ABSTRACT

Alexandria University
Faculty of Veterinary medicine
Department of Microbiology

Author : Eman Khalifa Sedeek Khalifa Mohamed.

Degree : Doctor of Philosophy in Veterinary Sciences in Microbiology (PhD).

Specialization: Bacteriology, Mycology.

Title : Mycotic Infections in Immunocompromised Cattle with *Mycobacterium* species.

Supervisors : 1. Prof. Dr. Helmy Ahmed Torky.
Professor of Microbiology-Fac. Vet. Med., Alexandria University.
2. Prof. Dr. Abd El-Rahman Abd El-Mageed Abd El-Rahman.
Chief Researcher of Microbiology, Director of Alexandria Provincial Lab.

Key words : Bovine tuberculosis, *M. bovis*, tuberculin test, PCR, cattle, tuberculosis prevalence, visible lesions and non visible lesions, deep mycosis, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai.

Abstract :

In this study, 1350 dairy cattle, in different localities in Egypt, were tested by tuberculin test using *PPD-B*, results showed that 32 (2.4%) reacted positively. After slaughtering, the PM examination revealed 22 (68.75%) visible lesions, while 10 (31.25%) non visible lesions. Mycological examination of the 32 specimens revealed 3 (9.4%) isolates of *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, 1 (3.1%) isolate of *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, 2 (6.3%) isolates of *Aspergillus fumigatus*, and 9 (28.1%) isolates of *Candida albicans.* Single TB infection recorded in 4 (12.5%) cases, mixed TB and fungal infection reported in 13 (40.6%), while single fungal infection detected in 2 (6.3%) case. The bacteriological examination of samples from the 32 slaughtered cattle revealed the isolation and identification of 17 (53.1%) *M. bovis* isolates; of them, 16 (72.7%) from VL and 1 (10%) from NVL. Histopathological examination of the 32 specimens revealed 23 (71.9%) positive results. PCR assays performed on some tissue and randomly selected strains, identified morphologically as *M. bovis*; LCD array showed 6 (100%) positive reaction to IS6110 of *M. tuberculosis* complex, while multiplex-PCR test gave 2 (100%) positive results at 500bp fragment diagnostic for *M. bovis* and 245bp fragment diagnostic for *Mycobacterium tuberculosis* complex, then genotyping of 4 *M. bovis* used for confirmation (100%) of cultural identification. Pathogenisity test (using G. pigs) by injection of (mixed *M. bovis* and *Trichoderma pseudokoningii* Rifai*),* revealed death after 18 days from 1st injection, and PM examination showed the acceleration of the progress of TB pulmonary and hepatic granuloma, and examination of these tissues revealed *M. bovis* and *Trichoderma pseudokoningii* Rifai re-isolated and re-identified again (retro-culture), while by injection of *(Trichoderma pseudokoningii* Rifai) alone, revealed death after 24 days from 1st injection, and PM examination showed the development of pulmonary and hepatic congestion and examination of these tissues revealed *Trichoderma pseudokoningii* Rifai re-isolation and re-identification again (retro-culture), this confirmed that *Trichoderma pseudokoningii* Rifai is a pathogenic mould, that was isolated (for the first time) from tuberculous-like lesions of the tuberculous dairy cattle in Egypt.

جامعة الإسكـــــندرية
كلية الطب البيـــطري
قسم الميكروبيولوجـي

الاسم : **إيمان خليفة صديق خليفة محمد.**

الدرجة : **درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم الطبية البيطرية في الميكروبيولوجـي .**

التخصص : **بكتريا، فطريات.**

العنوان : **العدوي الفطرية في الأبقار ذات الخلل المناعي بعترات ميكروب السل.**

المشرفون : **1. الأستاذ الدكتور/ حلمي أحمد تركي.**
أستاذ الميكروبيولوجيا المتـــفرغ ، كلـية الـطـب الـبيـطري، جـامـعـة الإسـكـندريـة.
2. الأستاذ الدكتور/ عبد الرحمن عبد المجيد عبد الرحمن.
رئـيس بـحـوث المـيكروبيولوجيا، ومدير المعمل الفرعي بالإسكندرية، معـهد بـحـوث صـحة الحـيـوان.

كلمات مفتاحيـة : **السل البقري، ميكروب السل البقري، اختبـار التيوبركلين، تفاعل البلمرة المتسلسل، اللأبقار، انتشار السل، الإصابات السلية الظاهرية والإصابات السلية الغيرظاهريـة، العدوي الفطريـة الداخلية، فطر التريكودرما سودوكوننجياي ريفي.**

المستخلص :

تم في هذه الدراسة اختبار عدد 1350 بقرة حلابة، في أماكن مختلفة من جمهورية مصر العربية بإستخدام اختبار التيوبركلين (التيوبركلين البقري)، وأظهرت النتائج أن 32 (2.4%) بقرة إيجابية الاختبار تم ذبحهم، وعند إجراء الصفة التشريحية لهم وجد 22 (68.75%) إصابات سلية ظاهرية و10 (31.25%) إصابات سلية غيرظاهرية. وبالفحص الميكولوجي لعينات اللأبقار المذبوحة (32 عينة)، تم عزل و تصنيف عدد 3 (9.4%) عترات من فطر التريكودرما سودوكوننجياي ريفي، وعدد 1 (3.1%) عترة من فطر البنسيليوم أورانشيوجراسيوم ديركس، وعدد 2 (6.3%) عترة من فطر الأسبرجلس فيوميجاتس ، وعدد 9 (28.1%) عترات من خمائر الكانديدا ألبيكانز. و بالفحص البكتريولوجي لعينات اللأبقار المذبوحة، تم عزل و تصنيف عدد 17 (53.1%) عترة سل بقري، منهم 16 (72.7%) من إصابات سلية ظاهرية و 1 (10%) من إصابات سلية غير ظاهرية، ثم تم فحص التغيرات الباثولوجية الخلوية في أنسجة هذه الأبقار، والذي أظهر 23 (71.9%) إيجابية الفحص. تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل ،علي أنسجة ومعزولات من ميكروب السل اختيرت عشوائيا من المواضع المختلفة للإصابات السلية والتي تم تشخيصها ظاهريا كعترة بقرية، بطريقة (ال سي دي) حيث وجد أن الحامض النووي الخاص بالعترة السلية المعقدة IS6110 تم تحديده في 6 (100%) عينات، وكذلك بطريقة (Multiplex) والذي أظهر وجود الجين الخاص بالعترة السلية البقرية في المنطقة 500bp وكذلك وجود الحامض النووي الخاص بالعترة السلية المعقدة IS6110 في 2 (100%) عينات، وكذلك بطريقة التصنيف الجيني (Genotyping) والذي أكد النتائج السابقة في 4(100%)عترات. تم تسجيل الإصابة السلية بمفردها في 4 (40.6%) حالات، بينما وجدت العدوي المشتركة (السل و الفطريات) في 13 (40.6%) حالات، وسجلت العدوي الفطرية بمفردها في 2 (6.3%) حالة. تم عمل اختبار الضراوة (باستخدام خنازير غنيا)، عن طريق حقن العدوي المشتركة (ميكروب السل البقري و فطر التريكودرما سودوكوننجياي ريفي)، أظهرالوفاه بعد 18 يوم من العدوي الأولي، وبإجراء الصفة التشريحية وجد سرعة ظهور التغيرات الباثولوجية لمرض السل البقري الجهاز التنفسي و الكبد، وبفحص هذه الأنسجة، تم عزل وتصنيف ميكروب السل البقري و فطر التريكودرما سودوكوننجياي ريفي مرة أخري، بينما عن طريق حقن (فطر التريكودرما سودوكوننجياي ريفي) بمفرده أظهرالوفاه بعد 24 يوم من العدوي الأولي، وبإجراء الصفة التشريحية وجد ظهور تغيرات باثولوجية في الجهاز التنفسي و الكبد، وبفحص هذه الأنسجة، تم عزل وتصنيف فطر التريكودرما سودوكوننجياي ريفي مرة أخري، والذي يؤكد ضراوة هذا الفطر الذي تم عزله (ولأول مرة) من الإصابة السلية في الأبقارالمصابة بالسل البقري في جمهورية مصر العربية.

TABLE OF CONTENTS

PAGE

ACKNOWLEDGEMENT……....I

TABLE OF CONTENTS……...…….II

LIST OF TABLES……..……V

LIST OF FIGURES…….……VII

LIST OF PHOTOS……....IX

LIST OF ABBREVIATIONS……XI

1. INTRODUCTION……..1

2. REVIEW OF LITERATURE……...…5

2.1. Associated systemic mycosis…….....5

2.1.1. Prevalence of fungi in systemic mycosis…….…...5

2.1.1.1. *Trichoderma* species…….……5

2.1.1.1.1. Pathogenicity of *Trichoderma*…….....7

2.1.1.2. *Candida*, *Aspergillus* and other fungal species…….....7

2.2. Tuberculosis……...……11

2.2.1. Some benchmarks in tuberculosis……..11

2.2.2. Incidence of bovine tuberculosis in cattle……..……12

2.2.3. Detection of mycobacterium infection in cattle……..13

2.2.3.1. Tuberculin skin test……..……13

2.2.3.2. Post mortem findings ……..……14

2.2.3.3. Bacteriological examination of mycobacteria…….16

2.2.3.4. Histopathological diagnosis (H&E) of bovine tuberculosis……17

2.2.3.5. Molecular diagnosis of bovine tuberculosis by PCR…….....17

2.2.4. Experimental infection of *M. bovis*……...…..20

3. MATERIAL AND METHODS……...22

3.1. Materials…….....22

3.1.1. Animals ……...22

3.1.2. Samples……...22

3.1.2.1. Lymph node samples…….....22

3.1.2.2. Tissue (organs) samples……...……22

3.1.3. Materials used for application of tuberculin test…….22

3.1.4. Mycological examination…… 22

3.1.4.1. Media used for mycological isolation…….22

3.1.4.2. Stain used for mycological identification……...22

3.1.4.3. Yeast identification……..23

3.1.4.3.1. Media used for yeast identification…….….23
3.1.4.3.1.1. Rice agar medium……..23
3.1.4.3.1.2. Medium for sugar fermentation…….....23
3.1.4.3.2. Biological reagent (rabbit serum)……23
3.1.4.3.3. Primers used for identification of *C. albicans*……23
3.1.5. Bacteriological examination……23
3.1.5.1. Materials used for staining of acid fast bacilli by ZN stain…….....23
3.1.5.2. Materials and reagents used in isolation of mycobacteria……23
3.1.5.2.1. Materials used for preparation of tissue for bactereiologi...
-cal examination……..23
3.1.5.2.2. Media used for isolation of acid fast bacilli…….....24
3.1.6. Materials used for PCR……...24
3.1.6.1. Tissue and isolates……...24
3.1.6.2. Materials used for Chipron Myco direct 1.7 LCD-array…….24
3.1.6.3. Buffer and reagent used for tissue preparation and DNA extraction..
from tissue and isolates…….25
3.1.6.4. Bio ready Taq Pac……...…….....25
3.1.6.5. Deoxynucleotide mix (dNTPs)…….....26
3.1.6.6. Q-solution 5X……..…….26
3.1.6.7. Oligonucleotide primers……..26
3.1.6.7.1. Primers used for M-PCR……..…26
3.1.6.7.2. Primers used for genotyping of *M. bovis*…….…....26
3.1.6.8. Buffers and reagents used for agarose gel electrophoresis…….....26
3.1.7. Equipment and instruments…….....27
3.1.8. Materials used for histopathological examination (H&E)…….....27
3.1.8.1. Buffered neutral formalin 10% (1 liter)…….…….27
3.1.8.2. Solutions and reagents…….....27
3.1.9. Pathogenicity test…….28
3.2. Methods……..28
3.2.1. Single intradermal cervical tuberculin skin test (SICTT)……..……28
3.2.2. Post mortem examination and collection of tissue samples……..…….28
3.2.3. Mycological examination of the collected samples…….…..….28
3.2.3.1. Isolation and identification of mould…….…….28
3.2.3.1.1. Isolation of mould…….…….....28
3.2.3.1.2. Identification of mould…….....29
3.2.3.1.2.1. Macroscopical characteristics of mould….……29

3.2.3.1.2.2. Microscopical characteristics of mould….....29
3.2.3.2. Isolation and identification of yeast…….…...29
3.2.3.2.1. Isolation of yeast…….....29
3.2.3.2.2. Identification of yeast…….....29
3.2.3.2.2.1. Macroscopic characteristics of yeast…….……29
3.2.3.2.2.2. Microscopic characteristics of yeast…….....29
3.2.3.2.2.3. Culturing onto rice agar…….....29
3.2.3.2.2.4. Biochemical tests for yeast identification….....29
3.2.3.2.2.5. PCR identification of *C. albicans* …….....29
3.2.4. Bacteriological examination of the collected samples…….……..30
3.2.4.1. Preparation of samples……..……...30
3.2.4.2. Identification of isolates (acid-fast bacilli)…….……....30
3.2.4.2.1. Morphological characters……..……...30
3.2.4.2.2. Microscopical examination……..……30
3.2.4.2.3. Rate of growth……...31
3.2.4.2.4. Effect of light on pigment production……..31
3.2.4.2.5. Growth at different temperature degrees……..31
3.2.4.2.6. Direct identification of acid fast bacteria (*M. bovis*) using. fast molecular PCR techniques applied on tissue and obta--ined culture…….……31
3.2.4.2.6.1. DNA extraction from tissues and Bacterial cultu--re……...31
3.2.4.2.6.2. LCD array……...32
3.2.4.2.6.3. M-PCR……....35
3.2.4.2.6.4. Genotyping of the 4 *M. bovis* strains…….....35
3.2.5. Histopathologicl examination…….....35
3.2.5.1. Histopathological findings……..…....36
3.2.5.2. Procedures of histopathological examination…….…....36
3.2.6. Pathogenicity test…….....36
3.2.6.1. Mixed (*M. bovis* and *Trichoderma*) infection…….…….37
3.2.6.2. Single (*Trichoderma*) infection…….....37
4. RESULTS……..38
5. DISCUSSION……....86
6. SUMMARY……..97
7. REFERENCES……...100
8. ARABIC SUMMARY……....118

LIST OF ABBREVIATIONS

A.	: *Aspergillus*.
AFB	: Acid fast bacilli.
AUMC	: Assiut University Mycological Center.
BCG	: Bacillus Calmette-Guérin.
BTB	: Bovine tuberculosis.
bp	: Base pair.
C.	: Candida.
C	: Degree centigrade.
CCT	: Cattle to cattle transimission.
CFU	: Colony Forming Unit.
DNA	: Deoxyribonucleic acid.
DTH	: Delayed-type hyperseneitivity.
DW	: Distilled water.
EBr	: Ethedium bromide.
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid.
g	: Gram.
GOVS	: General Organization for the Veterinary Services.
HCL	: Hydrchloric Acid.
hr/s	: Hour/s.
IS6110	: Insertion Sequence 6110.
ITT	: Intradermal tuberculin Test.
KDa	: Kilo Dalton.
LCD	: Low Cost and Density.
L.J	: Lowenstein-Jensen.
L.N/s	: Lymph node/s.
M.	: *Mycobacterium*.
mg	: Milligram.
µg	: Microgram.
µl	: Microliter.
ml	: Milliliter.
min.	: Minute(s).
MIRU	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Units.
MOTT	: Mycobacterium other than tuberculosis.
MPB64	; Mycobacterium Protein of *M. bovis* 64.
MTBC	: *Mycobacterium Tuberculosis*- complex.
m-PCR	: Multiplex-PCR.
N-PCR	: Nested-PCR.
no.	: Number.
NVL	: Non Visible Lesions.
OIE	: Office International des Épizooties.
P.	: *Penicillium*.
PCR	: Polymerase Chain Reaction.

PM	: Post-mortem.
PMI	: Pulmonary mycotic infection.
PPD	: Purified protein derivative.
PPD-B	: Bovine purified protein derivatives (*M. bovis*-PPD).
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism.
R.	: *Rhizopus*.
RD	: Region of differences.
T.	: *Trichoderma*.
TCH	: Thiophene 2- carboxylic acid hydrazide.
rRNA	: Ribosomal Ribonucleic acid.
rpm	: Round per minute.
SIT	: Single intradermal test.
SITT	: Single intradermal tuberculin test.
TB	: Tuberculosis.
TLA	: Tin Layer Agat.
VL	: Visible Lesions.
VNTR	: Variable Numbers of Tandem Repeats.
WHO	: World Health Organization.
ZN	: Ziehl-Neelsen.