| | |
|---|---|
| Author : | Ahmed Mohamed Rashed El-Deweny |
| Title : | **Phenotypic and genotypic identification of *E.coli* strains isolated from broilers** |
| Faculty : | Veterinary Medicine - Suez canal University |
| Department : | Bacteriology, Mycology and Immunology |
| Location : | Ismailia |
| Degree : | Master of Veterinary Medical Science |
| Language : | English |
| Supervision committee: | **Prof. Dr.\ Mahmoud Ezzat El-Sayed.**<br>**Professor of Microbiology**<br>**Faculty of Veterinary Medicine - Suez canal University**<br>**Prof. Dr.\ Abo Elkheir Mohamed Ibrahim Esawy**<br>**Professor of Microbiology**<br>**Animal Health Research Institute- Mansoura branch, Dakahlia Governorate.** |
| Abstract : | In this study bacteriological examination of 1200 samples collected from 200 birds( recently dead, diseased and apparent healthy broilers) revealed that E. coli isolates was recovered from 842 samples with overall prevalence 70.16%. Incidence of positive *E.coli* from fresh heart blood samples is 75%, from liver 83% from kidney64%, from spleen 57%, from small intestine74.5% and from bone marrow 67.5 % . The culture characteristic of E. coli isolates on different media showed pink colonies on MacConkey media, yellow on XLD and green metallic colonies on EMB medium. The biochemical identification revealed that 90 % of suspected isolates were biochemically identical to typical E. coli features. Serological identification of randomly selected E. coli (20) isolates clarified that, one E. coli isolate was serotype $O_{111}$, one was $O_{44}$, one was $O_{55}$, two were serotyped $O_{142}$, two were serotyped $O_{128}$, two were serotyped $O_{158}$, three were serotyped $O_{157}$, four were serotyped $O_{29}$ and four were serotyped $O_{115}$. Ampicillin, Neomycin, Doxycycline and Oxytetracycline were found to be the most encountered antimicrobials tested while ciprofloxacin and Erythromycin were the most effective antimicrobial drugs against the isolates. PCR assay was carried out on six serovars ($O_{142}$, $O_{29}$, $O_{115}$, $O_{158}$, $O_{128}$ and $O_{157}$) to detect the presence of *phoA*, *iss* and *iutA* gene, All serovars had the three genes except ($O_{29}$) not possess *iss* gene. |

| | |
|---|---|
| الاسم : | أحمد محمد راشد الضوينـى |
| عنوان الرسالة : | **التصنيف الظاهرى و الجيني لعترات الإكـولاى الـمعزولة من بدارى التسمين** |
| الكلية : | كلية الطب البيطري - جامعة قناة السويس |
| القسم العلمى : | قسم البكتريا و المناعة و الفطريات |
| موقع الكلية : | الاسماعيلية |
| الدرجة العلمية : | ماجستير الفلسفة فى الغلوم الطبية البيطرية |
| لغة الرسالة : | الانجليزية |
| أسماء هيئة الاشراف : | **الأستاذ الدكتور/ محمود عزت السيد**<br>أستاذ الميكروبيولوجى - كلية الطب البيطري - جامعة قناة السويس<br>**الأستاذ الدكتور/ أبو الخير محمد إبراهيم عيسوى**<br>أستاذ الميكروبيولوجى - **بمعهد بحوث صحة الحيوان - فرع المنصورة – محافظةالدقهلية** |
| الملخص : | فى هذه الدراسة تم إجراء فحوصات بكتيرية لـ ١٢٠٠ عينه تم جمعها من ٢٠٠ طائر من بدارى التسمين ( سليم ظاهريا - مريض - حديث النفوق) والتى أظهرت عزل الميكروب القولونى الإكولاى من ٨٤٢ عينة بنسبة ٧٠.١٦%. وكانت نسبة العزل من الدم من القلب ٧٥% ، و من الكبد ٨٣ % ، و من الكلية ٦٤ %، ومن الطحال ٥٧ % ، ومن الأمعاء الدقيقة ٧٤.٥ % ، و من نخاع العظام ٦٧.٥ % . و كانت خصائص المزروعات من عترات الميكروب القولونى الإكولاى المعزوله من بدارى التسمين على الأوساط المختلفة أنها تظهر باللون البمبى على (MacConkey media) و باللون الأصفرعلى (XLD)وباللون الأخضر اللامع على (EMB). كما أوضحت الإختبارات الكميائية أن ٩٠ % من العترات المعزولة تتطابق مع خصائص الميكروب القولونى كميائيا.و باجراء التصنيف السيرولوجي لعشرين عزلة من عزلات الميكروب القولونى الإكولاى المعزولة من عينات الدواجن أوضحت النتائج أن المعزولات تشمل عترة واحدة من $O_{111}$، عترة واحدة من $O_{44}$، عترة واحدة من $O_{55}$، عترتان من $O_{142}$، عترتان من $O_{128}$، عترتان من $O_{158}$، ثلاثة عترات من $O_{157}$، أربع عترات من $O_{29}$، أربع عترات من $O_{115}$. و قد وجد ان الإمبيسيلين و النيومايسين و الدوكسى سيكلين و الأوكسى تتراسيكلين كانوا أقل تأثيرا على المعزولات فى حين أن السيبروفلوكساسين و الإرثرومايسين أكثر المضادات الحيوية تاثيرا علي المعزولات. كما تم اجراء اختبار إنزيم البلمرة المتسلسل التعددي لستة من المعزولات الأتية:<br>($O_{142}$, $O_{29}$, $O_{115}$, $O_{158}$, $O_{128}$, $O_{157}$) تبين وجود الثلاث جينات (phoA, iss and iutA ) فى جميع العترات باستثناء جين ( iss) غير موجود فى عترة $O_{29}$. |

# List of contents


| Items | Page |
|---|---|
| **Introduction** | 1-4 |
| **Review of literature** | 5-37 |
| Prevalence of pathogenic *E. coli* in chickens | 5 |
| Isolation and Identification of *E. coli* isolates | 10 |
| Conventional methods for identification of *E. coli*: | 10 |
| serotyping of isolated *E.coli* | 12 |
| Sensitivity of *E. coli* to antibiotics | 17 |
| Virulence genes of APEC | 20 |
| PCR for detection of *E. coli* virulence genes | 25 |
| Pathogenicity of the E.coli in chicks | 37 |
| **Materials and Methods** | 40-66 |
| **Materials** | 40 |
| Examined samples | 40 |
| Media | 41 |
| Media used for isolation and identification of E. coli isolates | 41 |
| Media used for the biochemical identification of E. coli | 43 |
| Chemicals and reagents used for biochemical identification | 45 |
| Stain used | 46 |
| Material used in the Api20E system for the biochemical Identification of E. coli strains | 46 |
| Material used in the serological identification of E. coli isolates. | 47 |
| Media used for the antibiogram assay | 48 |
| Material used for extraction of DNA | 48 |
| Equipment and apparatuses used for extraction of nucleic acids | 49 |

| | |
|---|---|
| PCR Master Mix used for cPCR | 49 |
| Oligonucleotide primers used in cPCR | 49 |
| DNA Molecular weight marker | 50 |
| Material used for agarose gel electrophoresis | 50 |
| Equipment and apparatuses used in cPCR | 51 |
| Material used for pathogenisity test | 52 |
| **Methods** | 53 |
| Collection of the samples | 53 |
| Isolation and identification of the *E. coli* isolates | 53 |
| Detection of *E. coli* suspected colonies | 54 |
| Serological identification of *E. coli* isolates | 60 |
| Antibacterial sensitivity testing | 62 |
| Molecular identification | 63 |
| Pathogenesity test | 66 |
| **Results** | 67 |
| **Discussion** | 85 |
| **Summary** | 91 |
| **Conclusion** | 93 |
| **References** | 95 |
| **Arabic Summary** | 1-2 |

# List of abbreviations

| | |
|---|---|
| **AMP** | Ampicillin |
| **APEC** | Avian pathogenic *Escherichia Coli* |
| **astA** | Enteroaggregative toxin |
| **BPW** | Buffered peptone water |
| **CIP** | Ciprofloxacin |
| **CN** | Gentamycin |
| **CNF1 and CNF2** | Cytotoxic necrotizing factors 1 and 2 |
| **CRD** | Chronic respiratory disease |
| **CT** | Colistin |
| **cva/cvi** | Colicin V plasmid operon genes |
| **DAEC** | Diffusely adhering E. coli |
| **DO** | Doxycycline |
| **E** | Erythromycin |
| ***E. coli*** | *Escherichia coli* |
| ***eae*A** | attaching and effacing mechanisms |
| **Eagg** | Enteroaggregative mechanisms |
| **EAggEC** | Enteroaggregative E. coli |
| **EHEC** | Enterohemorrhagic E. coli |
| **EIEC** | Enteroinvasive E. coli |
| **EMB** | Eosin methylene blue |
| **Eniv** | Enteroinvasive mechanisms |
| **EPEC** | Enteropathogenic E. coli |
| **ETEC** | Enterotoxigenic E. coli |
| **F** | Fimbriae |
| **Ffc** | Florfenicol |
| **g** | Gram |
| **GMAC** | Gentiobiose MacConkey's medium |
| **h** | hours |
| **HC** | Hemorrhagic colitis |
| **HUS** | Hemolytic uremic syndrome |
| **I** | Intermediate |
| **IMVC** | Indole, Methyl red, Voges Proskauer, Simmon's citrate reactions |
| **irp2** | Iron-repressible protein |
| ***iss*** | *increased serum survival gene* |
| **iucD** | Aerobactin |
| ***iutA*** | *Iron uptake transport gene* |
| **L** | liter |
| **LEE** | Locus of enterocyte effacement |

| | |
|---|---|
| **L.F** | Lactose fermenter |
| **LPS** | Lipopolysaccharide |
| **LT** | Heat-labile enterotoxin |
| **MBC** | Minimum bactericidal concentration |
| **MBP** | maltose-binding protein |
| **mg** | Milligram |
| **MIC** | Minimum inhibitory concentration |
| **ml** | Milliliter |
| **MR** | Methyl red |
| **MR-VP** | Methyle red-Voges Preskauer |
| **N** | Neomycin |
| **N.L.F** | Non lactose fermenter |
| **No.** | Number |
| **Omp1** | Outer membrane protease |
| **OT** | Oxytetracycline |
| **papC** | P-fimbriae |
| **PCR** | Polymerase Chain Reaction |
| **PFGE** | Pulsed field gel electrophoresis |
| ***phoA*** | *Bacterial alkaline phosphatase* |
| **R** | Resistant |
| **rpm** | Round per minutes |
| **S** | Sensitive |
| **s** | Streptomycin |
| **SHS** | Swollen head syndrome |
| **SMAC** | Sorbitol MacConkey's medium |
| **SPP** | Species |
| **ST** | Heat-stable enterotoxin |
| **STEC** | Shiga toxin-producing E. coli |
| **TSB** | Tryptic soy broth |
| **tsh** | Temperature sensitive haemagglutination |
| **V** | **variable** |
| **vat** | Vacuolating autotransporter toxin |
| **VCA** | Vero cell assay |
| **VT1** | Vero toxin 1 |
| **VT2** | Vero toxin 2 |
| **VT2e** | Vero toxin 2e |