E, F(2) and lane G, H(3)

바이러스의 electropherotype 조사

야외분리 닭 Reo virus 3주에서 추출한 RNA를 전기영동하여 segment의 이동 pattern을 관찰한 결과는 그림 3과 같다. 3주에서 모두 동일한 pattern을 보여주고 있으며 4 group의 band가 뚜렷이 보이고 있는데 이것을 대조로 사용한 1733, 1133주와 동일한 양상을 보인 것으로 두 겹 겹 보이는 band는 3개의 band가 합하여져 이동한 것으로 볼 수 있다. 그러므로 segment 수는 10개이며 모두 동일 group에 속했다.

표준주 및 분리주 3주에서 protein을 분리하여 전기영동한 결과는 그림 4와 같이 segment의 이동양상이 크게 5개의 band로 나눌 수 있었으며 맨 위쪽의  $\lambda_A$  band는 core protein으로 추측되고  $\mu_B$ 는 surface protein으로 추정된다. 이와 같은 결과로 볼 때 대조로 사용한 1733주, 1133주와 분리주는 모두 같은 group에 속하며 gene 및 단백질 이동 pattern이 병원성에 영향을 미치는 다른 group은 찾을 수 없었다.

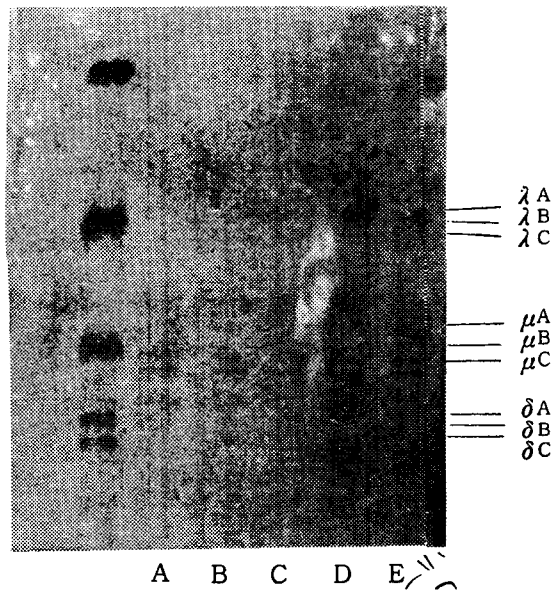


Fig 4. Electrophoretic patterns of Avian reovirus polypeptide on a 7.5% polyacrylamide gel lane A(1133) lane B(1733) lane C, D, E(field strains)

考 察

Reo 바이러스 감염증은 전 세계적으로 널리 유행하는 질병으로 대부분의 가축에서는 불현성 감염으로 진행되나 가금류에서는 그 병인이 인정되며 특히 육계에서는 치명적인 경제적 피해를 가져다 준다.<sup>2, 35, 37)</sup>

가금에서 이 질병은 만성적으로 경과되는 경우가 많았기 때문에 일반농장에서 폐사를 통한 경제적 손실보다는 발육저하, 산란저하, 체중손

실로 인한 2차적 피해가 막대하다고 할 수 있다.<sup>10, 11, 12, 13, 38)</sup>

질병이 유행하는 주된 원인은 만성적 경과로 인한 조기 병인 발견이 어렵고, 임상소견으로 쉽게 진단할 수 없으므로, Avian reo 바이러스 감염증을 보균한 종계로부터의 급속한 난계대 전파이다. 따라서 이 병을 진단하여 조기 방역대책을 강구함이 최우선 과제라 생각되는데, 조기진단을 위해서는 혈청학적 방법을 통한 실험실 진단에 의존할 수밖에 없는 실정이다.<sup>12, 14, 15)</sup>

선진국에서는 이미 전국적인 발생추이와 예방 대책을 수립해 놓고 있지만 우리나라에서는 1989년도에 비로소 김<sup>36)</sup> 등에 의해 전국적인 발생조사를 시작하였으며, 그의 중간보고에 의하면 제주도를 제외한 전국일원의 양계농가에서 Reo 바이러스 감염증에 이환된 보균계는 7%에 달한다고 보고한 바 있다.

Reo 바이러스는 1954년 Dalton<sup>19)</sup> 등에 의해 최초로 규명된 이래 여러 연구자들의 검토가 있었는데 대부분의 내용은 생화학적 성장조사, 혈청학적 조사, 병원성 시험 및 RNA 분석 등의 방법으로 Reo 바이러스를 분리동정하고 역학조사를 실시한 것으로 많은 인력과 시간이 소요되었다.<sup>39, 40, 41)</sup>

최근에는 Reo 바이러스의 RNA 분석과 단크론성 항체를 이용한 항원구조에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들을 이용하여 신속하고 정확하게 Reo 바이러스 감염증을 동정하려고 시도하고 있다. 따라서 핵산구조를 밝히고 이들의 성상을 규명하여 효과적으로 Reo 바이러스 감염증을 진단 및 예방할 수 있는 방법을 개발한다는 것은 아주 중요한 일이라 생각된다.

국내에서는 Reo 바이러스 분리에 관한 연구 뿐 아니라, 바이러스 성장 조사에도 미흡하여 이에 저자는 Deshmuks<sup>14)</sup> 등과 Olson<sup>17)</sup> 등의 방법에 준하여 Reo 바이러스에 급성으로 감염된 육계로부터 바이러스를 분리, 동정하여 외국 분리주와 비교하여 성장조사를 실시하였는데 거의 같은 group으로 나타났다.

한편 Hartley<sup>42)</sup> 등과 Brubaker<sup>43)</sup> 등은 Reo 바이러스 혈청형에 따라 사람 O형 혈구에서 응집력을 갖는다고 하였으나, 여기서 분리된 Avian reo 바이러스는 모두 음성으로 나타났다. AGP법은 실험방법이 쉽고 재료비용이 저렴하여 항체검출에 많이 이용되고 있지만 항체검출에 대한 민감도가 낮고 항체보유율을 측정할 수 없는 결점이 있다. 또 혈청중화시험은 교차반응 및 항체검출의 정확성이 높아 좋은 진단방법이라고 사료되나 실제 Avian reo 바이러스 실험시

anti-reovirus 혈청의 질적수준에 따라 특이성과 민감도에 큰 차이가 있었고, 실험절차에 따라 차이는 있겠으나, Wood<sup>29)</sup> 등의 방법으로는 항원, 항체의 중화능이 떨어져 결과 판독시 endpoint를 결정하기가 어려웠다. Gentsch<sup>44)</sup> 등과 Rubin<sup>45)</sup> 등은 Reo 바이러스의 혈청형에 따라 RNA의 크기와 segment의 양상이 서로 다르나 병원성에 관계되는 부분의 유전자는 상당한 동질성을 나타낸다고 하였다.

또 Diana<sup>3)</sup> 등과 Mark<sup>6)</sup> 등은 Reo 바이러스 RNA의 10개 segment중 M<sub>3</sub>, S<sub>1</sub>의 유전자가 병원성 결정기라고 하였는데 이와 같은 성적을 놓고 볼 때 외국분리주와 국내분리주는 거의 같은 결과를 나타내었다. 단지 바이러스분리 배양시 역가면이나 병원성에서의 차이점들은 환경요인들에 의해 변화될 수 있는 점들이라고 추정된다.

바이러스 단백질 분석에서 3개의 주요 band와 나머지 2개의 band로 나타나는데, 이는 여러 보고자들의 연구내용과 비슷하며 λA band는 core protein으로 추정될 뿐 아직 정확하게 밝혀지지 않은 실정이다.

본 연구에서 미흡하나마 분리주에 대한 성장조사를 하였고 항체와 nitrocellulose membrane을 이용하여 Reo 바이러스 병원성에 영향을 갖는 polypeptide group을 찾기 위한 전단계로서 RNA 및 virus protein 양상조사를 실험하였다.

앞으로 각 혈청형별 RNA 특성조사와 단크론성 항체를 이용한 혈청형별 특이성을 구분하고 이 질병 방제를 위해 바이러스 감염증에 대한 진단과 백신 개발에 적용하는 연구를 계속하여야 할 것으로 생각된다.

## 結 論

닭 Reo 바이러스 감염증을 성공적으로 방제하기 위하여 경기도 일원의 양계농가에서 급성 Reo 바이러스 감염증에 이환된 육계의 장관과 관절로부터 바이러스를 분리하여 그 성상을 시험한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 8예의 육계 가검물중 3예에서 Reo 바이러스가 분리되었다.
2. Reo 바이러스의 증식은 1-2%의 송아지 혈청이 첨가된 HEPES-EMEM(pH 7.0)으로 100TCID<sub>50</sub>/ml 접종시 37℃에서 3일간 배양하는 것이 최적 조건이었다.
3. 50,000배의 전자현미경 조사에서 icosahedral symmetry 구조를 알아볼 수 없었다.
4. 표준주 및 국내분리주는 사람 O형 혈구, 닭 혈구, Guinea pig 혈구에서 혈구응집성이 없었다.
5. 지태아 병원성 시험에서 국내분리주가 표준주보다 더 강하게 나타났으며 분리주간의 교차반응시 공통 항원으로 인정되었다.
6. 닭 Reo 바이러스 RNA를 전기영동하여 band의 이동양상을 조사한 결과 10개의 band로 표준주와 동일 group으로 나타났다.

#### 參考文獻

1. Bains BS, M Mackenzie and PB Spradbrow. 1974. Reovirus associated mortality in broiler chickens. *Avian Dis.* 18: 472-476.
2. Lamont PH. 1966. Some bovine respiratory viruses. *Proc R Soc Med.* 59: 50-51.
3. Lecce JG, MW King and R Mock. 1976. Reoviruses-like agent associated with fetal diarrhea in neonatal pigs. *Am J Immunity.* 14: 816-825.
4. Page RK, OJ Fletcher. 1982. Malabsorption syndrome in broiler chickens. *Avian Dis.* 26: 618-624.
5. Rosen L and Abinant FR. 1960. Natural and experimental infection of cattle with human types of reoviruses. *Am J Hyg* 71: 250-257.
6. Olson NO and DC Shelton. 1957. Infection synovitis control by medication. *Am J Vet Res.* 18: 735-739.
7. Olson NO, Kerr KM. 1964. Control of infectious synovitis. *Avian Dis.* 8: 209-214.
8. Hill JE and GN Rowland. 1989. Comparative microscope lesions in reoviral and Staphylococcal tenosynovitis. *Avian Dis.* 33: 401-410.
9. Kain Tang, OJ Fletcher. 1987. The effect on newborn chicks of oral inoculation of reo virus isolated from chickens with tenosynovitis. *Avian Dis.* 31: 584-590.
10. Dale RK, Hieronymus, Pedro Villegas and SH Kleven. 1982. Characteristics and pathogenicity of two avian reoviruses isolated from chicken with leg problems. *Avian Dis.* 27: 255-260.
11. Jones RC and Kibenge FSB. 1984. Reovirus-induced in chicken the effect of breed. *Avian pathology.* 13: 511-528.
12. Van der Heide, LJ Geissler and ES Bryant. 1974. Infectious tenosynovitis: serologic and histopathologic response after experimental infection with a connecticut isolate. *Avian Dis.* 18: 289-296.
13. Van der Heide, M Kalbac. 1980. Pathogenicity for chickens of a reovirus isolated from turkeys. *Avian Dis.* 24: 989-997.
14. Deshmukh DR and BS Pomeroy. 1968. Avian reoviruses III infectivity and egg transmission. *Avian Dis.* 12: 427-439.
15. Rau WE, van der Heide, M Kalbac. 1980. Onset of progeny immunity against viral arthritis tenosynovitis after experimental vaccination of parent breeder chickens. *Avian Dis.* 24: 648-657.
16. Olson NO and MA Khan. 1972. The effect of intranasal exposure of chickens to the Fahey-Crawley virus on the development

- of synovial lesions. *Avian Dis.* 16 : 1073-1078.
17. Olson NO. 1959. Transmissible synovitis in poultry. *Lab Invest.* 8 : 1384-1393.
  18. Menendez NA and BW Calnek and BS Cowen. 1975. Localization of avian reovirus(FDO isolant) in tissues of mature chickens. *Avian Dis.* 19 : 112-117.
  19. Dalton PJ and Henry. 1967. Tenosynovitis in poultry. *Vet Res.* 80 : 638-645.
  20. Olson NO and DP Solomon. 1968. A natural outbreak of synovitis caused by the viral arthritis agent. *Avian Dis.* 12 : 311-316.
  21. Krasselt M and EJ Voute. 1969. Synovitis in broiler parent chicken. *Diergeneesk.* 94 : 601-607.
  22. Johnson DC and L van der Heide. 1971. Incidence of tenosynovitis in maine broilers. *Avian Dis.* 15 : 829-834.
  23. Kawamura H and Tsubahara H. 1966. Common antigenicity of avian reoviruses. *Natl Anim Health Q.* 6 : 187-193.
  24. Diana D. Huang, Mark A. 1987. Association of avian reovirus M and S gene with viral behavior in vivo. *Avian Dis.* 31 : 446-454.
  25. Liliana B. 1990. A western blot to detect antibody to avian reo-virus. *Avian pathology.* 19 : 477-487.
  26. Robertson MD and GE Wilcox. 1986. Avian reovirus. *Vet Bull.* 56 : 154-174.
  27. Spandidos DA and AF Graham. 1976. Physical and chemical characterisation on avian reovirus. *J Virol.* 19 : 968-976.
  28. Tabase K and M Nonaka. Yamanoto. 1987. Serologic and pathogenetic studies of avian reoviruses isolated in Japan. *Avian Dis.* 30 : 6464-469.
  29. Wood GW and RA Nicholas. 1980. Serological comparisons of avian reoviruses. *Avian pathology* 1980 : 29-38.
  30. David P, Anderson. 1969. Reovirus isolated from turkeys with blue-comb. *Am J Vet Res.* 1035-1043.
  31. Spencer JL and BW Calnek. 1970. Application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody. *Am J Vet Res.* 31 : 345-358.
  32. Schwartz LD and RF Gentry, H Rothen Bacher. 1976. Infectious tenosynovitis in commercial white leghorn chickens. *Avian Dis.* 20 : 769-773.
  33. Island MR and RC Jones. 1988. ELISA for measuring antibody titer against avian reovirus using a single dilution of serum. *Avian pathology.* 12 : 411-425.
  34. Haspel MV, Onodera T. Prabhaker BS 1983. Virus-induced auto immunity : monoclonal antibodies that reaction with endocrine tissue. *Science.* 220 : 304-306.
  35. Kazuaki Takehara, Yoshihiko Kimura. 1987. Preparation and characteration of monoclonal antibodies against on avian reovirus. *Avian Dis.* 31 : 730-734.
  36. 김재학. 1990. 닭 Reovirus 국내 분리주의 백신개발에 관한 연구. 농촌진흥청 시험연구 보고서.
  37. Jones RC. 1976. Reoviruses from chickens with hydropericardium, *Vet Res.* 99 : 458-462.
  38. Gershowitz A. and Wooley RE. 1973. Characterization of two reovirus isolated turkeys with infectious enteritis. *Avian Dis.* 17 : 406-414.
  39. Borsa J, Sargent MD, Lievaart PA. 1981. Reovirus : evidence for a second step in the intracellular uncoating and transcri-

- ptase activation process. *Virology*, 111 : 191–200.
40. Cashdollar LW, Blairp, Van Dynes. 1989. Identification of the virus protein in reovirus serotype 2–infected cells with antibody prepared against a bacterial fusion protein. *Virology*. 168 : 183–186.
41. Paul RW, Lee PWK. 1987. Glycophorin is the reovirus receptor on human erythrocytes. *Virology*. 159 : 94–101.
42. Hartley JW, Rowe WP, Austin JB. 1962. Subtype differentiation of reovirus type 2 strains by hemagglutination-inhibition with mouse antisera. *Virology*. 96 : 94–96.
43. Brubaker MM, West B, Ellis RJ. 1964. Human blood group influence on reovirus hemagglutination titers. *Exp Biol Med*. 115 : 1118–1124.
44. Gentsch JR, Pacitti AF. 1987. Differential interaction of reovirus type 3 with sialylated receptor component on animal cells. *Virology*. 161 : 245–248.
45. Rubin DH, Fields BN. 1980. Molecular basis of reovirus virulence role of the M<sub>2</sub> gene. *Exp J Med*. 152 : 853–868.