Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology

Name : **Eman Fathy Ahmed**
Nationality : Egyptian

Title of the Thesis: **"Microbiological Studies on Clostridial Affections in Sheep and Goats in Egypt.**

Supervisors:

Prof. Dr. **Mamdouh Abd El Ghani Abd El Aziz.**
Prof. Of Microbiology, Faculty of Vet. Medicine
Cairo University.

Prof. Dr. **Fawzy Riad El Seedy.**
Prof. Of Microbiology – Faculty of Vet. Medicine
Cairo University – Beni Suef Branch.

Dr. **Mervat Abd El-Rahman Ali.**
Prof. Of Microbiology, Animal Health Research Institute,
Dokki, Cairo.

Abstract

A total of 658 samples from sheep and 495 samples from goats either apparently healthy, diseased or dead were examined. Clostridium was isolated from sheep in an incidence of 57.7% and in goats 46.1%.

The following species were identified: **C. perfringens, C. bifermentanse, C. Sordellii, C. sporogenes, C. tertium, C. butyricum and C. fallax. C. perfringens** was the most predominant isolates. Clostridial incidence in sheep was more than that in goats. Typing of C. perfringens isolates using serum neutralization test was taken place. Comparison between ELISA and agar gel diffusion test for detection of C. perfringens antitoxin in the serum of animals was made. ELISA was more sensitive, sepecific and simple test.

Trials were made in present study to characterize 3 C. perfringens toxins (A, B and D) by using SDS-PAGE.

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطري
قسم الميكروبيولوجيا

الاسم: **ط.ب/ إيمان فتحي أحمد فرج**

عنوان رسالة الماجستير:

''دراسات ميكروبيولوجية عن الإصابات بالكلوستريديا في الأغنام والماعز في مصر''

تحت إشراف

أ.د. ***ممدوح عبد الغني عبد العزيز***
أستاذ الميكروبيولوجيا – كلية الطب البيطري– جامعة القاهرة

أ.د. ***فوزي رياض الصعيدي***
أستاذ الميكروبيولوجيا – كلية الطب البيطري– جامعة القاهرة (فرع بني سويف)

أ.د. ***ميرفت عبد الرحمن علي***
رئيس بحوث بقسم البكترولوجي – معهد بحوث صحة الحيوان – الدقي

المستخلص العربي

في هذه الدراسة تم إجراء الفحص البكتريولوجي على عدد ٦٨٥ من الأغنام و ٤٩٥ من الماعز شملت حيوانات سليمة ظاهريا وحيوانات عليها أعراض معوية لمرض التسمم المعوي وأخرى نافقة وكانت نسبة تواجد ميكروب الكلوستريديا في الأغنام ٥٧,٧٪ وفي الماعز ٤٦,١٪. كما تم تصنيف ميكروبات الكلوستريديا المعزولة إلى سبعة أنواع : (كلوستريديم بيرفرنجينز، كلوستريديم بايفرمنتس، كلوستريديم سورديللي، كلوستريديم سبوروجينز، كلوستريديم تيرتيام، كلوستريديم بيوتيكام، كلوستريديم فالاكس) وكانت كلوستريديم بيرفرنجينز أكثر المعزولات انتشارا.

وكانت نسب العزل لميكروبات الكلوستريديا في الأغنام أكثر منها في الماعز

كما تم تصنيف ميكروب كلوستريديم بيرفرنجينز باستخدام اختبار التعادل المصلي إلى ثلاثة انواع (أ ، ب ، ء).

وبمقارنة إختباري الإليزا والآجار الترسيبي في الكشف على الأجسام المضادة في سيرم الحيوانات المريضة والسليمة ظاهريا إتضح مدى أهمية إختبار الإليزا وبساطتة وسرعة استخدامه للتشخيص المبكر.

كما تم محاولة لتوصيف سموم ثلاثة معزولات من الكلوستريديم بيرفرنجينز نوع (أ ، ب ، ء) وذلك باستخدام تقنية الفصل الكهربائي للبروتين للحصول على صورة البروتين لكل سم مستخلص

LIST OF CONTENTS

1 INTRODUCTION ---------- 1

2 REVIEW OF LITERATURE ---------- 3

2.1 Historical ---------- 3

2.2 Incidence of clostridial microorganisms in sheep and goats . --------- 8

2.3 Incidence of Clostridial microorganisms in Sheep and Goats in Egypt ---------- 18

2.4 Identification of Clostridial microorganisms ---------- 20

2.5 Characteristics of Clostridial Toxins ---------- 34

2.6 Serological Identification :---------- 43

2.7 Experimental Infection ---------- 51

2.8 Electrophoretic pattern of Clostridial toxins: ---------- 58

3 MATERIAL AND METHODS : ---------- 66

3.1 Materials: ---------- 66

3.1.1 Samples: ---------- 66

3.1.2 Media used: ---------- 69

3.1.3 Media used for biochemical tests : ---------- 71

3.1.4 Antibiotic : ---------- 73

3.1.5 Stain : ---------- 73

3.1.6 Reagents and solutions: ---------- 73

3.1.7 Chemicals: ---------- 74

3.1.8 Diagnostic antitoxin: ---------- 75

3.1.9 Laboratory animals for experimental purposes: ---------- 75

3.1.10 Apparatus and equipments : ---------- 76

3.1.11 Reagents for ELISA: ---------- 77

3.1.12 Reagents of agar gel diffusion test:---------- 78

3.1.13 Materials used for Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) :---------- 78

3.2 METHODS ---- 83
3.2.1 Collection of samples: ---- 83
3.2.2 Isolation of Clostridia: ---- 83
3.2.3 Identification of the isolates: ---- 84
3.2.4 Nagler's test by half antitoxin plate ---- 86
3.2.5 Neutralization test in mice: ---- 86
3.2.6 Determination of the types of *C. perfringens* toxin by dermonecrotic test: ---- 87
3.2.7 Diagnosis of *C. perfringens* types A, B and D infections using ELISA ---- 89
3.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): ---- 92
3.2.9 Detection of *C. perfringens* A, B and D anti-toxin using agar gel diffusion test ---- 94
3.2.10 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE): ---- 95
3.2.11 Staining of the protein bands : ---- 97
3.2.12 Determination of the molecular weights of clostridial toxins types A , B and D : ---- 98

4 RESULTS ---- 100

4.1 Incidence of Clostridial Microorganisms recovered from apparently healthy and diseased sheep: ---- 100

4.2 Incidence of Clostridial Microorganisms recovered from apparently healthy and diseased goats: ---- 102

4.3 Distribution and incidence of clostridial species isolated from living sheep: ---- 102

4.4 Distribution and incidence of clostridial species isolated from different samples of slaughtered and dead sheep ---- 107

4.5 Distribution and incidence of clostridial species isolated from living goats. ---- 109

4.6 Distribution and incidence of clostridial species recovered from different samples of slaughtered and dead goats. ---- 110

4.7 Typing of *C. perfringens* isolated from living sheep ---- 113

4.8 Typing of *C. perfringens* recovered from slaughtered and dead sheep. ---- 115

4.9 Typing of *C. perfringens* isolated from living goats ---- 115

4.10 Typing of *C. perfringens* recovered from slaughtered and dead goats ---- 116

4.11 Detection of anti toxin against *C.perfringens* toxins in the serum of sheep using ELISA . ---------- 120

4.12 Detection of anti toxins against *C.perfringens* toxins in the serum of sheep using agar gel diffusion test .---------- 121

4.13 Detection of anti toxins against *C.perfringens* toxins in the serum of goats using ELISA . ---------- 122

4.14 Detection of anti-toxins against *C.perfringens* toxins in the serum of goats using agar gel diffusion test . ---------- 123

4.15 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE of *C.perfringens* types A, B and D toxins field isolates: ---------- 124

5 DISCUSSION---------- 131

6 SUMMARY---------- 153

7 REFERENCES---------- 158