English abstract

Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Bacteriology, Mycology and Immunology
Name: Mohamed Abdalla Mahmoud Abd El Monem.
Title of thesis:
"Characterization of Antimicrobial Resistance Determinants of *E. Coli*"
Thesis for the degree of Ph.D. in Veterinary Medicine Science
(Bacteriological, Mycology and Immunology)
Supervisors:
Prof. Dr. Nashwa Abd El-Salam Ezzeldin
Prof. of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University.
Prof. Dr. khaled Farouk Al-Amary
Prof. of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University
Prof. Dr. Sohair Gad alla
Professor in the central laboratory of residue Analysis and pesticides in food

The present work was planned to determine the isolation, characterization and evaluation the prevalence of *E. coli* serotypes in 188 herbs, water, chicken and human samples as well as detection of antimicrobial susceptibility, gene resistance detection and the diversity between isolates, and also screening on the Egyptian markets for the isolation of VTEC. 28%.of sample was considered as *E. coli*. The serological identification showed that O125, O112 and O86 were the most prevalence serotype among the 52 isolated sample with percentage 23%, 21% and 15% respectively, followed by serotypes O142, O127, O128, O114, O44 and O124 with percentage 13.5%, 10, 6%, 6%, 4% and 2% respectively and the result showed also that the human samples the only Isolates hold serotype O142 with 13.5%. The result of antibiotics sensitivity indicated that *E. coli* strains were highly resistant to penicillin, vancomycine, amoxicillin clauvinic and erythromycin (100%) followed by gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, oxytetracycline, trimithoprine, norfloxacin and nalidixic acid with percentages of 83%, 75%, 65.3%, 55.8%, 36.5%, 30.7% and 26.9 % respectively. All *E. coli* strains were found to be moderately sensitive to ceftazidime (100%). The MIC done for the 52 isolates showed that the strain is highly resistance to vancomycine (>256) and *E. coli* strains from chicken and human source is highly resistance to ciproflxacine (>32). The result of resistance gene detection of 52 *E. coli* isolates showed that (100%) carried blaTEM gene, and all the human and chicken isolates carried blaSHV gene and all of the gentamicin-resistant isolates carried aacC2 gene. The presence of blaOXA_1 gene was not detected except on two of human isolates. The result of sequencing indicated that the molecular characterization of five strains with different serotypes was related to the same origin (*E. coli* str. O102-ST405). The result of screening of 67 samples from Egyptian markets showed that all samples are negative for Vero cyto toxin producing *E. coli*

المستخلص العربى

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطري
قسم البكتيريا والفطريات والمناعة
الاسم: ط ب / محمد عبد الله محمود عبد المنعم
الدرجة: دكتوراة
عنوان الرسالة :
توصيف محددات المقاومة للمضادات الميكروبية على بكتيريا الاشيريشيا كولاى

تحت إشراف :
ا.د. نشوى عبد السلام عز الدين
أستاذ الميكروبيولوجى بكلية الطب البيطري- جامعة القاهرة
ا.د./ خالد فاروق العامري
أستاذ الميكروبيولوجي بكلية الطب البيطري جامعة القاهرة
ا.د. سهير جاد اللة
رئيس بحوث بالمعمل المركزي لتحليل متبقيات المبيدات والعناصر الثقيلة في الأغذية
المستخلص
صمم هذا العمل لعزل و توصيف وتقييم انتشار العترات المختلفة للميكروب القولوني بالإضافة إلي اختبار الحساسية ووتحديد الجين المسؤل عن المقاومة و تقدير مستوي التشابة فيما بين العزلات بالاضافة الي مسح للسوق المصري للكشف عن وجود الميكروب القولوني النموزجي المسئول عن افراز السموم . ولعزل الميكروب القولوني تم استخدام المنابت البيئية: لاكتوز بايل و هيكتون انتريك والايوسبن مسلين الازرق والاختبارات الكيمائية بالإضافة إلي التصنيف السيرولوجى لسلالات الميكروب القولوني. وأسفرت الاختبارات البكتريولوجية والبيوكيماوية لعدد 188 عينة عن عزل 52 سلالة من الميكروب القولوني بنسبة 28%.
وبالتصنيف السيرولوجى للميكروب القولوني وجد O125, O112, O86 هم الاكثر انتشارا بين 52 عينة ويتبعها ان
O142, O127, O128, O114, O44 , بنسبة 23%,21%,5%, 13.5%, 10%, 6%, 6%, 4%, 2% O124
علي التوالي.
وأوضحت نتائج اختبارات الحساسية على السلالات المختلفة للميكروب القولوني بان لها مقاومة عالية للبنسيلين والاريثروميسين والفينكوميسين بنسبة 100% ويليها الجينتاميسين والامبيسيلين والاوكسى تتراسيكلينو التريمسوبريم والنورفلوكساسين والناليديكسيك الحمضي بنسبة 83 % ،75% ،65.3% , 8
.55%,36.5%,30.7%,26.9% على التوالي. وأيضا أوضحت الدراسة أن سلالات الميكروب القولوني لها حساسية متوسطة للسفتازديم بنسبة 100% ولديها حساسية للسيبروفلوكساسين بنسبة 59.6%.
ومن ناحية أخرى لقد تم عمل اختبار التركيز القليل المحجب لنمو البكتيريا واوضحت النتائج ان العزلات لها قدرة عالية علي مقاومة الفنكومايسين والسيبروفلوكساسين. ومن ناحية أخرى لقد تم عمل اختبارتواجد الجين المسبب للمقاومة ضد الجنتمايسين والاموكسيسيلين كلوفونات اوضحت النتائج ان جميع العزلات تحتوي علي جين BlaTEM and aacC2 جين وجميع العزلات من الدجاج والانسان تحتوي علي blaOXA_1وان عدد 2 فقط من العزلات من الأنسان تحتوي علي جين blaSHV ومن ناحية اخري اسبتت نتائج التتبع الجيني ان جميع السلالات مع اختلاف المصدر لها نفس المنشا*E. Coli* str. O102-ST40.وبالنسبة الي نتائج المسحات للاسواق المصرية تاكد خلو 67 عينة من بكتيريا القولون النموذجي المفرز للسموم (vt1, vt2)

Contents

	Page
1. Introduction	**1**
2. Aim of work	**5**
3. Review of literature	**6**
4. Material and methods	**28**
4.1 Material	**28**
4.1.1. Samples	**28**
4.1.2. Material	**28**
4.1.2.1Media for isolation of *E. coli*	**28**
4.1.2.2. Media used for identification of *E. coli*	**28**
4.1.2.3. Media used for biochemical reaction	**28**
4.1.2.4. Media used for antimicrobial tests	**29**
4.1.2.5. Equipment	**29**
4.1.2.6. Biochemical kits	**30**
4.1.2.7. Diagnostic antisera	**30**
4.1.2.8. Antimicrobial susceptibility test	**31**
4.1.2.9. Reagents and chemicals	**31**
4.1.2.10. DNA primers	**32**
4.1.2.11. Material for extraction of DNA of *E. coli* samples	**33**
4.1.2.12. Equipments for extraction of nucleic acid	**33**
4.1.2.13. PCR Master Mix used for conventional PCR	**34**
4.1.2.14. DNA Molecular weight marker	**34**
4.1.2.15. Material used for agarose gel electrophoresis	**34**
4.1.2.16. Equipment used in conventional PCR	**36**
4.1.2.17. Standard strains.	**37**
4.1.2.18 Material used for VETEC screening	**37**

I

Contents Page

4.2 Methods **39**

4.2.1. Isolation of *E. coli* **39**

4.2.2. Serogrouping of *E. coli* **39**

4.2.3. Antimicrobial susceptibility test **39**

4.2.4. Resistance gene detection by PCR technique **41**

4.2.5. Sequencing for detection identity from isolates **44**

4.2.6 Screening of VTEC in the Egyptian markets **48**

5. Results **51**

5.1. Incidence of *E. coli* among the examined samples **51**

5. 2. Result of identification of the 52 *E. coli* isolates **55**

5.3. Result of Biochemical identification of 52 *E .coli* isolates **57**

5.4. Result of *E. coli* isolates by (microbact 24E) **57**

5.5. Results of serogrouping of *E. coli* isolates **61**

5.6. Results of the disc diffusion technique *E. coli* strain **70**

5.7. Results of the Minimum inhibitory concentrate (MIC) **77**

5.8. Results of Multiplex and uniplex PCR detection **80**

5.9. Results of sequencing **85**

5.10. Results of VTEC screening in the Egyptian markets **94**

6. Discussion **97**

7. Summary **107**

8. References **109**

-English abstract **-**

-Arabic summary **-**

-Arabic abstract **-**

List of abbreviations

Abbreviation	Definition
CFU	**Colony forming unit.**
ECDC	**European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority.**
HEA	**Hektoen enteric agar**
ISO	**International standard organization.**
I	**Intermediate.**
I.U	**International unit**
MIC	**Minimum inhibitory concentration.**
ONPG	**Ortho nitro phenyl beta-d-galactopyranosidel.**
R	**Resistante.**
S	**Sensitive.**
TDA	**Tryptophan deaminase.**
U.V.	**Ultra violet.**
VP	**Voges proskauer.**
VRB + MUG	**Violet red bile-4-methylumbelliferyl b-D-glucuronide.**
VTEC	**Vero cyto toxin *E. coli***
VT1	**Verotoxine 1**
VT2	**Verotoxine 2**
XLD	**Xylose lysine desoxycholate agar**