Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Food Hygiene

Name: **Noha Abbas Helmy**

Nationality: Egyptian

Date and Place of Birth: 24/2/1963, Heliopolis, Cairo.

Degree: Ph.D.

Supervisors:

* **Prof. Dr. El-Sayed El-Mossalami**

* **Prof. Dr. Nada Khalifa Mansour**

* **Dr. Seham El-Zeedy**

Title of the Thesis:

"Application of Biotechnics for Detection of Some Pathogenic Microorganisms in Chicken meats"

Abstract:

Chicken meat and chicken meat products are considered as one of the major source of food borne pathogens. A total of 100 chicken meat and their products (50 meat, 25 kofta, 25 burgers) were obtained from supermarkets and assayed for the presence of salmonella, E. coli ETEC and E. coli O157:H7 by PCR and hybridization techniques and compared to standard culture methods. Salmonella were detected in (16%) of total samples (10,3,3) samples with PCR and confirmed by hybridization amplifying 275 bp fragment of salmonella invA gene compared to 8% (6,2,0) samples of total samples with standard culture. The prevalence of E. coli ETEC was estimated as 13% (6,3,4) samples by PCR and hybridization amplifying 110 bp of LT gene compared to 9% (3,2,4) samples respectively by culture method. Detection of amplifying product can be done by gel electrophoresis. The multiplex PCR assay was applied using 3 sets of primers that amplify fragments to aeaA, rfbE and flicl gene to identify E. coli O157:H7 in a single reaction against cultural method which demonstrate inadequacy in detecting E. coli O157:H7 in the samples: Multiple PCR assay out performed culture method. Several methods for preparing template DNA for PCR were tested. These were: boiling, enzyme treatment, phenol chloroform and Triton X100 which was the most consistent. The agreement % between PCR and the standard culture methods was 92% for salmonella and 96% for E. coli ETEC. The quick of the assay, ease of use and high sensitivity and specificity of PCR for detection of salmonella E. coli ETEC and E. coli O157:H7 make it reliable method for routines food microbiology laboratories.

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطري
قسم الرقابة الصحية علي الأغذية

الاســـــــم : نهي عباس حلمي مرسي حلمي .
الجنســـــية : مصرية
تاريخ ومكان الميلاد : ١٩٦٣/٢/٢٤ - مصر الجديدة القاهرة
الدرجـــــة : دكتوراه الفلسفة في العلوم الطبية البيطرية

المشرفون علي الرسالة :
١. أ.د / السيد إبراهيم المسلمي . أستاذ الرقابة الصحية علي اللحوم ومنتجاتها.
٢. أ.د / ندا خليفة منصور . أستاذ الرقابة الصحية علي اللحوم ومنتجاتها .
٣. د / سهام عبد الرشيد الزيدي رئيس بحـــوث بمعـهد الأمصـال واللقاحـات البيطرية .

عنوان الرسالة : تطبيق التقنية الحيوية (بيوتكنيك) للكشف والتصنيـف لبعـض الميكروبات الممرضة في لحوم الدجاج .

٥- مستخلص الرسالة (Abstract)

٥-١ باللغة العربية :

تمـثل لحـوم الدجـاج مصدراً أساسيا في نقل بعض الميكروبات الخطيرة مسببة مشاكل صحية وخسائر إقتصادية كبيرة . لذلك تم تطبيق الطرق الحديثة كتفاعل البلمرة المتسلسل PCR والتهجين Hybridization للكشـف عـن هذه الميكروبات ومنتجاتها مثل البرجر والكفتة فقد تم جمع ١٠٠ عينة من مُختلف المحل التجارية ممثله في ٥٠ عينة لحم دجاج ٢٥ كفته ٢٥ برجر وإختبارها بالطرق الحديثة وتقيمها ومقارنتها مـع طـريقة الـزرع البكتريولوجـي التقلـيدي تم تشخيص ميكروب السالمونيلا بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسـل بنسـبة ٢٠ % في لحم الدجاج.، ١٢% كل من الكفتة والبرجر وقد أكدت هذه النتائج بطريقة التهجيـن مقابل ١٢% لحم الدجاج ٨% من الكفتة بطريقة الزرع البكتريولوجي التقليدي. وبالكشف عن مـيكروب الإيشيريشـيا كـولاي المفرزة للسموم التي تتأثر بالحرارة بطريقة التفاعل البلمرة المتسلسل والتهجيـن كانـت النسبة ١٢% ، ١٢% ، ١٦% في لحم الدجاج والكفتة والبرجر مقابل ٦% ، ٨% ، ١٦% بطـريقة الـزرع البكتريولوجي . وقد تم إستخدام تقنية البلمرة المتسلسلة بأكثر من باديء(ثلاث باديـنات) للكشف عن ميكروب الإيشيريشيا كولاي O157:H7 وقد وجد أن هذه الطريقة أكثر دقة للكشف عـن هـذا الميكروب من طرق الزرع التقليدية الأخرى حيث يتم تعين ثلاث جينات مؤكدة بذلك وجود هذا المـيكروب . تـم إستخلاص الحامض النووي DNA لهذه الميكروبات من العينات بعدة طرق مختلفة وذلك لإختيار أفضل الطرق وإستخدامها مع تفاعل البلمرة المتسلسل وقد أعطت جميع الطرق نتائج جيدة وكانت أسرعهم وأيسرهم وأفضلهم طريقة إسخلاص الحامض النووي بإستخدام تريتون x100 حيث أثبتت التجارب أن نسـبة التوافق بين طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل وطرق الزرع التقليدية ٩٢% للسالمونيلا و٩٦% لمـيكروب الإيشيريشـيا كـولاي المفرزة للسموم التي تتأثر بالحرارة . مما سبق يمكن القول بأن طرق التقنـية الحديثة ولاسيما طريقة التفاعل البلمرة المتسلسل التي مميزات عديدة إذا قورنت بطريقة الزرع البكتريولوجـي فهي أسرع وأسهل وأدق لفحص العينات وذات حساسية أعلي وتمهد هذه النتائج الطريق للمعامل بمصر للتشخيص في أسرع وقت هذه الميكروبات في المنتجات الغذائية .

CONTENTS

		Page
INTRODUCTION	.....	1
REVIEW OF LITERATURE	.....	6
MATERIALS AND METHODS	.....	50
RESULTS	.....	86
DISCUSSION	.....	108
CONCLUSION AND RECOMMENDATION	.....	126
SUMMARY	.....	130
REFERENCES	.....	143
APPENDIX	.....	134
ARABIC SUMMARY	.....	

List of Abbreviation

AOAC	:	Association of Official Analytical Chemists
BAM	:	Bacteriological Analytical Manual
BGA	:	Brilliant Green Agar
Bp	:	base pair
BPW	:	Buffered Peptone Water
CFU	:	Colony Forming Unit
CT SMA	:	Cefixime Tellarite-Sorbitol MacConkey Agar
DA	:	Deoxycholate Agar
DDW	:	Double Distilled Water
DNA	:	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	:	deoxy Nucleotide Triphosphate
EaeA	:	Effacing and attaching E. coli gene
EDTA	:	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
EIA	:	Enzyme Immuno-Sorbent Assay
ES	:	E. coli System
GITC	:	Guanidium Isothiocyanate C
ICE	:	Immuno Concentration E. coli
IMS	:	Immuno-Magnetic Separation
inv-A	:	invasion gene
LT	:	Heat Labile Toxin
MFDI	:	Membrane Filter Disc Immunoimmobilization
MIPA	:	Magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay
MPCR	:	Multiplex Polymerase Chain Reaction
MPN	:	Most Propable Number
MSSRV	:	Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PCR-OLA	:	Polymerase Chain Reaction Oligonucleotide Ligation Assay
PCR-RE	:	Polymerase Chain Reaction Restriction Enzyme
RAPD-PCR	:	Random Amplified Polymorphism DNA Polymerase Chain Reaction
RV	:	Rappaport Vassiliadis
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulphate
Sh.T.	:	Shiga Toxin
SLT	:	Shigla-like toxin

ST	:	Heat Stable Toxin
TAE	:	Tris Acetate EDTA
TB	:	Tetrathionate broth
TCA	:	Tissue Culture Assay
TE	:	Tris EDTA
UT	:	Untyped
VIP	:	Visual Immuno-Precipitate
VT	:	Verotoxin
VTEC	:	Verocyto-toxigenic Escherichia coli