Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Name: Wael Mohamed Abdel Rahman Abdel Salam
Nationality: Egyptian.
Date of birth: 14/8/1971
Place of birth: Cairo, Egypt.
Specification degree: Ph.D. degree.
Title of thesis:

"Further studies on *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens."

Supervisors: Prof. Dr. Kamelia Mahmoud Osman.
Professor and Head of the Department of Microbiology
Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University
Dr. Mahmoud Hashad
Ass. Prof. of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University
Dr. Zakaria Abdel Wahab
Chief Researcher, Animal Health Research Institute, Dokki

ABSTRACT

A total of 180 bone marrow and/or blood samples were collected from broiler chickens with post mortem lesions of colisepticaemia. Bacteriological examination was carried out and the incidence of positive samples was 61%. The results of serological identification showed that the most prevalent serotypes were O119, O157, O114, O136 and O109. Antimicrobial susceptibility was carried out against 13 antibacterial agents and colstin sulphate, gentamicin, danofloxacin and norfloxacin were the sensitive ones. The results of SDS-PAGE on the outer membrane proteins revealed bands of molecular weight of 35 kDa, 45, kDa and 55 kDa. The results indicated additional predominant bands of 66 kDa and 74 kDa. Fingerprinting of 19 avian *E. coli* isolates by RAPD-PCR with RAPD primers B11, B12 and B18 showed that 19 different profiles had a genetic similarity level. A dendrogram or phylogentic tree was generated from RAPD patterns of *E. coli* strains isolated from chicken. O-antigen typing and RAPD typing indicated that the 19 strains are heterogenous. This study concluded that *E. coli* isolates can be genetically differentiated by RAPD-PCR technique and this method is simple and fast.

الأسم: وائل محمد عبد الرحمن عبد السلام
الجنسية: مصرى
تاريخ الميلاد: ١٩٧١/٨/١٤
الدرجة المرشحة لها: درجة الدكتوراه
عنوان الرسالة:

دراسات تكميلية على عترات الميكروب القولونى المعزولة من دجاج التسمين

المشرفون:

الأستاذ الدكتور/ كاميليا محمود عثمان

أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجيا - كلية الطب البيطرى- جامعة القاهرة

الدكتور/ محمود حشاد

أستاذ الميكربيولوجيا المساعد - كلية الطب البيطرى- جامعة القاهرة

الدكتور/ زكريا عبد الوهاب

رئيس بحوث - معهد بحوث صحة الحيوان-الدقى

المستخلص

تم تجميع و إجراء الفحص البكتيرى لعزل الميكروب القولونى على عدد ١٨٠ عينة من النخاع العظمى أو الدم لدجاج تسمين يشتبه إصابتها بمرض التسمم الدموى للميكروب القولونى. عزل الميكروب القولونى بنسبة ٦١%. وجد من التصنيف السيرولوجى لهذه العترات أن أعلى نسبة كانت O119 بنسبة ١٣,٧٥% يليه O157 وO114 و O136 و O109 بنسبة عزل ٦,٢٥% و ٦,٢٥% و ٥% و ٥% على التوالى. بإجراء اختبار الحساسية على العترات المعزولة وجد أن أعلى نسبة حساسية كانت لسلفات الكولستين والجنتاميسين والدانوفلوكساسين والنورفلوكساسين. بإجراء العدوى التجريبية فى الكتاكيت عمر يوم واحد عن طريق القصبة الهوائية باستخدام عدد ١٩ عترة من عترات الميكروب القولونى المعزولة وجد أن جميع العترات عالية الضراوة. باستخدام اختبار التحليل الكهربائى (SDS-PAGE) على الغشاء البروتينى الخارجى (OMP) على ١٩ عترة من عترات الميكروب القولونى أعطت خطوط فى مستويات الأوزان ٣٥ و٤٥ و٥٥ كياو دالتون بالإضافة إلى وجود خطوط إضافية على مستوى ٦٦ و٧٤ كيلو دالتون فى بعض العترات. باستخدام اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل بأستخدام بادئ عشوائى (RAPD-PCR) لعمل بصمة جينية على ١٩ عترة من عترات الميكروب القولونى أعطت ١٩ شكل مختلف لكل عترة من عترات الميكروب القولونى بنسبة مماثل على الأقل ٤٨% وعلى الأكثر ٩٧%. تم عمل الشجرة الجينية (Phylogenetic tree) من نتائج اختبار RAPD-PCR على ١٩ عترة من الميكروب القولونى المعزولة من دجاج التسمين. وقد وجد أنه لا يوجد علاقة بين التصنيف باستخدام O-antigen أو التصنيف باستخدام RAPD-PCR. واستنتجت هذه الدراسة أن اختبار RAPD-PCR يمكن أن يفرق بين معزولات الميكروب القولونى من ناحية التركيب الوراثى لهم وأن هذه الطريقة أسهل وأسرع من الإختبارات الوراثية الأخرى وبالتالى يمكن استخدامها كطريقة بديلة لعمل تصنيف أعلى للميكروب القولونى.ويمكن عن طريق هذا الاختبار معرفة مصدر العدوى وكذلك تحديد نوعية السلالة المسببة للمرض بدقة ليمكن عمل التحصينات اللازمة للقضاء على الميكروب.

CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION	1
2. REVIEW OF LITERATURE	5
2.1. Occurrence of *E. coli* serotypes in chickens	5
2.2. Antibiogram of the *E. coli*	11
2.3. Pathogenicity of the *E. coli* in one day old chicks	16
2.4. Outer membrane protein (OMP) profile of *E. coli*	19
2.5. Molecular typing of *E. coli* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD)	22
3. MATERIALS AND METHODS	33
3.1. Materials	33
3.1.1. Specimens for bacterial isolation	33
3.1.2. Media	33
3.1.3. Chemicals and Reagents	35
3.1.4. Diagnostic antisera	36
3.1.5. Laboratory animals	36
3.1.6. Antibacterial sensitivity discs	36
3.1.7. Materials used for preparation and separation of the outer membrane proteins	37
3.1.8. Materials used for isolation of genomic DNA from *E. coli* strains	40
3.1.9. Materials used for Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)	41
3.2. Methods	42
3.2.1. Collection of samples for bacterial isolation	42
3.2.2. Isolation and Identification of the *E. coli* isolates	42

Page

3.2.3. Pathogenicity of *E. coli* strains in one-day-old chicks 44

3.2.4. Antibacterial sensitivity testing 45

3.2.5. *E. coli* Outer membrane protein profiles (OMPs) 47

3.2.6. Random Amplification Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction (RAPD- PCR) 49

4. RESULTS 54

4.1. Percentage of *E. coli* isolates 54

4.2. Results of identification of *E. coli* isolates 54

4.3. Serotyping of *E. coli* isolates 56

4.4. Microbial susceptibility to antibacterial agents using the disc diffusion method 58

4.5. Results of pathogenicity test 61

4.6. Outer membrane proteins (OMPs) of different *E. coli* serotypes using the SDS-PAGE 63

4.7. Fingerprinting of avian *E. coli* by RAPD-PCR 66

4.8. RAPD types analysis 70

4.9. Phylogenetic analysis of avian *E. coli* strains based on RAPD profiles 72

4.10. Correlation between serotypes and RAPD types 74

5. DISCUSSION 76

6. SUMMARY 93

7. REFERENCES 95

- ARABIC SUMMARY --

LIST OF ABBREVIATIONS

Abbreviation	Definition
APEC	Avian pathogenic *E. coli*
AP-PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction.
APS	Ammonium persulphate
bp	Base pair(s)
CFU	Colony forming unit
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPS	Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphate
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylene diamine-tetraacetic acid
EHEC	Enterohaemorrhagic *E. coli*
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMB	Eosin methylene blue agar
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
ETEC	Enterotoxigenic *Escherichia coli*
HUS	Haemolytic ureamic syndrome
IROMP	Iron regulated outer membrane protein(s)
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LD_{50}	Lethal dose which kills 50% of inoculated animals.
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis
MVSP	Multivariate Statistical Package
MR	Methyl red
OMP	Outer membrane protein(s)
PCR	Polymerase chain reaction

Abbreviation	Definition
PFGE	Pulse filed gel electrophoresis
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA- Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rRNA	Ribosomal RNA
RTs	RAPD types
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
SLT	Shiga like toxin
SPF	Specific pathogen free
STEC	Shiga like toxin producing *Escherichia coli*
TAE	Tris-acetate EDTA buffer
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
TSI	Triple sugar iron
UPGMA	unweighed paired-group method, arithmetic mean algorithm
UV	Ultraviolet
VP	Voges Proskauer
VT	Vero toxin
β-ME	Beta mercaptoethanol