Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology
Ph. D.: 2008
Name: **Abeer Salah El- Din Moustafa EL-Bakry**
Date and country of birth: 1st July 1972- Giza
Nationality : Egyption.
Field of specialization Microbiology″ Bacteriology, Immunology and Mycology″
Degree : B.V.Sc. (1994), Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University
Diploma of Microbiology″ Bacteriology, Immunology and Mycology″ (2000), Cairo University
M.V.Sc. (2005), Cairo University
Thesis title**: ″Immunological Studies On Bovine Mastitis″**
Supervisors:
Prof. Dr. /Mahmoud Essam Hatem
Professor and Head of the Microbiology Department,Faculty of Vet. Medicine, Cairo University
Prof. Dr. /Fawzy Riad El –Seedy
Professor of Microbiology and Vice Dean of the Faculty of Veterinary Medicine, Beni Suef University
Dr. Kamil N. Mettias
Director of the Animal Reproduction Research Institute, Al-Haram, Giza

Abstract

In this study, Examination of 1408 quarter milk samples resulted in detection of subclinical mastitis in 388 of the quarter milk samples with an incidence of 27.5%. Moreover, 86 quarter milk samples showed clinical mastitis with an incidence of 6.1%. there was positive correlation between SCC and CMT, ***S. aureus*** that was the most prevalent species isolated from examined cows (63.4%) and about 9.29 % of the examined milk samples showed no bacterial isolates.The mean titer of anti ***S. aureus*** specific IgA was high level in colostrum whey (1: 3072) than milk whey (1: 240) and serum (1: 35) in all samples. While, the mean levels of anti ***S. aureus*** specific IgG and anti ***S. aureus*** specific IgM were higher in colostrum whey (1: 3840, 1: 1408) compared to serum (1: 1920, 1: 1088) and milk whey samples (1: 448, 1: 104), respectively. There was higher mean titer of anti ***S. aureus*** specific IgA associated with ***S. aureus*** than ***CNS*** infected in milk but there was no significant difference. ***S. aureus*** associated with

higher mean titer level of anti ***S. aureus*** specific IgM and IgG in milk than ***CNS***. but there was non significant difference. The high mean titer of anti ***S. aureus*** specific IgA association with subclinical mastitic milk samples in comparison with clinical ones. The level of anti ***S. aureus*** specific IgA in sera has similar same titer in clinical and subclinical mastitic samples. There was a high mean titer of anti ***S. aureus*** specific IgM and IgG level associated with clinical mastitic milk and serum samples in comparison with subclinical ones. The progressively increased the level of anti ***S. aureus*** specific IgA, IgM and IgG in milk and serum samples with increase SCC. The value of IFN- γ was higher in whey than serum. While, there was very high concentration of IFN- γ in colostrum and there was very high significant difference between level in colostrum and milk than serum. Level of IFN-γ had high concentration associated with mastitic milk and serum samples with ***S. aureus*** in comparison with ***CNS***. The level of IFN-γ had high concentration in clinical mastitic milk in comparison with subclinical ones. The progressively increased in level IFN-γ in milk and serum samples with SCC > 500,000 cells/ml was higher than in samples showing < 250,000 cells/ml. The present study recorded a positive correlation between anti ***S. aureus*** specific IgA and IFN-gamma. On the other hand, a negative correlation between anti ***S. aureus*** specific IgA and anti ***S. aureus*** specific IgM Finally , there was a negative correlation between anti ***S. aureus*** specific IgM and IFN-gamma.

جامعة القاهرة

كلية الطب البيطرى

قسم الميكروبيولوجى

رسالة مقدمة من **ط.ب./ عبير صلاح الدين مصطفى البكرى**

تاريخ وجهة الميلاد ١٩٧٢/٧/١ الجيزة.

التخصص : ميكروبيولوجيا (بكتريولوجيا & امينولوجيا& ميكولوجيا)

الدرجة بكالوريوس العلوم الطبية البيطرية - جامعة القاهرة ١٩٩٤

دبلوم الدراسة العليا (الميكروبيولوجيا البيطرية) - جامعة القاهرة ٢٠٠٠

ماجستير العلوم الطبية البيطرية - جامعة القاهرة ٢٠٠٥

عنوان الرسالة **" دراسات مناعية على إلتهاب الضرع فى الماشية"**

تحت إشراف

أ.د. / محمود عصام حاتم أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجيا كلية الطب البيطرى - جامعة القاهرة

أ.د./ فوزى رياض الصعيدى أستاذ الميكروبيولوجيا ووكيل كلية الطب البيطرى - جامعة بنى سويف

د. كميل نجيب متياس مدير معهد بحوث التناسليات الحيوانية بالهرم

المستلخص العربي

اجريت هذه الدراسة على عدد ١٤٠٨ من أرباع ضروع الأبقار وأوضحت النتائج أن ٣٨٨ ربع (٢٧،٥%) مصاب بالتهاب الضرع غير الظاهري ومن ناحية أخرى كانت الإصابة بالتهاب الضرع الظاهري في ٨٦ ربع بنسبة ٦،١%. كما وجد علاقة طردية بين العدد الكلى للخلايا الجسمية في عينات اللبن الايجابية واختبار كاليفورنيا. وكانت بكتريا ستافيلوكوكس أوريس (العنقودية الذهبية) هي السائدة في الأبقار (٦٣،٤%) وبينما لم يتم عزل أي بكتريا في ٩،٢٩% من جميع العينات.وفى هذه الدراسة كانت عياريه جلوبيولين الأجسام المناعية IgA ضد ستافيلوكوكس أوريس فى السرسوب (١: ٣٠٧٢) وهى أعلى من عياريته في اللبن(١: ٢٤٠) ومن عياريته في الدم (١: ٣٥) بينما كانت عياريه الجلوبيولينات الأجسام المناعية IgM و IgG ضد ستافيلوكوكس أوريس فى السرسوب (١: ١٤٠٨ و ١: ٣٨٤٠) على الترتيب اعلي من عيارية في الدم (١: ١٠٨٨ و ١: ١٩٢٠) و اعلي من عياريته في اللبن (١: ١٠٤ و ١: ٤٤٨) على الترتيب. كما يوجد فرق في عياريه جلوبيولينات الأجسام المناعية IgA وIgM و IgG ضد ستافيلوكوكس أوريس المنتجة فى العينات المصابة بميكروبات الستافيلوكوكس أوريس عن تلك المصابة بالستافيلوكوكس السالبة لإختبار الكوأجيوالاز غير أن هذا الفرق كان غير معنويا كما أوضحت نتائج هذه الدراسة إن عياريه جلوبيولين الأجسام المناعية IgA ضد ستافيلوكوكس أوريس قد زاد في عينات لبن الأبقار المصابة بالتهاب الضرع غير الظاهري عن عينات لبن الأبقار المصابة بالتهاب الضرع الظاهري.بينما زادت عياريه جلوبيولينات الأجسام المناعية IgM و IgG ضد ستافيلوكوكس أوريس فى عينات اللبن والدم للأبقار المصابة بالتهاب الضرع الظاهري عن تلك المصابة بالتهاب الضرع الغير الظاهري. و تبين ان عياريه جلوبيولينات الأجسام المناعية IgA وIgM و IgG ضد ستافيلوكوكس أوريس قد زادت في عينات اللبن للأبقار كلما زادت عدد الخلايا الجسمية. كان تركيز الجاما انترفيرون فى اللبن أعلى من تركيزه في الدم وأيضا كان تركيزه عالي في السرسوب . و عند دراسة تركيز الجاما انترفيرون تبين أنة قد زاد في العينات المصابة بميكروبات ستافيلوكوكس أوريس عنة في العينات المصابة بميكروب الستافيلوكوكس السالبة لاختبار الكوأجيوالازكما أوضحت نتائج هذه الدراسة إن تركيز الجاما انترفيرون قد زاد في عينات لبن الأبقار المصابة بالتهاب الضرع غير الظاهري عن تلك المصابة بالتهاب الضرع الظاهري بينما تركيزه في الدم قد زاد في عينات الأبقار المصابة بالتهاب الضرع غير ظاهري عن عينات الأبقار المصابة بالتهاب الضرع الظاهري. ووجد أن تركيز الجاما انترفيرون قد زأدت فى عينات اللبن و الدم للأبقار التي عدد الخلايا الجسمية فيها أكثر من ٥٠٠،٠٠٠خلية/مل وخلاصة ما تم الوصول إليه في هذه الدراسة انه يوجد علاقة طردية بين IgA والجاما انترفيرون و علاقة عكسية بين IgA و IgM وكذلك بين IgM و الجاما انترفيرون.

جامعة القاهرة

List of contents

No.	Title	Page
1.	Introduction.	1
2.	Review of literature.	4
2.1.	The California Mastitis Test(CMT).	4
2.2.	Somatic Cell Count (SCC).	10
2.3.	Bacteria associated with bovine mastitis.	18
2.4.	Measurement of udder health and immunoglobulins.	28
2.5.	Measurement of Interferon gamma by ELISA.	37
3.	Material and Methods.	42
3. 1.	Materials.	42
3.1.1	Animals.	42
3.1.2.	Milk samples.	42
3.1.3.	Material used for bacteriological identification.	42
3.1.3.1.	Media used for cultivation and isolation.	42
3.1.3.1.1.	Mannitol salt agar (Oxoid).	42
3.1.3.1.2.	Blood agar medium.	42
3.1.3.1.3.	MacConkey's agar medium (Oxoid).	43
3.1.3.1.4.	Edward's medium (Oxoid).	43
3.1.3.1.5.	Nutrient agar medium (Difco).	43
3.1.3.1.6.	Semisolid agar medium (0.4%).	43
3.1.3.1.7.	CAMP- Esculin test medium	43
3.1.3.2.	Media used for biochemical reactions.	43
3.1.4.	Reagent and solutions:	44
3.1.5.	Gram' stain Hucker's modification.	46
3.1.6.	Rabbit plasma for coagulase test to identify ***S. aureus***.	46

3.1.7.	**Rennin 10% solution for preparation of whey.**	**46**
3.1.8.	**Materials used for ELISA (Rejman et al., 1989).**	**46**
3.1.8.1.	**Buffer solutions.**	**46**
3.1.8.2.	**Instruments.**	**47**
3.1.9.	**Bovine IFN-γ (EASIA) (BioSource Belgium).**	**48**
3.2.	**Methods**	**50**
3.2.1.	**Collection of milk samples.**	**50**
3.2.2.	**California mastitis test (CMT).**	**50**
3.2.3.	**Somatic cell count by means of Bently Soma Counter 150 (SCC):**	**51**
3.2.4.	**Bacteriological examination.**	**52**
3.2.4.1.	**Isolation**:	**52**
3.2.4.2.	**Identification.**	**52**
3.2.4.3.	**Pure cultures of the isolates were made onto nutrient agar slants and were identified biochemically according to Quinn *et al*., (2002).**	**52**
3.2.4.4.	**Identification of specific species of mastitis microorganism.**	**53**
3.2.4.4.1.	**Identification of *Staphlococci:* N.M.C. (1996).**	**53**
3.2.4.4.1.1	**Catalase test: (Konemann *et al,* 1992)**	**53**
3.2.4.4.1.2.	**Slide Coagulase test: (Konemann *et al.,* 1992)**	**53**
3.2.4.4.1.3.	**Growth on specific media.**	**54**
3.2.4.4.2.	**Identification of *Streptococci.***	**54**
3.2.4.4.2.1.	**CAMP Esculin test: (Konemann *et al,* 1992).**	**54**
3.2.4.4.2.2.	**Catalase test.**	**54**
3.2.4.4.3.	**Identification of Gram negative rods (mainly *E. Coli*) N.M.C. (1996)**	**54**
3.2.4.4.3.1.	**Growth on MacConky agar medium.**	**54**
3.2.4.4.3.2.	**Vogas Proskauer test: (Konemann *et al.,* 1992).**	**55**

3.2.4.4.3.3.	**Indol test: (Konemann *et al,* 1992).**	**55**
3.2.4.4.3.4.	**Methyl red test: (Konemann *et al,* 1992).**	**55**
3.2.5.	**Preparation of the whey from the tested milk samples for ELISA (Carlsson *et al*., 1989):**	**56**
3.2.6.	**Preparation of the serum (Leitner *et al*., 2000).**	**56**
3.2.7.	**Preparation of *S. aureus* sonication antigen.**	**57**
3.2.8.	**Estimation of *S. aureus* specifc IgG, IgM and IgA antibodies in sera and milk (Leitner *et al*., 2000).**	**57**
3.2.9.	**Bovine IFN- γ (EASIA) procedure (BIOSOURCE)**	**58**
4.	**Results**	**60**
4. 1. Phase I	**Collection of milk and blood samples from healthy and mastitic cows as well as colostrum milk samples.**	**60**
4.1.a	**The health state of cows mammary gland.**	**60**
4. I. B	**The correlation between CMT and SCC of the examined milk samples collected from the examined cows.**	**62**
4. I. c.	**Result of bacterial examination.**	**64**
4. II. Phase II	**measurement the levels of** anti ***S. aureus* specifc IgA, IgG and IgM in both whey and serum samples in cows with different forms of mastitis.**	**67**
4. II.1	**The values of anti *S. aureus* specifc IgA, IgG and IgM in whey, serum and colostrum in cows.**	**67**
4.II.2	**Level of anti *S. aureus* specific IgA in samples from *S. aureus, coagulase negative staphylococci (CNS*) and bacterial negative mastitis cases.**	**70**
4.II.3	**Level of anti *S. aureus* specific IgM in samples from *S. aureus, coagulase negative staphylococci***	**73**

	***(CNS*) and bacterial negative mastitis cases.**	
4.II.4	**Level of anti *S. aureus* specific IgG in samples from *S. aureus, coagulase negative staphylococci (CNS*) and bacterial negative mastitis cases.**	**76**
4.II.5	**Effect of degree of mastitis_(subclinical and clinical) on anti *S. aureus* specific IgA in both milk whey and serum.**	**79**
4.II.6	**Effect of degree of mastitis (subclinical and clinical) on** anti ***S. aureus*** specific **IgM in both whey and serum.**	**82**
4.II.7	**Effect of degree of mastitis on anti *S. aureus* specific IgG antibody in both milk whey and serum.**	**85**
4.II.8	**The relationship between somatic cell count (SCC) and the level of anti *S. aureus* specific IgA antibody in both milk whey and serum.**	**88**
4.II.9	**The relationship between somatic cell count (SCC) and the level of anti *S. aureus* specific IgM antibody in both whey and serum.**	**91**
4.II.10	**The relationship between somatic cell count (SCC) and the level of anti *S. aureus* specific IgG in both milk whey and serum.**	**94**
4. II.11	**Values of IFN- γ in milk whey, serum and colostrum whey of cows.**	**97**
4.II.12	**The relationship between values of IFN-gamma in both whey and serum of *S. aureus* and *coagulase negative staphylococci* in mastitic cows.**	**99**

4.II.13	**Effect of degree of mastitis on IFN-gamma in both milk whey and serum.**	**103**
4.II.14	**The relationship between somatic cell count (SCC) and the level of IFN-gamma in both milk whey and serum.**	**107**
4.III. Phase III	**studied the relationship between humoral immunity and cellular immunity (gamma interferon)**	**111**
4.III.a	**Correlation between anti *S. aureus* specific IgA, IgM, IgG and IFN-gamma.**	**111**
5.	**Discussion**	**113**
6.	**Summary and conclusion**	**129**
7.	**Reference**	**134**
	Arabic summary	**٣-١**

List of Abbreviations

CMT	**California Mastitis Test**
CNS	**Coagulase Negative Staphylococci**
df	**degree of freedom**
ELISA	**Enzye Linked Immunosebent Assay**
F	**variance ratio**
IFN- γ	**gamma interferon**
IgA antibodies	**immunoglobulin A antibody**
IgG antibodies	**immunoglobulin G antibody**
IgM antibodies	**immunoglobulin M antibody**
Ms	**mean squares**
No.	**Number**
QMS	**Quarter milk sample**
SCC	**Somatic Cell Count**