Abstract

Cairo University

Faculty of Veterinary Medicine

Dept.of Bacteriology

Name : Hoda Mohammed Mohammed El- Ashker

Nationality: Egyptian

Date of Birth: 12/11/1966

Place of Birth: Helwan _ Cairo

Specialization: Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Veterinary Medical Science Microbiology (Bacteriology,Immunology and Mycology)

Title of thesis:"Correlation Between Antigenic Structure of Escherichia Coli and its Virulence.

Supervisors:

Prof. Do. Ahmed Farid Hasan Farid

Emeritus Professor of Microbiology

Faculty of Veterinary Medicine _ Cairo University

Do.Mervat Sayed Hanafy

Chief Researcher of Microbiology and Head of Serology Unit

Animal Health Research Institute _ Dokki _ Giza

Pathogenic E. Coli are one of the most significant groups of bacteria causing diarrhea and extra intestinal infections in humans and domestic animals The present study is concerned with the relation between the important virulence factors of E. Coli causing diarrhea and its antigenic structure. 45 E. Coli isolated from different diseased animal (calves, goats,horses and poultry) were tested for pathogenicity and virulence factors, namely congored, α haemolysin, colonization factors verotoxins, cytotoxic necrotizing factors, adherence and intimin (eae A)gene. the I/P injection of mice with the E. Coli strains revealed that 60% of strains killed mice within 24-72 h. The most common factor was adherence (96.4%) followed by CR+ and α -haemolysin production(80%),VT+,CNF1,CNF2(53.3%,20%6.6%), respectively. CFA/I,CFA/II type1 somatic pili(40%,37.8%,22.2%),respectively. Eae A(gene) (10%).

المستخلص العربى

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطرى
قسم الميكروبيولوجى

اســـم الطـالـب: هدى محمد محمد الاشقر
الجنســـــــية: مصرية
تاريـــخ الميلاد: ١٩٦٦/١١/١٢
جـــهة الميلاد: حلوان ـ القاهرة
التخصـــــص: دكتوراة الفلسفة فى العلوم الطبية البيطرية (بكتريولوجيا ـ امينولوجيا ـ ميكولوجيا)

عنوان الرسالة: "العلاقة بين تركيب مولد الضد للايشيريشيا كولاى وضراوتة"

تحـت اشراف:

الاستاذ الدكتور/ أحمد فريد حسن فريد
استاذ الميكروبيولوجيا المتفرغ
كلية الطب البيطرى ـ جامعة القاهرة

الدكتـــورة / مرفـت سـيد حنفى
رئيس بحوث ورئيس وحدة السيرولوجى
معهد بحوث صحة الحيوان ـ الدقى

تعتبر الايشيريشيا كولاى الممرضة واحدة من اهم المجموعات البكتيرية المسببة للاسهال والامراض المختلفة لكل من الانسان والحيوانات الاليفه لذلك الهدف من هذه الدراسة هو ايجاد علاقة بين اهم عوامل الضراوة الخاصة بالميكروب القولونى المسبب للاسهال والتركيب الانتجينى الخاص به. تم عزل وجمع (٤٥)عترة من الميكروب القولونى لانواع مختلفة من الحيوانات المريضة (عجول،ماعز،خيول، دواجن)وبعد ذلك تم اختبار قدرة هذه العترات لاحداث الامراض فى الفئران،كما تم اختبار هذه العترات لعوامل الضراوة وهى خاصية الأتحاد بصبغة الكونجو الحمراء وخاصية ذوبان الدم النوع الفا وعوامل الأستعمار والقدره على انتاج سموم الفيرو والقدره على انتاج سموم خلويه وخاصية الألتصاق وأختبار تفاعل البلمره المتسلسل فى الكشف عن وجود جين الأنتمين وقد وجد ان الميكروب القولونى قادر على احداث الأمراض فى الفئران حيث ان العترات قتلت الفئران بنسبة ٦٠% فى خلال ٢٤ ـ ٧٢ ساعة.وقد وجد ان اكثر عوامل الضراوة وضوحا كانت خاصية الألتصاق (٩٦،٤%)وتليها خاصية الأتحاد بصبغة الكونجو الحمراء وخاصية ذوبان الدم النوع الفا (٨٠%) ثم القدره على انتاج السموم الخلويه النوع الاول والثانى بنسبة (٥٣,٣٥ % ،٢٠% ،٦,٦%) على التوالى ثم عوامل الأستعمار(الاول والثانى والأهداب الجسمية) بنسبة (٤٠% ،٣٧,٨% ،٢٢,٢ %)على التوالى ثم اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل فى الكشف عن وجود جين الأنتمين (١٠%)

CONTENTS

Subject	Page
1. INTRODUCTION	1
2. REVIEW OF LITERATURE	4
2.1. Reflection of serotype (O, H, K) from diseased animal	4
2.2. Pathogenicity	8
2.3. *E. coli* virulence factors	11
2.3.1. Congo red binding activity	11
2.3.2. Haemolysin	14
2.3.3. Colonization factors	18
2.3.4. Verotoxins and cytotoxic necrotizing factors (CNFs)	23
2.3.5. Adherence Assays	30
2.3.6. E. coli attaching and effecting (Intimin eae) gene:	33
3. MATERIAL AND METHODS	37
3.1. Material	37
3.1.1. Bacterial Strains	37
3.1.2. Culture Media	37
3.1.3. Reagents Used	41
3.1.4. Stains Used	41
3.1.5. Antisera used for serotyping of *E. coli* isolates	42
3.1.6. Cell Used	42
3.1.7. Laboratory Animals	43
3.1.8. Other Material	43
3.1.9. Material used for detection of eae A gene by PCR assay	43
3.2. Methods	47
3.2.1. **Identification of bacterial strains**	47
3.2.2. **Pathogenicity**	51
3.2.3. **Detection of virulence factors**	51

Subject **Page**

3.2.3.1. Congo red (CR) binding activity 51

3.2.3.2. Enterohaemolysin production 52

3.2.3.3. Colonization factors (CFA/ 1- CFA/ II and type 1 somatic pili) 52

3.2.3.4. Production and detection of verotoxin and CNFs in vero cells 53

3.2.3.5. Adherence assays 54

3.2.3.6. PCR assays for the simultaneous detection of intimin gene (encoded by eae A) in the extracted DNA of E. coli 55

4. RESULTS 57

4.1. Serotypes of E. coli isolates 57

4.2. Pathogemcity test 58

4.3. The seropathotypes of E. coli isolated from different diseased animals 60

4.4. Virulence tests 63

4.4.1. Congo red binding activity of E. coli isolated from different diseased animals 63

4.4.2. α- haemolysin production by E. coli strains isolated from different diseased animals 66

4.4.3. Colonization factors (CFAS) including CFAI, CFAII and type 1 somatic pili of E. coli strains isolated from different animal diseases 69

4.4.4. Production and detection of verotoxin (VT) and a cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) 76

4.4.5. Adherence properties of E. coli strains isolated from different diseased animal 84

4.4.6. Detection of intimin gene (eae A) by using PCR 89

Subject Page

4.5. Relation between different flagellar antigen (H type) related to its somatic antigen (O type) with reference to their virulence 91

5. DISCUSSION 97

6. SUMMARY 113

7. REFERENCES 117

- ARABIC SUMMARY --

LIST OF ABBREVIATIONS

APEC	: Avian pathogenic *Escherichia coli*
CNF	: Cytotoxic necrotizing factor
DA	: Diffuse adherence phenotype
Eae	: *Escherichia coli* attaching-effecing gene
EAggEC	: Enteroaggregative *Escherichia coli*
E. coli	: *Escherichia coli*
EHEC	: Enterohaemolytic *Escherichia coli*
E-Hly	: Enterohaemolysin
EMB	: Eosin methylene blue
EIEC	: Enteroinvasive *Escherichia coli*
EPEC	: Enteropathogenic *Escherichia coli*
ETEC	: Enterotoxigenic *Escherichia coli*
FBS	: Fetal bovine serum
HA	: Haemagglutination
HC	: Haemorrhagic colitis
HUS	: Haemolytic uremic syndrome
LA	: Localized adherence pattern
MRHA	: Mannose resistant haemagglutination
MSHA	: Mannose sensitive haemagglutination
NM	: Non motile
NTEC	: Necrotoxigenic *Escherichia coli*
SMAC	: Sorbitol MacConkey's agar
ST	: Heat stable
STEC	: Shiga toxin producing *Escherichia coli*
VT	: Verotoxin
VTEC	: Verotoxigenic *Escherichia coli*