# ABSTRACT

**Name** : **Mohamed Mahmoud Mohamed Youssef.**
**Nationality** : Egyptian.
**Religion** : Moslem.
**Date of birth** : 29/4/1976.
**Place of birth** : Menia.
**Position** : Researcher Assistant in (CLEVB).
**Telephone No.** : 010-1267888
**Email** : youssef0101267888@yahoo.com
**Degree** : PhD.
**Specialty** : Virology.

**Supervisors** :

- **Prof. Dr. Mohamed Abd El-Hamid Shalaby**
  Professor of Virology., Fac.Vet. Med. Cairo University.
- **Prof. Dr. Hussein Aly Hussein**
  Professor and chairman of Virology Dept.., Fac.Vet. Med. Cairo University.
- **Dr. Elham Atta El-Ebiary**
  Director of Central Laboratory for Evaluation of Veterinary Biologics [CLEVB].

# ABSTRACT

**Chicken rotaviruses (CRVs) were detected for the first time in Egypt. Isolation, identification and molecular characterization of chicken rotaviruses were performed in our current studies. We collect and screened fecal samples from 85 naturally occurring diarrhea outbreaks in commercial chicken broilers farms that located in a wide range of geographical area distribution including many Egyptian governorates mainly (6th October, El Fayom, Giza, Kaleobea, Menofia and El Mansoura) during 2008. Chicken RV was detected in the fecal samples by performing different laboratory and confirmatory tests including ELISA using monoclonal antibodies against VP6 , Electron Microscopy (EM), Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Isolation in SPF chickens. The obtained results confirmed the isolation and identification of group A chicken rotavirus while the molecular characterization analysis using different primers sets proved that the isolated chicken rotavirus not belongs to the same cluster of Ch1 rotavirus strain, more related to Po-13 strain and confirm that it belongs to mammalian like chicken rotavirus strains. The results also show that in the assessed broiler chicken flocks, chicken RVs was directly related to diarrhea observed in broiler chickens up to a month old. As no studies have been published yet related to chicken rotaviruses in Egyptian poultry. This study is considered as the first record study not only succeeded to isolate avian rotavirus for first time in Egypt but also discuss the importance of rotaviruses in broiler chickens with delayed growth and diarrhea.**

# المستخلص العربي


الاسم : **محمد محمود محمد يوسف**
الجنسية : مصري
الديانة : مسلم
تاريخ الميلاد : 29/4/1976
محل الميلاد : المنيا
الوظيفة : باحث مساعد (المعمل المركزي للرقابة على المستحضرات الحيوية البيطرية)
رقم الهاتف : 0101267888
البريد الألكترونى : youssef0101267888@yahoo.com
الدرجة : دكتوراة
التخصص : فيروسات

الأساتذة المشرفون :
الأستاذ الدكتور : **محمد عبد الحميد شلبى**
أستاذ الفيروسات بكلية الطب البيطري جامعة القاهرة
الأستاذ الدكتور : **حسين على حسين**
أستاذ ورئيس قسم الفيروسات بكلية الطب البيطري جامعة القاهرة
الدكتورة : **الهام عطا الابيارى**
مدير المعمل المركزي للرقابة على المستحضرات الحيوية البيطرية


# المستخلص العربي


تناولت هذه الرسالة دراسات عن عزل وتصنيف فيروس الروتا من دجاج التسمين لأول مرة فى مصر. فقد تم الفحص المعملى لعدد 85 عينة حقلية تم جمعها من عدة محافظات من محافظات جمهورية مصر العربية ممثلة لمناطق جغرافية مختلفة وهى محافظة الجيزة ومحافظة الفيوم ومحافظة 6 اكتوبر ومحافظة القليوبية ومحافظة المنوفية والمنصورة وذلك من مزارع دجاج التسمين التى تعانى من مشاكل الأسهال والجفاف وزيادة أستهلاك العلف بدون تكوين اوزان حقيقية من اللحم فى جسم الطائرعلاوة على ارتفاع نسبة النفوق وانتشار معدلات الأصابة بين القطعان المصابة بشكل وبائى فى بعض الأحيان. وشملت العينات اعمار من 1 أسبوع حتى 6 أسابيع مكثفة الفحص خلال المرحلة العمرية بين 3- 4 أسابيع والتى تعتبر الأكثر خطورة لهذا المرض تحت الظروف الحقلية. بداية تم اجراء أختبارات الأليزا لرصد الفيروس فى هذة العينات بأستخدام الأجسام المناعية وحيدة الفسيلة وتم تحديد نسبة انتشار المرض فى المحافظات تحت الدراسة بنسبة 15.2% بتركيز أكبر فى القليوبية والمنصورة. ثم تم عزل الحامض النووى للعينات الأيجابية وعمل اختبارات الحامض النووى المتسلسل العكسى لتأكيد الأصابة بفيروس الروتا وتم أيضا التعرف على فيروسات الروتا بأستخدام الفحص المباشر بالميكروسكوب الأكترونى وتاكيد الأصابة بها لأول مرة فى مصر فى جنس الطيور. ثم تم عزل هذة الفيروسات فى مجموعات مختلفة الأعمار من كتاكيت التجارب الخالية من المسببات المرضية وذلك لتاكيد التشخيص المعملى ودراسة الأعراض المرضية لهذة الفيروسات على الطيور وأجراء دراسات التصنيف الجزيئى للسلالة المعزولة فى مصر. ثم تم أعادة اجراء فحوصات الميكرسكوب الأليكترونى لفيروسات الروتا المعزولة من كتاكيت التجارب الخالية من المسببات المرضية لتأكيد عملية العزل وأعتمادها. وللقيام بتصنيف معزولات فيروس الروتا الخاص بالدجاج فقد تم أستخلاص الجين الخاص بالبروتين الفيروسى رقم 6 وأجراء تحاليل اختبارات الحامض النووى المتسلسل العكسى عليه بأستخدام مجموعات مختلفة من البريمرز المتخصصة وكانت نتيجة التصنيف ان فيروس الروتا المعزول من الدواجن لأول مرة فى مصر ينتمى الى المجموعة A وتحديدا الى نوع معزولات الروتا الشبيهة بتلك التى تصيب الثدييات ويتقارب مع معزولات الروتا المعزولة من الحمام ولا ينتمى لفرع معزولات الروتا ذات النوع رقم واحد الخاصة بالدجاج. هذا وتوصى الرسالة بأجراء المزيد من الدراسات الحقلية لتوضيح الصورة الكلية لتفشى وخطورة هذا النوع من الفيروسات وخسائرة الأقتصادية على صناعة الدواجن فى مصر. كما توصى الدراسة بضرورة أجراء محاولات تحضير وانتاج لقاح الروتا من هذة العترة المصرية المعزولة وذلك للوقاية من الخسائر الأقتصادية فى دجاج التسمين الناتجة عن الأصابة بفيروسات الروتا وحمايتة من الأصابة بالأسهال والجفاف الذى يؤدى الى ضعف الطائر ونفوقة. وأجمالا تعتبر هذة الدراسة هى الدراسة الأولى من نوعها فى مصر والتى تقوم بعزل وتصنيف فيروس الروتا من الطيور مسجلة السبق والريادة فى هذا المجال.

# List of Contents

**1. Introduction ……. 1**

**2. Review of literature ……. 4**

2.1. History of avian rotavirus…… 4

2.2. History of avian rotavirus in Egypt ……..…….. 8

2.3. Rotavirus morphology …… 9

2.4. Rotavirus chemical composition ……..…….. 12

2.5. Rotavirus susceptibility to chemical and physical agents ……..……. 14

2.6. Rotavirus classification ……...…… 14

2.7. Rotavirus taxonomy .....……. 18

2.8. Rotavirus antigencity ……..…… 19

2.9. Rotavirus genome structure and genetics ….……..…….…… 24

2.10. Rotavirus protein structure and function ……...…….. 27

2.10.1. Core proteins ……...…….…….. 27

2.10.1.1. VP1 protein …….…….…….. 27

2.10.1.2. VP2 protein …….……... 29

2.10.1.3. VP3 protein ……..…… 29

2.10.2. Inner capsid protein ……..…… 30

2.10.2.1. VP6 protein ……..…….. 30

2.10.3. Outer capsid proteins …….…… 35

2.10.3.1. VP7 protein ……..…….. 35

2.10.3.2. VP4 protein ……..…….. 37

2.11. Rotavirus non-structural proteins ……..…….. 39

2.11.1. NSP1 protein ……..…….…….. 39

2.11.2. NSP2 protein ……..…….…….. 40

2.11.3. NSP3 protein ……..…….…….. 40

2.11.4. NSP4 protein ……..…….…….. 41

2.11.5. NSP5 protein ……..…….…….. 42

2.11.6. NSP6 protein ……..…….…….. 43
2.12. Laboratory Host Systems ……. 43
2.13. Pathogenicity ……..…….. 45
2.14. Pathobiology and Epizootiology .....…..... 45
2.14.1. Incidence and Distribution ……...……. 45
2.14.2. Natural and Experimental Hosts …….…….. 47
2.14.3. Transmission, Carriers, and Vectors ……..…..….. 47
2.14.4. Incubation Period, Clinical Signs, Morbidity, and Mortality ……. 48
2.15. Diagnosis of Avian rotavirus ……...…….…. 50
2.15.1. Isolation and Identification of Avian rotavirus …….…… 50
2.15.2. Isolation of rotavirus in SPF chicks …….……...……... 52
2.15.3. Electron microscope detection EM .....……..... 53
2.15.4. Serology of Avian rotavirus...……..... 56
2.15.4.1. Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay ELISA ……...….. 57
2.16. Differential Diagnosis …… 59
2.17. Genetic Characterization of rotavirus …….…….. 59
2.17.1. Polymerase chain reaction PCR ……...…….. 59
**3. Material and Methods ……..……..…….. 61**
3.1. Samples collection ……...…….…… 61
3.2. Samples preparation ……. 65
3.3. Specific pathogen free (SPF) chicks …….……... 65
3.4. Double-sandwich ELISA, using monoclonal antibodies
For detection of chicken rotavirus…….…….. 66
3.5. Isolation of chicken rotavirus in the multiage SPF chicks …..…….. 69
3.6. Electron Microscopy (EM) ……..… 70
3.7. Extraction of the dsRNA of chicken rotaviruses …….…..… 70
3.8. RT-PCR amplification of chicken rotavirus VP6 and VP7 genes...…. 72
3.9. Electrophoresis of PCR products…….……...…….…... 75

**4. Results ……..……... 77**

**5. Discussion ……..…….. 87**

**6. Summary ……..……. 101**

**7. Reference ……...…… 103**

**8. Arabic summary ……... 131**

**9. Arabic abstract**

# List Of Abbreviation

| | |
|---|---|
| AvRV | Avian rotavirus |
| CLEVB | Central laboratory for evaluation of veterinary biologics |
| CRV | Chicken Rotavirus |
| CRVs | Chicken Rotaviruses |
| ds | Days |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay |
| EM | Electron Microscopy |
| FA | Fluorescent antibodies |
| gpA RV | Group A rotavirus |
| MDA | Maternally derived antibodies |
| Mab | Monoclonal antibody |
| Mabs | Monoclonal antibodies |
| nm | Nanometer |
| NSP1 | Non structure protein 1 |
| NSP2 | Non structure protein 2 |
| NSP3 | Non structure protein 3 |
| NSP4 | Non structure protein 4 |
| NSP5 | Non structure protein 5 |
| NSP6 | Non structure protein 6 |
| ORF | Open reading frame |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PI | Post-infection |
| RT-PCR | Reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| RV | Rotavirus |
| RVs | Rotaviruses |
| SPF | Specific pathogen free |
| VP1 | Viral protein 1 |
| VP2 | Viral protein 2 |
| VP3 | Viral protein 3 |
| VP6 | Viral protein 6 (Nucleoprotein, Nucleocapsid and Inner Capsid) |
| VP4 | Viral protein 4 |
| VP7 | Viral protein 7 |