Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology

Name: **Eman Edwar Saba Azer**
Date of birth: 25.5.1971
Nationality: Egyptian
Doctor of Philosophy in Veterinary Medical Sciences.
Specialization: Microbiology (Bacteriology, Immunology and Mycology)

Title: Mycobacterial Antigenic Extracts: A view of their Characterizations and Diagnostic Efficacy

Supervisors:
Prof. Dr. Wagih Armanious Gad El-Said
Prof. of Microbiology Department
Faculty of Veterinary Medicine -Cairo University
Prof. Dr. Danial Guindy Mikhail
Chief Researcher of Bact. Diagn. Prod. Dept.,
Vet. Serum & Vaccine Res. Institute, Abbasia, Cairo.

ABSTRACT

It is possible to prepare and use successfully ***M. bovis*** cell extract antigens " (SA) & (MAA)" and culture filtrate antigens "HK-CF, ST-CF and SU-CF" in vitro for diagnosis of bovine TB to minimize non-specific reactions in comparison with bovine PPD by measuring CMI using skin sensitivity test, also by measuring antibodies using ELISA test.

Characterization of proteins of different mycobacterial antigens by SDS-PAGE. Also Western blotting analysis was performed resulting in clear visible immunoreactive protein bands.

By evaluation of nitric oxide estimation test for diagnosis of bovine TB; it was observed that there is statistical significant difference between levels of nitrite (as indicator of nitric oxide) in diseased than in control animals, also between infected animals with typical & atypical mycobacteria. These results clarified the possibility of use of nitric oxide test as ancillary test (complementary) for more rapid and easier diagnosis of bovine TB.

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطرى
قسم الميكروبيولوجيا

الاسم: ط.ب/ إيمان إدوار سابا عازر

تاريخ الميلاد: ٢٥ مايو ١٩٧١ جهة الميلاد: القاهرة

الجنسية: مصرية

الدرجة: **دكتوراه الفلسفة فى العلوم الطبية البيطرية**

التخصص: الميكروبيولوجيا (البكتيريا والفطريات والمناعة)

عنوان الرسالة: **مستخلصات انتيجينية للميكوباكتريا: رؤية للصفات و القدرة التشخيصية**

السادة المشرفين:

الاستاذ الدكتور / وجيه أرمانيوس جاد السيد

استاذ الميكروبيولوجيا (البكتيريا والفطريات والمناعة)

كلية الطب البيطرى – جامعة القاهرة

الاستاذ الدكتور/ دانيال جندى ميخائيل

رئيس بحوث – قسم بحوث المواد المشخصة البكتيرية

معهد بحوث الامصال واللقاحات البيطرية العباسية– القاهرة

المستخـــلص

يؤكد العمل الذى أجرى فى هذا البحث على إمكانية إستخدام الانتيجينات المستخلصـــة من ميكروب ميكوبكتيريم بوفيس " مستخلص ميكوبكتيريم بوفيس بواسطة التفتيت الـــ SA ومستخلص ميكوبكتيريم بوفيس بواسطة كبريتات دوديســيل الصـــوديوم لإســتخلاص الـــ MAA الانتيجينات المرتبطة بالغشاء الخلوى " ، وكذلك الانتيجينات الناتجـــة مـــن الرشـــيح الخلوى " الرشيح الخلوى الميت HK-CF و الرشيح الخلوى قصير الامد ST-CF و الرشـــيح الخلوى معقم غير معامل حراريا SU-CF" معملياً بنجاح فى تشخيص مرض السل البقـــرى حيث أمكن بإستخدامهم تقليل التفاعلات غير النوعية بالمقارنة مع التيـــوبركلين النقـــى (الـــ ب.ب.د) البقرى وذلك بإجراء اختبار حساسية الجلد ، وأيضاً الكشف عن الأجســـام المضـــادة بإستخدام اختبار إليزا.و تم إجراء الفصل الكهربائى لتمييز البروتينات للانتيجينـــات المختلفـــة، وبإجراء تحليل الـــ Western blotting شوهدت حزم بروتينات واضحة متفاعلة مناعياً.

وبتقييم اختبار قياس اوكسيد النيتريك لتشخيص السل البقرى قد لوحظ وجـــود فـــروق معنوية إحصائياً بين قياس مستوى النيتريت (كمؤشرلقياس أوكســـيد النيتريـــك) للحيوانـــات المصابة والحيوانات المحكمة وكذلك للحيوانات المعدية بالميكوبكتيريا النوعية وتلـــك المعديـــة بالميكوبكتيريا اللانوعية. وهذه النتائج توضح إمكانية إستخدام إختبار أوكسيد النيتريك كإختبار مساعد (متمم) لتشخيص أسرع وأسهل للسل البقرى.

CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION	1
2. REVIEW OF LITERATURE	4
Diagnosis of tuberculosis	4
2.1. Mycobacterial sonicated antigens (SA)	5
2.2. Mycobacterial membrane associated antigen (MAA)	15
2.3. Mycobacterial heat killed culture filtrate (HK-CF)	23
2.4. Mycobacterial short term culture filtrate (ST-CF)	28
2.5. Mycobacterial sterile unheated culture filtrate (SU-CF)	35
2.6. Mycobacterial purified protein derivative antigen (PPD)	44
3. MATERIAL AND METHODS	63
3.1. Materials	63
3.1.1. Experimental animals	63
3.1.2. Strains	63
3.1.3. Antigens	63
3.1.4. Media	64
3.1.5. Chemicals and solutions	66
3.1.6. Sera used	75
3.1.7. Samples used	75
3.1.8. Stain	76
3.1.9. Apparatus and Equipment	77
3.2. Methods	78
3.2.1. Preparation of mycobacterial antigens	78
3.2.1.1. Preparation of ***M. bovis*** AN5 sonicated antigen	78

3.2.1.2. Preparation of ***M. bovis*** AN5 membrane associated antigen 79

3.2.1.3. Preparation of ***M. bovis*** AN5 heat killed culture filtrate 80

3.2.1.4. Preparation of ***M. bovis*** AN5 short term culture filtrate 81

3.2.1.5. Preparation of ***M. bovis*** AN5 sterile unheated culture filtrate 81

3.2.1.6 Concentration of short term & sterile unheated culture filtrates by freeze-drying 82

3.2.1.7. Reconstitution of freeze dried culture filtrate 82

3.2.1.8. Bovine PPD 82

3.2.1.9. Estimation of total protein concentration 82

3.2.2. Standardization of the prepared mycobacterial antigens 83

3.2.3. Characterization and identification of mycobacterial proteins 84

3.2.3.1. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis 84

3.2.3.2. Silver stain technique of SDS-PAGE 85

3.2.3.3. Western immunoblotting analysis 87

3.2.4. Experimental infection of guinea pigs 88

3.2.5. Estimation of nitrite production test 90

3.2.6. Skin reactivity test 91

3.2.7. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) on the sera of guinea pigs using different mycobacterial antigens 92

3.2.8. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) on the sera of cattle using different mycobacterial antigens 94

3.2.9. Reisolation of mycobacteria 95

3.2.10. Identification of acid-fast isolates 96

4. RESULTS 99

5. DISCUSSION 152

6. SUMMARY 181

7. REFERENCES 184

ARABIC SUMMARY.

ABBREVIATIONS

BCIP/NBT : 5bromo 4chloro3indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium

BSA : bovine serum albumin

CMI : cell mediated immune response

DEAE : diethylaminoethyl

DNA : deoxyribonucleic acid

DTH : delayed-type hypersensitivity

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

HK-CF : heat killed culture filtrate

Ig : immunoglobulin

kDa : kilo Dalton

L.J. : Lowenstein-Jensen medium

LBA : lymphocyte blastogenesis assay

MAA : membrane associated antigen

MOTT : mycobacteria other than tuberculosis

OD : optical density

PPD : purified protein derivative

SDS : sodium dodecyl sulphate

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

Mw : molecular weight

NO : nitric oxide

iNOS : inducible nitric oxide synthase

RNI : reactive nitrogen intermediates

SA : sonicated antigen

SID : single intradermal

ST-CF : short term culture filtrate

SU-CF : sterile unheated culture filtrate

TB : tuberculosis

TBS : tris-base sodium chloride solution

TU : tuberculin unit