

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I would like to thank all of those who their encouragement and support was essential during to start and complete this research and study. In particular, I would like to thank the following individuals:

Prof. Dr. Hisham Ismail Seri, my supervisor for his tremendous support, advice, and supervision throughout the process of research and thesis writing.

My thanks are also due to Dr. Ahmed Elemam Mohamed Elhaj, my Co-supervisor for his assistance on the scientific and technical part of the study, it was honour for me to collaborate and work alongside.

Special thanks are due to Professor Ali Fadelelmula Mohamed for his unconditional support from the initial stage of this study up to the final outcome, his generosity of knowledge sharing and teaching is an indication of his character as a serious teacher, has taught a great deal.

I would like to thank all of those who their encouragement and support was essential during the start and complete of this research work and study.

Above all, praise is to Allah, the Compassionate, and the most Merciful for giving me the health and strength to carry out this work.

## ABSTRACT

This study was carried out to report on the microbial causes and the sensitivity of the isolates obtained from clinical mastitis cases in ewes and does to antibiotics. A total of fifty one mastitic milk samples (41 from ewes and 10 from does) were collected during December 2014 and April 2015, from mutton-type sheep flocks and lactating goat flocks. General clinical examination of animals was conducted (including udder palpation) to detect clinical mastitis. California mastitis test (CMT) was used to determine clinical mastitis. Results obtained showed that 39 (76.47%) of samples were positive in CMT test. Bacteriological examination resulted in 16 isolates obtained from CMT positive cultured samples out of 39 positive samples (41%) Then, the isolates were confirmed using VITEK<sup>®</sup>2 system for identifying sub-species genera. Bacteriological examination resulted in occurrence rate of 40%, and 29.26% in goats and sheep, respectively. The Pathogenic bacteria organisms were isolated from 31.37 % of all mastitic mammary glands secretion (51 samples). The main identified bacterial species were: *Enterobacter aerogenes* 31.25% (the highest incidence rate), *Staphylococcus aureus* (6.25%), *Streptococcus ssp* (12.5%) and *Escherichia coli* (6.25%), these organisms considered as predominant causative agents, in addition to other less common causative agents. On the basis of sensitive, moderate sensitivity and resistance nature sensitivity test of the causative bacteria isolated to ten different antibiotics (available in the market and commonly used by veterinarians and owners in the treatment in field) was done. Nine out of eleven examined isolates (81.8%) were sensitive to Gentamicin with moderate sensitivity to only two isolates (18.2%) and no resistance detected to all examined isolates(0%), the two strains (5 isolates) of *Enterobacter aerogenes* were found to be sensitive to Gentamicin and Trimethoprim but the majority

(Four isolates) of them showed resistance for Ampicillin. The isolates were second sensitive to Trimethoprim (72.7%). Clindamycin, Cefoperazone, Enrofloxacin, Streptomycin, Neomycin and Tetracycline showed moderate sensitivity, while Ampicillin and Penicillin G. (27.3%), revealed low efficacy and accompanied with high resistance to Ampicillin (63.6%). Resistance of bacterial isolates to the tested antibiotics specially, Ampicillin, Tetracycline, PenicillinG and Trimethoprim seem to occur due their extensive used in the treatment of the most of infectious diseases, armadillo treatment and preventive programs. It is to be concluded that VITEK<sup>®</sup>2 system used in this study represented a valuable tool for bacteriological examination of mastitis in sheep and goats.

## المستخلص

أجريت الدراسة الحالية بغرض دراسة المسببات البكتيرية لالتهاب الضرع الظاهري (الإكلينيكي) في الضان و الماعز و اختبار حساسية البكتريا المسببة المعزولة للمضادات الحيوية. تم جمع إجمالي واحد وخمسين عينة حليب في الفترة من ديسمبر 2014م إلى ابريل 2015م بواقع واحد و أربعون (41) عينة حليب من قطاعان الضان بمزارع إنتاج اللحوم و عشر (10) عينات حليب من قطاعان الماعز بمزارع إنتاج الحليب . تم إجراء الفحص الإكلينيكي العام علي الحيوانات (المصحوب باستخدام الجس اليدوي للضرع) المشتبه إصابته بالالتهاب ظاهريا". و من ثم تم إجراء اختبار كاليفورنيا الحقلية عليها، وأظهرت النتائج ايجابية تسع و ثلاثون (39) عينة بنسبة مئوية بلغت 76,47%. أظهرت نتائج الفحص المعملية بزراعة العينات الموجبة ( تسعة و ثلاثين عينة ) للفحص الحقلية بغرض عزل البكتيريا المسببة لالتهاب الضرع ستة عشر (16) عينة بنسبة مئوية بلغت 41%. وتم تأكيد الفحص المعملية باستخدام جهاز فايتك2 للعينات الموجبة بغرض التعرف على تحت النوع المسبب للبكتريا المعزولة ، حيث بلغت النسبة المئوية للعينات المعزولة 40% و 29,26% للماعز و الضان على التوالي مما يعني أن نسبة البكتريا المعزولة المسببة لالتهاب الضرع في إجمالي عينات الحليب المختبرة ( 51 عينة) قد بلغت 31,37%. المسببات البكتيرية المعزولة الرئيسية في الدراسة الحالية هي : الانتروباكتريا ايروجينيس بنسبة مئوية بلغت 31,25% (كأعلى معدل حدوث للإصابة بين المسببات البكتيرية المعزولة) بالإضافة للمكورات العنقودية استربتوكوكاس بنسبة 12,5% و الاستافيلوكوكس اورياس بنسبة مئوية 6.25% والايشريشيا كولاي بنسبة مئوية 6.25%. تم إجراء اختبار حساسية البكتيريا المعزولة لعشر مضادات حيوية (مختارة بحكم توفرها بالأسواق واستخدامها من قبل الأطباء البيطريين والمرين في الحقل بغرض العلاج) وأظهرت النتائج المبينة على أسس الاختبار وفق الحساسية والحساسية المتوسطة وطبيعة المقاومة أن المضاد الحيوي جنتاميسين هو الأكثر حساسية للبكتيريا المعزولة من بين المضادات الحيوية الأخرى المستخدمة في الدراسة الحالية بواقع حساسيته لتسع من أصل احدي عشرة من المسببات البكتيرية المعزولة التي تم اختبارها بنسبة مئوية بلغت 81,8% و حساسية متوسطة ضد اثنتين منهما مع عدم وجود أي مقاومة للبكتريا المعزولة ضد الجنتاميسين (0%)، حيث أظهرت النتائج حساسية الجنتاميسين لكل من عترتي الانتروباكتريا ايروجينيس الخمس المعزولة وكذلك حساسية جيدة للترايمثوبريم مع ظهور مقاومة لأغلبية عترتي الانتروباكتريا ايروجينيس المعزولة بواقع أربعة من أصل خمس للمضاد الحيوي أمبيسلين . حل المضاد الحيوي تراميثوبريم ثانياً من حيث الحساسية للمسببات البكتيرية المعزولة بنسبة مئوية بلغت (72,7%)، بينما أظهرت المضادات الحيوية كليندامايسن وسيفوفيرازون وانروفلوكونازين واسترپتومايسين ونيومايسين وتتراساكيلين حساسية متوسطة وسجل بنسلين جي حساسية أقل مع ظهور مقاومة عالية للأمبيسلين وصلت الى (63%) ، وخلصت الدراسة إلى أن المقاومة العالية التي أظهرتها المسببات البكتيرية المعزولة للمضادات الحيوية خاصة الامبيسلين والتتراساكيلين وبنسلين جي بالإضافة للترايمثوبريم نتيجة للاستخدام الكثيف لهذه المضادات الحيوية في علاج الأمراض المعدية والعلاج المظلي والبرامج الوقائية . استخدام نظام فايتك2 اظهر فعالية عالية في الفحص المعملية للمسببات البكتيرية لالتهاب الضرع الظاهري في الضان و الماعز و يعتبر أداة قيمة في تشخيص هذا المرض بدقته في تحديد المسببات و التعرف على تحت النوع المسبب في زمن وجيز لا يتعدى 3- 8 ساعات .

## List of Contents

Acknowledgements .....	i
Abstract.....	ii
Arabic abstract.....	iv
List of contents.....	v
List of Tables.....	ix
List of Figures .....	xi
Introduction .....	1
<b>Chapter One: Literature Review</b>	
1. Mastitis in sheep and goats.....	3
1.1. Definition.....	3
1.2 Types of mastitis.....	3
1.3 Incidence and aetiology of mastitis.....	4
1.4 Epidemiology.....	6
1.5 The important Causative agents of Clinical Mastitis in sheep and goats.....	9
1.5.1 Bacterial causative Agents.....	9
1.5.1.1 Gram positive agents.....	9
1.5.1.2 Gram-Negative agents.....	11
1.5.1.3 Mycoplasma species as causative agents.....	12
1.5.2 Viral agents.....	13
1.6 Diagnosis of Clinical Mastitis.....	14
1.6.1 Physical examination.....	14
1.6.1.1 Visual examination and udder Palpation.....	14
1.6.1.2 Visual Examination of Mammary glands Secretion.....	15
1.6.2 Chemical Examination.....	15
1.6.2.1 Milk tests.....	15
California Mastitis Test (CMT).....	16

	Somatic Cells Count (SCC).....	17
	Modified White Side Test (WST).....	18
1.6.2.2	Indication Papers tests.....	18
	pH indication papers.....	18
	Mastitis Card Test.....	18
1.6.3	Ultrasonographic examination.....	19
1.6.4	Endoscopic examination.....	19
1.6.5	Bacteriological Examination of Milk Samples.....	20
1.7	Factors affecting occurrence and timing of the onset of mastitis.....	20
1.7	Economic impact of mastitis.....	22
1.8	Treatment.....	23
1.8.1	Antimicrobial therapy of mastitis.....	24
1.8.1.1	Antibiotherapy of Mastitis during Lactation period.....	25
1.8.1.2	Dry-off Treatment.....	25
1.8.1.3	Antimicrobial Resistance.....	26
1.9	Vaccination.....	27
1.10	Control.....	28
1.11	Culling.....	30

## **CHAPTER TWO: Materials and Methods**

2.1	Study area.....	31
2.2	Schedule time of Study.....	31
2.3	Animals sampled.....	31
2.4	Clinical diagnosis of mastitis.....	31
2.5	Collection of milk samples.....	32
2.6	Indirect Detection of Mastitis in Sheep and Goats .....	32
2.6.1	Rapid Test: California Mastitis Test (CMT).....	32
2.7.	Bacteriological Analysis.....	32

2.7.1	Sterilization.....	32
2.7.1.1	Equipment Sterilization .....	32
2.7.1.2	Culture, media and solutions sterilization .....	34
2.7.1.3	Heat Sterilization (Flaming).....	34
2.7.1.4	Laboratory safety and hygiene.....	34
2.7.2	Preparation of Media.....	34
2.7.2.1	Nutrient agar.....	34
2.7.2.2	Blood agar.....	34
2.7.2.3	MacConkey agar.....	35
2.7.3	Culture procedure and purification.....	35
2.7.4	Gram's staining.....	35
2.7.5	Biochemical tests.....	36
2.7.5.1	Oxidation or fermentation of glucose Test (OF).....	36
2.7.5.2	Acid from carbohydrates Test.....	36
2.7.5.3	Catalase test.....	37
2.7.5.4	Coagulase test.....	37
2.7.5.5	Oxidase test.....	37
2.7.5.6	Indole test.....	38
2.7.5.7	Citrate utilization.....	38
2.7.5.8	Decarboxylase Test.....	38
2.7.5.9	Fermentation of sugars.....	38
2.7.5.10	Motility test	39
2.7.5.11	Urease test	39
2.7.5.12	Starch hydrolysis test	39
2.7.5.13	Mannitol test	39
2.7.5.14	Temperature tolerance (45 and 60°C).....	39
2.7.6	Bacteriological Identification Using VITEK <sup>®</sup> 2 compact.....	40

2.7.6.1	Reagent Cards and Culture Requirements.....	40
2.7.6.2	Suspension Preparation and inoculation.....	40
2.7.6.3	Biochemical Tests by VITEK <sup>®</sup> 2 System.....	40
<b>2.7.6.4</b>	Card sealing, incubation and reading test's results.....	43
2.7.6.5	Test Card Incubation and Reading of Results.....	43
<b>2.8</b>	Antimicrobial Sensitivity test.....	43
<b>2.8.1</b>	The Antibiotics Disc used in the Study.....	43
<b>Chapter Three: Results</b>		
3.1	Occurrence of Clinical Mastitis according to CMT.....	47
3.2	Isolation and identification of Bacterial Causes.....	47
3.2.1	Gram-positive bacteria.....	53
3.2.1.1	<i>Staphylococcus</i> species.....	53
3.2.1.2	<i>Streptococcus</i> species.....	56
3.2.1.3	<i>Enterococcus</i> species.....	58
3.2.1.4	<i>Leuconostoc</i> species.....	58
3.2.1.5	<i>Lactococcus</i> species.....	60
3.2.1.6	<i>Gardnerella</i> ssp.....	61
3.2.2	Gram-Negative bacteria.....	64
3.2.2.1	<i>Enterobacter</i> ssp.....	64
3.2.2.2	<i>E. coli</i> .....	67
3.3	Antibacterial Sensitivity.....	71
<b>Chapter Four: Discussion</b>		
4.	Discussion .....	78
	Conclusion.....	85
	Recommendations.....	85
<b>References .....</b>		<b>87</b>



## List of Tables

No.	Content	Page
2.1	Scoring SCC precipitation and Interpretation of the CMT test and Result.....	33
2.2	Biochemical Test on GP card.....	41
2.3	Biochemical Test on GN card.....	42
2.4	Results based on the Numerical Probability Calculation.....	45
2.5	Average of Diameter of Growth Inhibition Zone (ADIZ).....	46
3.1	CMT interpretation based on gel formation.....	49
3.2	Type, number and percentage of the bacterial causative isolates of Mastitis in sheep and goats.....	50
3.3	Number and percentage of positive and negative results of cultured milk samples from 41 mastitic sheep and 10 mastitic goats.....	51
3.4	Gram positive and Gram negative bacteria isolated from mastitic milk samples .....	52
3.5	Biochemical tests used for identification of <i>Staphylococcus ssp</i> .....	55
3.6	Biochemical Tests used for identification of <i>Streptococcus ssp</i> .....	57
3.7	Biochemical Tests used for identification of <i>Leuconostoc ssp</i> .....	59
3.8	Biochemical Tests used for identification of <i>Gardnerella ssp</i> .....	62
3.9	Biochemical Profile of Gram-positive Isolates from 39	

	mastitic milk samples.....	63
3.10	Biochemical Tests used for identification of <i>Enterobacter ssp.</i> .....	66
3.11	Biochemical Tests used for identification of <i>E. coli.</i> .....	68
3.12	Biochemical Profile of Gram-negative Isolates from mastitic milk samples.....	69
3.13	Probability in percentage and Confidence Level of Identified Causitive Isolates using VITEK <sup>®</sup> 2 system.....	70
3.14	The Sensitivity Tests of isolated bacteria obtained from mastitic milk samples.....	73
3.15	The Sensitivity Tests for <i>Enterobacter</i> strains and percentag.....	75
3.16	The Sensitivity Tests for <i>Leuoconostoc</i> strains and percentage.....	76
3.17	The Sensitivity Tests for <i>Lactococcus</i> strains and percentage.....	77

## List of Figures

No.	Figure	Page
3.1	Identification of clinical mastitis (%) using CMT test in sheep and goats .....	48
3.2	The growth of <i>Staphylococcus aureus</i> on Blood Agar medium.....	54
3.3	The growth of <i>Enterobacter aerogenes</i> on MacConkey Agar medium.....	65
3.4	The percentage of the Sensitivity Tests for the isolated causitive agennts .....	74