ABSTRACT

Cairo University
Faculty Of Veterinary Medicine
Department Of Microbiology

Title of thesis : **Molecular characterization of virulence and antibiotic resistant genes among Salmonella isolated from different sources.**

Thesis for Ph. D. Degree In (Bacteriology , Immunology and Mycology)

Supervisors :
Prof.Dr. Jakeen Kamal Abdel Haleem El Jakee
Professor of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine Cairo University
Dr. Soumaya El- sayed Ahmed El-sayed El-shafii
Chief Researcher Bacteriology Department Animal Health Research Institute

ABSTRACT

In the present study *Salmonella* species were isolated from pigeon, where 5 isolates (1.8%) were identified as *S. enterica* subsp. Typhimurium and 2 isolates (0.7%) of *S. enterica* subsp. Enterititdis out of 280 total samples of apparently healthy and diseased pigeon. *S. enterica* subsp. Joal were isolated (5.9%) and followed by *S.* Typhimurium (4.9%), *S.* Enteritidis (2.9%) and *S.* Kentucky (1.96%) from chicken. *S.*Typhimurium, *S.* Enteritidis and *S.* Paratyphi A were isolated (4% each) and *S.* Paratyphi B isolated (2%) from stool samples of children. Sensitivity to antibacterial drugs revealed that 50% of isolates were sensitive to cefixime, 46.5% to enrofloxacin, chloramphenicol (40%), cephalothin and cefadroxil (36.7 %each). While isolates were resistant to many of antibacterial as sulfa/trimethoprim (93.3%), nalidixic acid and amikacin (90% each), gentamicin (86.7%), ampicillin and neomycine (83.3% each) and erythromycin (80%). In the present study all *Salmonella* strains

amplified 284bp fragment of *invA* gene except *S.* Paratyphi B. The presence of *flic* gene (flagellin gene) was harbored by all *S.* Typhimurium isolates . Using multplix PCR, plasmid-mediated *AmpC* β-lactamases genes were investigated .14 isolates of *Salmonella* serovars harbor *LAT*-1 to *LAT*-4, *CMY*-2 to *CMY*-7, *BIL*-1, Seven isolates harbor *DHA*-1, *DHA*-2, While 7 isolates harbor MIR-1T ACT-1.

Keywords: *Salmonella*Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Joal, *Salmonella*Kentuckey *S.* Paratyphi A and *S.* paratyphi B,Beta-lactamase

المستخلص العربي

جامعة القاهرة

كلية الطب البيطري

قسم الميكروبيولوجي

الاســـم : ط ب / نجلاء فتحي قرني طلبة

دكتوراه : ٢٠١٥

عنـــوان الرســـالة : التوصـيف الجزيئـي لجينـات الضـراوة والمقاومـة للمضـادات الحيوية في السالمونيلا المعزولة من مصادر مختلفة

تحـت إشـراف : أ.د . جـاكين كمـال عبـد الحلـيم الجـاكي– أسـتاذ الميكروبيولوجيـا كلية الطب البيطري – جامعة القاهرة

د . سـمية السـيد أحمـد السـيد الشـافعي – رئـيس بحـوث – قسـم البكتريولـوجي – معهد بحوث صحة الحيوان

المستخلص العربي

فـي هـذه الدراسـة تـم عـزل معـزولات السـالمونيلا مـن الحمـام حيـث انـه تـم عــزل ٥ عتــرات بنســبة عــزل ١.٨% مــن الســالمونيلا تــايفيميوريم و عــدد ٢ معــزولات مــن ســالمونيلا انترتيــدس بنســبة ٠.٧% مــن اجمــالى ٢٨٠ عينــه مــن الحمام السليم ظاهريا والمريض.

وقــد وجــد أنـــه اعلـــي نســبة عـــزل للســالمونيلا تــايفيميوريم والســالمونيلا أنترتيــدس كانـــت فـــي الحمـــام المـــريض مـــن الأعضـــاء الداخليـــة وهـــى ٢.٩% و١.٤% علـــي التـــوالي. تـــم عـــزل الجـــوال بنســـبة ٥.٩%، ســـالمونيلا تـــايفيميوريم بنســبة٤.٩% والســالمونيلا انترتيــدس بنســبة ٢.٩% والســالمونيلا كنتــاكي بنســبة ١.٦% مــن الــدجاج. وايضــا تــم عــزل ســالمونيلا تــايفيميوريم وســالمونيلا أنترتيــدس وســـالمونيلا باراتيفـــايِ A (٤%) والســـالمونيلا باراتيفـــايB (٢%) مـــن بـــراز الأطفـال. أثبتـت نتـائج اختبـار الحساسـية لعتـرات السـالمونيلا للمضـادات الحيويـة أن ٥٠% مـــن العتـــرات حساســـه للسيفيكســـيم و٤٦.٥% للأنروفلوكساســـين و٤٠% للكلورامفنيكــول و ٣٦.٧% لكــل مــن السيفالوســين والسيفادروكســيل بينمــا اظهــرت النتـــائج مقاومـــة المعـــزولات للعديـــد مـــن المضـــادات البكتيريـــه حيـــث وجـــد أن ٤٣.٣%مـن المعـزولات كانـت مقاومـه للسـلفا و ٩٥% لكـل مـن نالبديكسـيك أسـيد والأميكاســـين و٨٦.٧% للجينتاميســـين و ٨٣.٣% لكـــل مـــن الأمبيســـيلين والنيوميســين و ٨٠% مــن المعــزولات مقاومــه للأريثروميســين. وأثبــت اختبــار تفاعـل البلمـره المتسلسـل أن كـل العتـرات حاملـه لجـين الاختـراق (*invA*) مـا عـدا ســالمونيلا باراتيفــايB. ووجــد جــين الفلاجــيلا (*fliC*)موجــود فــي ١٢ عتــره مــن السالمونيلا تايفيميوريم فقط .

باســتخدام اختبــار تفاعــل البلمــره المتسلســل المتعــدد لجينــات البيتالاكتــاميز لـــوحظ أن : ١٤ عتـــره للســـالمونيلا إيجابيـــه لجينـــات (LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1).و ٧ عتــرات تحتــوي علــى DHA-1, DHA-2 بينمـــا ٧ عتـــرات ايجابيـــه لجينـــات MIR-1T ACT-1. وقـــد نوقشـــت النتـــائج بالتفصيل.

LIST OF ABBREVIATIONS

BG	**Brilliant green agar**
BPW	**Buffered peptone water**
DDW	**Double distilled water**
ESBLS	**Extended-spectrum beta-lactamases**
***fli*C**	**Flaggeler gene C**
H	**Hour**
H_2S	**hydrogen sulfide**
***inv*A**	**Invasion gene A**
MKTTn broth	**Muller – Kauffmann tetrathionate novobiocin broth**
NCCLS	**National Committee for Clinical Laboratory Standards disk diffusion technique**
No.	**Number**
PBS	**Phosphate buffered saline**
PCR	**Polymerase Chain Reaction**
PMABLs	**Plasmid-mediated *ampC* β-lactamases**
RV	**Rappaport vassilidis**
S.S media	***Salmonella*-Shigella agar**
SDS	**Sodium dodecyl sulfate**
SE	***Salmonella* Enteritidis**
SJ	***Salmonella* Joal**
SK	***Salmonella* Kentucky**

ST	***Salmonella* Typhimurium**
TAE	**Tris acetate EDTA**
TSI	**Triple Sugar Iron agar medium**
TT	**Tetrathionate broth**
XLD	**Xylose lysine deoxycholate**

LIST OF CONTENTS

Titles	Pages
1. INTRODUCTION	**1**
2. REVIEW OF ITERATURE	**5**
2.1 *Salmonella* species in pigeon	**5**
2.2 *Salmonella* among chickens	**11**
2.3 *Salmonella* in Humans	**19**
2.4 Virullance genes of *Salmonella* species	**25**
2.4.1 Invasive genes	**25**
2.4.2. *Salmonella* flagellin (*fliC*) gene	**32**
2.5 Susceptibility of *Salmonella* species to chemotherapeutic agents	**41**
2.6 *Salmonella* multidrug resistant genes	**46**
3. Materials and Methods	**62**
3.1. Material	**62**
3.1.1. Samples	**62**
3.1.2 Media	**63**
3.1.3 Chemicals and reagents used for biochemical identification	**64**
3.1.4 Gram`s Stain	**65**
3.1.5 Diagnostic *Salmonella* antisera	**65**
3.1.6. Antimicrobial agents. (Oxoid)	**65**
3.1.7. Chemicals for plasmid DNA Extraction	**65**

3.1.8. Reagents used for polymerase chain reaction	**66**
3.1.9. Oligonucleotide primer used	**66**
3.1.10. Materials, buffer and reagent used for agarose gel electrophoresis	**68**
3.1.11. Equipment	**69**
3.2. Methods	**70**
3.2.1 Isolation and identification of *Salmonella* species	**70**
3.2.2. Biochemical identification	**71**
3.2.3. Serotyping of *Salmonella* isolates	**71**
3.2.4. Antimicrobial Sensitivity test	**72**
3.2.5. PCR for detection of *Salmonella* virulent genes	**75**
3.2.6. Multiplex PCR for amplification of βlactams multidrug resistance from the plasmid DNA of *Salmonella*	**77**
3.2.7. Agarose Gel Electrophorses	**78**
4. Results	**80**
5. Discussion	**103**
6. Conclusion	**115**
7. Summary	**117**
8. References	**120**
9. Arabic Summary	

LIST OF TABLES

Number	Title	Page
1	**Source and types of samples**	62
2	**Primers sequences for the selected virulence genes of *Salmonella* serovars**	67
3	**Primers sequences for the β-lactams multidrug resistance genes**	67
4	**Interpretation zone diameter of the antimicrobial discs**	74
5	**Biochemical characterization of *Salmonella* isolates**	82
6	**Total No. of *Salmonella enterica* serovars isolated from the examined samples**	83
7	**Antigenic structure of the isolated *Salmonella* serovars**	84
8	**Occurrence of salmonellae among the examined samples.**	85
9	**Occurrence of *Salmonella* serovars in pigeon**	86
10	**Occurrence of *Salmonella* serovars in chickens**	87
11	**Occurrence of *Salmonella* serovars in children**	88

Number	Title	Page
12	**Antibiograms of *S. enterica* serovar Typhimurium**	91
13	**Antibiograms of *S. enterica* serovar Enteritidis**	92
14	**Antibiograms of *S. enterica* serovar Kentucky**	93
15	**Antibiograms of *S. enterica* serovar Joal**	94
16	**Antibiograms of S. *enterica* serovar Paratyphi A**	95
17	**Antibiograms of *S. enterica* serovar Paratyphi B**	96
18	**Antibiograms of different serovars**	97
19	**Results of the amplified PCR products of drug resistance *AmpC* genes using a multiplex PCR.**	100
20	**Characterization of the isolated *Salmonella enterica* serovars**	102

LIST OF PHOTOGRAPHS

Number	Title	Page
1	**Morphological charcters of *Salmonella* isolates on different specific media .**	80
2	**API 20E results for *Salmonella* isolates**	81
3	**Antibiogram study of *Salmonella* isolates.**	90
4	**Agarose gel electrophoresis of PCR amplified product of *invA* gene (284bp).**	98
5	**Agarose gel electrophoresis of PCR amplified product of *flic* gene (599 bp).**	99
6	**Agarose gel electrophoresis of PCR amplified product of drug resistance *AmpC* genes by a multiplex PCR.**	101