"Physico-Chemical and Biological Studies on Respiratory Syncytial Virus"

Hanaa Abd El-Aziz Moustafa El-Mokamer

Cairo University, Egypt, Faculty of Veterinary Medicine, Ph.D. Thesis, Virology, 2006

Supervisors:

Prof. Dr. Ismail Mohamed Reda,

Prof. Dr. Mohamed Sami Saber,

Prof. Dr. Elham A. El-Ebiary

Abstract

This study revealed that MDBK cell line gave a higher titer of the virus than HEP–2, Vero and BHK_{21} cell lines, so MDBK is the best cell line which can be used to propagate and study of some biological properties of BRSV and ORSV. The best time of harvestation of total yield virus for both viruses was found to be 126 hours post infection. Both viruses were thermolabile and sensitive to Freezing and thawing cycles over 2 cycles. BRSV and ORSV are acid labile as their infectivity titre were dramatically affected by exposure to PH of 3 but maintained above PH of 4. Complete virus inactivation was occurred at 7 and 6 hours for BRSV and ORSV respectively using BEI at 37°C. Skimmed milk was found to be the best stabilizer used in virus hyopholization for each virus. The application of polyclonal antiserum in the immunological reactivities with viral poly peptides in the western blot is not the ideal method to catch a significant difference between both bovine and ovine RSV.

دراسات فيزيائية كيميائية وحيوية على فيروس الخلايا التنفسية العملاقة

الاســـم : هناء عبدالعزيز مصطفى المقمر
جامعة القاهرة ، كلية الطب البيطرى ، دكتوراه (فيرولوجيا) ٢٠٠٦
المشرفـــون: أ.د/اسماعيل محمد رضا
أ.د/ محمد سامى صابر
أ.د/ إلهام عطا الإبيارى

المستخلص

صممت الدراسة الحالية لتشمل بعض الخواص الفيزوكيميائية لفيروس الخلايا التنفسية العملاقة فى كل من الأغنام والأبقار وذلك من خلال تمرير كل من الفيروسين على بعض المزارع النسيجية مثل الخلايا المستمرة للكلى البقرى (MDBK) وكلى القرد الأخضر الأفريقى (Vero) وكلى رضيع اليرجوع السورى الذهبى (BHK_{21}) وخلايا طبقة الإبيدرمس البشرية (HEP-2) وقد أوضحت النتائج العملية ما يأتى: ـ

- تعتبر خلايا كلى البقرى المستمر هى أنسب أنواع المزارع النسيجية لأقلمة واكثار الفيروسين معطية أعلى المعايير (٧ لو.١) جرعة نصف معدية للزرع النسيجى / مللى لفيروس الخلايا التنفسية العملاقة البقرى و (٦ لو.١) جرعة نصف معدية للزرع النسيجى/ مللى لفيروس الخلايا التنفسية العملاقة للأغنام بعد التمريرة الخامسة.
- أوضحت دراسة منحنى نمو الفيروسين فى خلايا الكلى البقرى المستمرة أن أعلى معيار لفيروس المنتسب للخلايا بعد مرور ١٠٢ ساعة من الحقن بينما كان أعلى معيار للفيروس خارج الخلايا بعد مرور ١٢٢ ساعة من الحقن وكان معيار الفيروس الكلى بعد مرور ١٢٦ ساعة من الحقن.
- أما بالنسبة للخواص الفيزيائية لكلا الفيروسين فقد بينت دراسة تأثير اختلاف درجات الحرارة أن معيار فيروس الخلايا التنفسية العملاقة لكل من الأبقار والأغنام يصل إلى حد الإضمحلال عند ٦٠°م لمدة ٢٠ دقيقة بينما عند ٥٦°م يضمحل معيار الفيروس تماما بعد ٢٥ دقيقة للفيروس البقرى و ٢٠ دقيقة للفيروس فى الأغنام.
- وجد أن فترة نصف العمر لكلا الفيروسين يتراوح بين ٣ و ٧ ساعات عند ٣٧ °م ويصل معيار الفيروسين الى مستوى الصفر بعد مرور ٣٠ ساعة عند ٢٥°م.
- كانت فترة نصف العمر لكلا الفيروسين ما بين ٢٤ – ٤٨ ساعة أثناء حفظه عند ٤°م.
- وبحفظ الفيروسين عند – ٢٠°م يقل معيارها بمعدل من ٠,٢ الى ٠,٨ لو.١ جرعة نصف معدية للزرع النسيجى/مللى كل أسبوع.
- ويتأثر معيار كل منهما الى حد التلاشى بعد٩ دورات فى الفيروس البقرى و ١٠ دورات فى مثيله فى الأغنام.
- لوحظ أن معيار الفيروس يتأثر بشدة عند التعرض لدرجة تركيز هيدروجينى ٣ ولا يتأثر بدرجة ملحوظة عند تركيز هيدروجينى فوق ٤.
- وبتثبيط الفيروسين باستخدام مادة البنرى ايثيلينامين وجد أن التثبيط الكامل يحدث بعد ٧ و ٦ ساعات للفيروس البقرى ولمثيله فى الأغنام على التوالى.
- وجد أن اللبن منزوع الدسم ، هو أفضل هذه المثبتات لكلا الفيروسين بعد التجفيد.
- بيّن الفصل الكهربى لبروتينات الفيروسين (electrophoresis) أنه يمكن تحديدها عند وزن جزيئى مقابل للمواقع F_2, M, N, F_1, G, L وهى ٢١٧,٢ ، ٧٨,٢ ، ٥٣,٦ ، ٤٤,٧ ، ٣٦,٣ ، ١٩,٢ كيلو دالتون على التوالى
- ظهرت حزمة البروتين P فقط فى الفيروس البقرى عند وزن جزيئى ٤٤,٢ كيلو دالتون.
- عند لطع بروتينات الفيروسين من ورق السليلوز أظهرت تفاعلات أمصال الأرانب المضادة لفيروس الأبقار فى اللطع الغربية (Western Blot) تفاعلات إيجابية مع بروتينات الفيروس N, F_1, G لكلا الفيروسين مع تفاعل إيجابى وحيد مع البروتين M فى الفيروس البقرى.
- بينما أظهر مصل الأرانب المضاد لفيروس الأغنام نتائج إيجابية مع بروتينات الفيروسات N, F_1, G عند وزن جزيئى ٧٤,٤ ، ٥٤,٣ ، ٥١,٤ كيلو دالتون على التوالى لكلا الفيروسين.
- أعطى كل من مصلى الأرانب حزم غير نوعية عندما عولجا بمحلل الخلايا للتأكد من التفاعلات النوعية مع بروتينات الفيروسات N, F_1, G.
- فشلت الأجسام المناعية الكلية فى أن تعطى خط تفريقى واضح بين الفيروسين عند مستويات فصل بروتينات الفيروسات المختلفة وعلى ذلك فقد أجرى اختبار المصل المتعادل نوعياً وتبادلياً على الفيروسين حيث أظهرت النتائج معايير عالية عند استخدام الأمصال النوعية ومعايير أعلى عند استخدام الأمصال المغايرة.

List of Contents

		Page
1. INTRODUCTION	.....	1
2. REVIEW OF LITERATURE	.....	4
2.1. History and Distribution	.....	4
2.2. Epidemiology	.....	10
2.3. Aetiological agent of the disease	.....	16
2.4. Antigenic variation	.....	33
2.5. Immunity	.....	38
2.6. Viral Pathogenesis	.....	49
2.7. laboratory diagnosis	.....	59
2.8. Vaccination	.....	68
3. MATERIAL AND METHODS	.....	74
3.1. Materials	.....	74
3.1.1. Virus strain	.....	74
3.1.2. Cell cultures	.....	74
3.1.3. Rabbits	.....	74
3.1.4. Hyperimmune sera	.....	75
3.1.5. Anti-rabbit horse peroxidase conjugate	.....	75
3.1.6. Minimum essential media	.....	75
3.1.7. Buffers and solutions	.....	75
3.1.8. Chemicals used in virus inactivcation	.....	80
3.1.9. Stabilizers	.....	81

Page

3.1.10. Buffers and chemicals used in virus purification 81
3.1.11. Adjuvant 82
3.1.12. Buffers and siolutions used for SDS-PAGE 82
3.1.13. Buffers and reagents used for Western immune blotting 87
3.2. Methods 89
3.2.1. Virus propagation 89
3.2.2. Virus titration infectivity test 89
3.2.3. Susceptibility of different cell lines to local strains of BRSV and ORSV 90
3.2.4. Growth kinetics of local of strains of BRSV and ORSV in MBDK cell line 90
3.2.5. Effect of temperature on the stability of the local isolates of BRSV and ORSV 91
3.2.6. Effect of different pH values on the stability of isolated BRS and ORS viruses 92
3.2.7. Effect of lyophilization with and without stabilizer on the stability of isolated BRS and ORS viruses 93
3.2.8. Effect of binary ethyleneimine (BEI) on the stability of local isolated BRS and ORS viruses 94
3.2.9. Virus purification 94
3.2.10. Estimation of viral protein 95
3.2.11. SDS-PAGE of local strains of BRSV and ORSV 95
3.2.12. Preparation of hyperimmune sera 97
3.2.13. Adsorption of non-specific antibody against protein from hyperimmune sera 98

		Page
3.2.14. Check board ELISA	.....	98
3.2.15. Western blotting analysis	.....	99
3.2.16. Cross neutralization between bovine and ovine RSV using hetergenous and homologous hyperimmune sera	.....	101
4. RESULTS.	.....	103
5. DISCUSSION.	.....	145
6. SUMMARY.	.....	157
7. REFERENCES.	.....	160
ARABIC SUMMARY.		

List of Abbreviation

BHV	:	*Bovine herpes virus*
BRSV	:	*Bovine respiratory syncytial virus*
BVD	:	*Bovine viral diarrhea*
CMI	:	*Cell mediated immunity*
CRSV	:	*Caprine respiratory syncytial virus*
DPI	:	*Day post inoculation*
DW	:	*Distilled Water*
ELISA	:	*Enzyme linked immunosorbent assay*
FI-RSV	:	*Formalin inactivated respiratory syncytial virus*
HRSV	:	*Human respiratory syncytial virus*
IBR	:	*Infectious bovine rhinotracheitis*
IF	:	*Immuno fluorescence*
IFN	:	*Interferon*
IgA	:	*Immunoglobulin A*
IgG	:	*Immunoglobulin G*
IgM	:	*Immunoglobulin M*
IV	:	*Inactivated vaccine*
LMI	:	*Leukocyte migration inhibition test*
LT	:	*Lymphocyte transformation*
MAbs	:	*Monoclonal antibodies*
MDBK	:	*Madin darby bovine kidney cell*
MHC	:	*Major histocompatibility*
MLV	:	*Modified live vaccine*
Mol. W.	:	*Molecular Weight*
ORSV	:	*Ovine respiratory syncytial virus*
PC	:	*Post challenge*
PCR	:	*Polymerase chain reaction*
PFV	:	*Plaque forming unit*
PHA	:	*Phytohaemagglutinin*
PI	:	*Post infection*
PI-3	:	*Para ifluenza-3*
PMNC	:	*Peripheral blood mono-nulclear cells*
SDS-PAGE	:	*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*
SNT	:	*Serum neutralization test*