Cairo University

Faculty of Veterinary Medicine

Department: Microbiology (Bacteriology, Immunology & Mycology)

Student name: Ashraf Ezz El-Deen Mohammad Sayour

Nationality: Egyptian **Date and place of birth:** 26/6/1963, Cairo

Degree: Ph.D. in Veterinary Science

Specialization: Microbioloy (Bacteriology, Immunology and Mycology)

Title of thesis: The use of recent bacteriological techniques in the differentiation of Brucella group of micro-organisms

Supervisors:

1. **Prof. Dr. A. Farid H. Farid**, Professor Emeritus of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University
2. **Dr. Samy I. Ibrahim**, Emeritus Chief Researcher, Department of Brucellosis Research, Animal Health Research Institute, Agricultural Research Centre

ABSTRACT

This study focused on the differentiation of 357 brucella isolates and 15 reference brucella strains at the species, biovar and sub-biovar levels. The substrate specific tetrazolium reduction (SSTR) classified the isolates as *Br. melitensis* with 4 main metabolic patterns. Multi-phage typing identified the isolates as *Br. melitensis* with 4 lytic patterns. Antibiotic resistogram detected seven field strains within the 343 isolates of *Br. melitensis* bv. 3, two strains in the 13 isolates of biovar 2, and one strain unique to the isolate of biovar 1. Five epidemiological maps were drawn. Combined SSTR (a simple alternative to classic metabolic tests) and multi-phage typing guaranteed accurate speciation. Antibiotic resistogram was very helpful for strain typing.

Keywords:
Brucella, brucellosis, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, taxonomy, brucella isolation, brucella differentiation, brucella subtyping, SSTR, tetrazolium salt, oxidative metabolism, multi-phage typing, brucella phage, catalase, oxidase, nitrate reduction, H_2S production, urease, thionin, fuchsin, epidemiological marker, antibiotic, resistogram typing, sub-biovar typing, strain typing, epidemiological map, epidemiological tracing, strain 19, Rev.1, RB51, cow, buffalo, sheep, goat, camel, Egypt.

جامعة القاهرة

كلية الطب البيطرى

قســـــــــم: الميكروبيولوجيا (بكتريولوجيا – إميونولوجيا – ميكولوجيا)

اســـم الطالب: أشـــرف عزالديـــن محمـــد ســـيور

الجنســـــية: مصرى **تاريخ الميلاد:** ١٩٦٣/٦/٢٦ **جهة الميلاد:** القاهرة

الدرجـــــــة: دكتوراه الفلسفة فى العلوم الطبية البيطرية

التخصـــــص: ميكروبيولوجيا (بكتريولوجيا – إميونولوجيا – ميكولوجيا)

عنوان الرسالة:

استخدام التقنيات البكتريولوجية الحديثة فى التمييز بين مجموعة ميكروبات البروسيلا

المشـــــرفون:

١- **السيد الأستاذ الدكتور/ أحمد فريد حسن فريد**
أستاذ الميكروبيولوجيا المتفرغ – قسم الميكروبيولوجيا – كلية الطب البيطرى – جامعة القاهرة
٢- **السيد الدكتور/ سامى اسماعيل ابراهيم**
رئيس بحوث متفرغ – قسم بحوث البروسيلا – معهد بحوث صحة الحيوان – مركز البحوث الزراعية

المستخلص

ركزت هذة الدراسة على تمييز ٣٥٧ معزولاً للبروسيلا و١٥عترة بروسيلا قياسية على مـــستوى النوع والطراز الحيوى ودون مستوى الطراز الحيوى وقد صنّف اختبار اختزال التترازوليوم بمادة مغذية معينة المعزولات كبروسيلا مالطية ذات أربعة أنماط أيضية وقد تعرف نظام التصنيف متعدد اللاقمات البكتيرية علىالمعزولات كبروسيلا مالطية ذات أربعة أنماط تحللية وقـد كـشف نمـط المقاومة للمضادات الحيوية عن سبع عترات حقلية داخل الثلاثمائـــة وثلاثـــة وأربعـــين معـــزولاً للبروسيلا المالطية من الطراز الحيوى ٣ وعترتين داخل الثلاثة عشر معزولاً للبروسيلا المالطيـــة من الطراز الحيوى ٢ وعترة فريدة خاصة بمعزول البروسيلا المالطية من الطراز الحيوى ١. هذا وقد تم رسم خمس خرائط وبائية. وقد تبين أن استخدام اختـــزال التترازوليـــوم (كبـــديل بـــسيط لاختبارات الأيض التقليدية) مع النظام متعدد اللاقمات البكتيرية يضمن التصنيف الدقيق للنوع وأن استخدام نمط المقاومة للمضادات الحيوية مفيد للتصنيف على مستوى العترات.

الكلمات الدالة:
بروسيلا – البروسيلا المالطية – تصنيف – عزل البروسيلا – تمييز البروسيلا – تترازوليوم – أيض تأكـسدى – لاقمات – مضاد حيوى – المقاومة للمضادات الحيوية – عترة – خريطة وبائية – التتبع الوبائى – العترة ١٩ – آر بى ٥١ – ريف ١ – بقرة – جاموسة – نعجة – ماعز – ناقة – مصر.

CONTENTS

INTRODUCTION 1

REVIEW OF LITERATURE 4

A. Discovery and evolutionary derivation of members of the genus *Brucella*

i. *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* 4
ii. *Brucella suis* 6
iii. *Brucella ovis* 8
iv. *Brucella neotomae* 10
v. *Brucella canis* 12
vi. Atypical/ variant brucella strains 14

B. Taxonomy of the genus *Brucella*

i. Taxonomic niche of the genus *Brucella* among other genera 18
ii. Intrageneric status of *Brucella* and the genomospecies concept 21

C. Phenotypic identification and typing of the genus *Brucella*

1- Identification to the generic level 35
i. Morphology and staining 35
ii. Growth characteristics 37
iii. Biochemical reactions 41
2- Identification to the species level 44
i. Preferred natural host 45
ii. Lysis by brucella phages 48
iii. Oxidative metabolism 59
3- Identification to the biovar level 65
i. CO_2 requirement 65
ii. H_2S production 68
iii Urease production 69
iv. Sensitivity to dyes 72
v Antigenic structure of the O-polysaccharide chain of LPS 73
3- Differentiation to the sub-biovar level by antibiotic resistogram typing 80

D. Trials for isolation, identification and biotyping of *Brucella* strains in Egypt

i. *Br. melitensis* from different animals 85
ii. *Br. abortus* from different animals 93

MATERIAL AND METHODS 98

A- Material

1. Samples 98
2. Experimental animals 100
3. Reagents 100
4. Differential stains 102
5. Bacteriological media 105
6. Brucella phages 106
7. Brucella monospecific antisera 106
8. Antibiotics for resistogram typing 108
9. Lyophilized reference strains 109
10. Antigen for milk ring test 109

B- Methods

1. Sampling 110
2. Serological testing by milk ring test 111
3. Bacteriological examination 111
   - a- Culture of specimens 112
   - b- Identification and typing of brucella isolates 113
     - i- Identification at the genus level 114
     - ii- Identification at the species level 116
     - iii- Identification at the biovar level 118
     - iv- Identification at the sub-biovar level 120
4. Statistical analysis 120
5. Quality control/ quality assurance 120

RESULTS 121

DISCUSSION 162

CONCLUSION 199

SUMMARY 202

REFERENCES 205

ARABIC SUMMARY

LIST OF ABBREVIATIONS

- **µg:** microgram
- **µl:** microlitre
- **µm:** micron
- **A:** abortus
- **AHRI:** Animal Health Research Institute, Egypt
- **ATCC:** American Type Culture Collection, USA
- **ATP:** Adenosine triphosphate
- ***Bam*HI:** endonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* H that cuts at G/GATCC
- **BCSP:** brucella cell surface protein
- **Bk_0:** Berkley 0
- **Bk_1:** Berkley 1
- **Bk_2:** Berkley 2
- **bv.**: biovar
- **C:** common
- **CDC:** Centres for Disease Control
- **CEG:** concentration enabling bacterial growth
- **CVL:** Central Veterinary Laboratories
- **D-** : dextrorotatory
- **DIG:** digitoxin
- **dL:** decilitre
- **DNA:** deoxyribonucleic acid
- ***Eco*RI:** endonuclease from *Escherichia coli* BS5 that cuts at G/AATTC
- ***Eco*RV:** endonuclease from *Escherichia coli* J62 pLG74 that cuts at GAT/ATC
- **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay
- **FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations
- **Fi:** Firenze
- **g:** gravity
- **G+C:** guanine plus cytosine
- **gm:** gram
- **GSS:** genomic sequence survey
- ***Hind*III:** endonuclease from *Haemophilus influenzae* Rd com-10 that cuts at A/AGCTT
- **HOOF-Prints:** Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints
- **I:** intermediate
- **ICSB:** International Committee on Systematic Bacteriology
- **ID_{50}:** infective dose 50
- **IgG:** immunoglobulin gamma
- **IS:** insertion sequence
- **IU:** international unit
- **Iz:** Izatnagar
- **Kb:** kilo base pair
- **kDa:** kilo Dalton
- **KDO:** 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid
- **L-** : levorotatory
- **L:** lysis
- **LPS:** lipopolysaccharide
- **M:** melitensis or mucoid
- **M:** molarity
- **Mab:** monoclonal antibody
- **Mb:** mega base pair
- **Md:** mega Dalton
- **mg:** milligram
- **MIC:** minimum inhibitory concentration

- **ml:** millilitre
- **MLEE:** multilocus enzyme electrophoresis
- **M_r:** molecular weight
- **MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide
- **N:** normality
- ***Nci*I:** endonuclease from *Neisseria cinerea* that cuts at CC/(GC)GG
- **NCTC:** National Collection of Type Cultures, UK
- **NL:** no lysis
- **nm:** nanometer
- **NMR:** nuclear magnetic resonance
- **Np:** Nepean
- **NVSL:** National Veterinary Services Laboratories
- **°C:** degree centigrade
- **OD:** optical density
- **OIE:** Office International des Epizootie
- **omp:** outer membrane protein
- **PBP:** penicillin binding protein
- **PBS:** phosphate buffered saline
- **PCR:** polymerase chain reaction
- **PFGE:** pulsed-field gel electrophoresis
- **pH:** hydrogen ion concentration
- **PL:** partial lysis
- ***Pst*I:** endonuclease from *Providencia stuarti* that cuts at CTGCA/G
- **R/C:** rough/ canis
- **R/M:** rough/ melitensis
- **R/O:** rough/ ovis
- **R:** rough
- **RBCs:** red blood corpuscles
- **rDNA:** ribosomal deoxyribonucleic acid (DNA coding for rRNA)
- **REO:** ram epididymitis organism
- **RFLP:** restriction fragment length polymorphism
- ***rrf*:** 5S rRNA gene
- ***rrl*:** 23S rRNA gene
- ***rrn*:** rRNA operon
- **rRNA:** ribosomal ribonucleic acid
- ***rrs*:** 16S rRNA gene
- **RTD:** routine test dilution
- **S:** smooth
- **SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis
- **S-LPS:** smooth lipopolysaccharide
- ***Sma*I:** endonuclease from *Serratia marcescens* S_b that cuts at CCC/GGG
- **spp.:** species
- **SSTR:** substrate-specific tetrazolium reduction
- **T:** typical phage lysis pattern
- **Tb:** Tbilisi
- **TPB:** typical phage lysis pattern and partial lysis with Berkley phage
- **TPI:** typical phage lysis pattern and partial lysis with Izatnagar phage
- **TPWB:** typical phage lysis pattern and partial lysis with Weybridge and Berkley phages
- **UAE:** United Arab Emirates
- **USA:** United States of America

- **USDA:** United States Department of Agriculture
- **V factor:** nicotinamide adenine dinucleotide
- **vol.:** volume
- **VNTR:** variable number tandem repeat
- **w/v:** weight per volume
- **Wb:** Weybridge
- **WHO:** World Health Organization
- ***Xba*I:** endonuclease from *Xanthomonas campestris* (*Xanthomonas badrii*) that cuts at T/CTAGA
- ***Xho*I:** endonuclease from *Xanthomonas campestris* (*Xanthomonas holcicola*) that cuts at C/TCGAG
- **X factor:** haemin