### ABSTRACT

Name : Mohamed Mahmoud Mohamed Youssef.

Nationality : Egyptian.

Religion : Moslem.

Date of birth : 29/4/1976.

Place of birth : Minia.

Position : Assistant Researcher in (CLEVB).

Telephone No.: 010/1267888-02/4849204

Degree : M.V.Sc. Specialty : Virology.

Supervisors :

Prof. Dr. Mohamed Abd El-Hamid Shalaby
 Professor and chairman of Virology Dept., Fac.Vet. Med. Cairo University.

Dr. Hussein Aly Hussein
 Assistant Professor Of Virology, Fac. Vet. Med. Cairo University.

Dr. Elham Atta El-Ebiary
 Director of Central Laboratory For Evaluation of Veterinary Biologics [CLEVB].

#### ABSTRACT

In the present study, the pathogenicity, shedding and safety of CAV vaccine were studied in one-day-old SPF chicks. Hematocrit values, Histopathological changes in haemopioetic and lymphoid organs, ELISA and PCR were used as testing parameters for the vaccine. Vaccinated chicks showed signs of anemia, lower hematocrit values different grades of histopathological lesions in liver, spleen and thymus. Variable degrees of seroconversion rate were observed along the 10 weeks of the experiment indicating 2 waves of immune response in vaccinated chicks compared to control nonvaccinated group. Tracing of CAV DNA genome in liver of vaccinated chicks indicated the presence of the virus in some weeks and absence in others. There was a Consistent correlation between the 4 parameters used in pathogenicity studies. To test the shedding activity of the vaccine, test-chicks were used by housing with the vaccinated one for 1 week and subjected to the above 4 parameters. Results indicated that the vaccine have shedding ability along the 8 weeks of the experiment as detected by histopathology, ELISA and PCR. It should noted that control group acquired the nature infection of CAV between 8 and 10 weeks of age. Safety studies on CAV live attenuated vaccine indicated adverse effect of the vaccine on the lymphoid organs in all doses of the vaccine (1,2 and 10 doses). The present study proposed the use of PCR and histopathology in the vaccine testing protocol of CAV.

تاريخ الميلاد : ۲۹/٤/۱۹۲۲

محل الميلاد : المنيا

الوظيفة : مساعد باحث (المعمل المركزي للرقابة على المستحضرات الحيوية البيطرية)

رقم الهاتف : ۲٤٨٤٩٢٠٤-١٠١٢٦٧٨٨٨ .

الدرجة : ماجستير التخصص : فيروسات

الأساتذة المشرفون :

الأستاذ الدكتور: محمد عبد الحميد شلبي

أستاذ ورئيس قسم الفيروسات كلية الطب البيطري جامعة القاهرة

الدكتور : حسين على حسين

أستاذ مساعد بكلية الطب البيطري جامعة القاهرة

الدكتورة : الهام عطا الابيارى

مدير المعمل المركزي للرقابة على المستحضرات الحيوية البيطرية

#### المستخلص العربي

تناولت هذه الرسالة ثلاث در اسات على لقاح أنيميا الدواجن المستضعف الذي تم أدخالة حديثا للبلاد اشتملت على دراسة التغيرات المرضية في أنسجة الكتاكيت المحصنة و مدى الانتشار و الأمان للقاح. تم استخدام كتاكيت عمر يوم واحد خالية من المسببات المرضية في الدراسات الثلاثة. و تم دراسة أربعة اختبارات لكل دراسة على حدة تشمل قيم الهيماتوكريت و التغيرات الهستوباتولوجية في الأعضاء الليمفاوية و الأعضاء المسنولة عن تخزين و توليد خلايا الدم (الهيموبيوتك) و اختبار الأليزا للكشف عن الأجسام المناعية الناجمة عن التحصين واخيرا اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR ) للكشف عن وجود الحامض النووى للعترة المستضعفة للقاح. أثبتت النتائج وجود بعض أعراض الأنيميا في الكتاكيت المحقونة باللقاح مع انخفاض قيم الهيماتوكريت ووجود درجات متفاوتة من التغيرات الهستوبا أولوجية في الكبد و الطحال و الغدة التيموسية .و خلال العشرة أسابيع من عمر الدراسة و بتحليل نتائج الأليزا تم عمل منحني الاستجابة المناعية للقاح و مقارنته بالكتاكيت الغير محصنة ثم باستخدام (PCR) تم الكشف عن وجود الحامض النووي في كبد الكتاكيت المحقونة باللقاح على مدى العشرة أسابيع . و في در اسة الانتشار للقاح المختبر أظهرت النتائج أن الفيروس له القدرة على الانتشار خلال الثماتي أسابيع من عمر التجربة كما يجب الإشارة إلى أن جميع الكتاكيت المحصنة و الغير محصنة قد أخذت العدوى الطبيعية للفيروس بين الأسبوع الثامن و العاشر من العمر أما عن دراسة الأمان بالنسبة للقاح فقد أظهرت النتائج بعض الأثار الجانبية في الأعضاء الليمفاوية للكتاكيت المحصنة سواء كانت بجرعة واحدة أو جرعتين أو عشرة جرعات. وتوصى الرسالة باستخدام اختبارات الهستوباثولوجي و أل (PCR ) في بروتوكو لات تقييم لقاح أنيميا الدواجن في الجهات الحكومية المعنية.

# **List Of Contents**

1-Introduction	
2-Review of literature	4
2.1. History of chicken infectious anemia virus	
2.2. History in Egypt	
2.3. Prevalence of chicken anemia virus	15
2.4. Virus morphology	
2.5.Physicochemical properties	
2.5.1.Buoyant density	
2.5.2.Stability of the virus	
2.6.Capsids and genome	
2.6.1.Virus DNA	
2.6.1.1.Transfection of CAV DNA	
2.6.2.CAV proteins	
2.7. Classification	
2.8.Pathogenicity and pathogenesis	
2.9.Apoptosis	
2.10.Immunosuppression of CAV	
2.11. Risk of CAV	
2.12.CAV and interaction with other viruses	
2.13.Immunity and vaccines	
2.14.Laboratory diagnosis	
2.14.1.Isolation of the virus	83
2.14.1.1. Isolation and propagation of the chicken infectious	
anemia virus in susceptible chicks	86
2.14.1.2. Isolation and propagation of the chicken infectious	
anemia virus in tissue culture	89
2.14.1.3. Isolation and propagation of the chicken infectious	
anemia virus in both tissue culture and susceptible chicks	
2.14.2.Histopathology of the chicken infectious anemia Virus-	94
2.14.3.hematocrite Values (PCV) of the chicken	
infectious anemia Virus	95
2.14.4. Identification of the chicken infectious	
anemia antigen by serological techniques	99
2.14.4.1.Identification of the chicken infectious	
anemia antigen using neutralization tests (NT)	100
2.14.4.2. Identification of the chicken infectious	
anemia antigen using Enzyme linked	
immunosorbent assay (ELISA)	101
2.14.4.3. Identification of the chicken infectious	
anemia antigen using immunofluorescence	

technique (IFT)	
2.14.5. Detection of the viral nucleic acid by	107
molecular based techniques	10/
2.14.5.1.Identification of the chicken infectious	113
dilellia antigen	
2.14.5.2.Identification of the chicken infectious	113
anemia antigen using mala	
anemia antigen using molecular hybridization  2.14.6.Monoclonal antibodies	120
2.14.6.1. Production of monagles at the state of the stat	125
the chicken infectious anamis antibodies against	
2.14.6.2.Identification of the chicken infectious	125
antigett using monoclonal antib - 1:	
3.Materials and Methods	127
3.2. Specific pathogen free (SPF) chicks	129
3.3. Pathogenicity studies on vaccinal strain of CAV	129
3.3.1. Experimental design of Pathogenicity experiment	129
3.3.2 Determination of Hamatocrit (DCV)	129
3.3.2. Determination of Hematocrit (PCV) values	130
3.3.3. Histopathology examination for CAV lesions	130
3.3.4.ELISA for determination of anti-CAV antibodies	
3.3.5.PCR assay for detection of the CAV DNA genome	
3.3.5.1.Extraction of genome DNA 3.3.5.2.PCR	
3.4. Shedding studies on vaccinal strain of CAV	
3.4.1.Experimental design of shedding experiment	
3.5.Safety studies on vaccinal strain of CAV	
3.5.1.Experimental design of safety experiment	
4.Results	
4.1.Pathogenicity studies on vaccinal strain of CAV	
4.1.1.Hematocrit (PCV) values	
4.1.2. Histopathology examination	
4.1.3. Humoral immune response to vaccinal strain of CAV	
4.1.4. Results of detection of CAV DNA genome by PC R	
4.1.5. Summary of the results of Pathogenicity study	
4.2. Shedding studies on vaccinal strain of CAV	
4.2.1. Hematocrit (PCV) values	
4.2.2.Histopathology examination	
4.2.3. Humoral immune response to vaccinal strain of CAV	
4.2.4.Results of detection of CAV DNA genome by PCR	178
4.3. Safety studies on vaccinal strain of CAV	182
4.3.1. Hematocrit (PCV) values	182
4.3.2.Histopathology examination	187

technique (IFT)	107
2.14.5. Detection of the viral nucleic acid by	
molecular based techniques	113
2.14.5.1.Identification of the chicken infectious	
anemia antigen using polymerase chain	
reaction (PCR)	113
2.14.5.2.Identification of the chicken infectious	
anemia antigen using molecular hybridization	
2.14.6.Monoclonal antibodies	125
2.14.6.1. Production of monoclonal antibodies against	
the chicken infectious anemia antigen	125
2.14.6.2.Identification of the chicken infectious	
anemia antigen using monoclonal antibodies	127
3.Materials and Methods	129
3.1.CAV Vaccine	129
3.2. Specific pathogen free (SPF) chicks	129
3.3. Pathogenicity studies on vaccinal strain of CAV	
3.3.1. Experimental design of Pathogenicity experiment	129
3.3.2. Determination of Hematocrit (PCV) values	
3.3.3. Histopathology examination for CAV lesions	130
3.3.4.ELISA for determination of anti-CAV antibodies	132
3.3.5.PCR assay for detection of the CAV DNA genome	135
3.3.5.1.Extraction of genome DNA	135
3.3.5.2.PCR	
3.4. Shedding studies on vaccinal strain of CAV	140
3.4.1.Experimental design of shedding experiment	140
3.5. Safety studies on vaccinal strain of CAV	140
3.5.1.Experimental design of safety experiment	140
4.Results	
4.1.Pathogenicity studies on vaccinal strain of CAV	
4.1.1.Hematocrit (PCV) values	
4.1.2. Histopathology examination	
4.1.3. Humoral immune response to vaccinal strain of CAV	
4.1.4. Results of detection of CAV DNA genome by PC R -	164
4.1.5. Summary of the results of Pathogenicity study	
4.2. Shedding studies on vaccinal strain of CAV	
4.2.1. Hematocrit (PCV) values	
4.2.2. Histopathology examination	
4.2.3. Humoral immune response to vaccinal strain of CAV-	
4.2.4.Results of detection of CAV DNA genome by PCR	
4.3. Safety studies on vaccinal strain of CAV	
4.3.1. Hematocrit (PCV) values	
4.3.2. Histopathology examination	187

4.3.3. Humoral immune response to vacci	nal strain of CAV192
4.3.4.Results of detection of CAV DNA	genome by PCR196
5. Discussion	200
6. Summary	210
7. References	212
8. Arabic summary	
9. Arabic abstract	

## List Of Abbreviation

B.P	British pharmacopoeia
CAA	Chicken anemia agent(recentely namedCAv=chicken anemia virus)
CEF	Chicken embroy fibroblasts
CNCM	Collection national de cultures de micro-organismes
CPE	Cytopathic effect
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAPP	Filtered air positive pressure
HV	Haematocrit value
IBDV	Infectious bursal diseases virus (Gumboro diseases virus)
I.M.	Intramuscular
MDA	Maternally derived antibodies
MDCC-MSB1	Marek's diseases virus-transformed chicken T-lymphoblatoid cel
MDV	Marek's diseases virus
MSV	Master seed virus
PCR	Polymerase chain reaction
NF	National formulary
PBS	Phosphate Buffered Saline
Ph.EUR.	European pharmacopoeia
REV	Reticuloendotheliosis virus
S.C.	Subcutaneous
SPF	Specific pathogen free
TCID50	50 percent tissue culuture infective dose
VN	virus neutralization
W.W. Wingweb	
PV Post vaccination	
PI	Post inoculation
CLEVB	Central laboratory for evaluation of veterinary biologics
CAV DNA	Chicken anemia virus nucleic acid
FAT	Fluorscent antibody technique
ELISA	Enzyme link immunosorbant assay
PCV	Packed cell volume