جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

مقارنة الطرائق التشخيصية المستعملة في تشخيص *Chlamydophila abortus* في النعاج في مدينة الموصل، العراق

يعرب عبد الخالق محمد صالح رحاوي

رسالة ماجستير

الطب البيطري / تشخيصات مرضية بيطرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

أسامة موفق عبد الجبار

١٤٤٥ هـ ٢٠٢٣ م

الخلاصة

تعد هذه الدراسة هي الأولى في مدينة الموصل للكشف عن الكلاميديا المجهضة *Chlamydophila abortus* في الضأن بالفحص المجهري المباشر والفحص السريع والكشف الجزيئي، باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي c-PCR.

واستعملت استمارة خاصة لجمع المعلومات عن قطعان تربية الضأن أثناء جمع العينات، وشملت الدراسة ١٥٧ عينة مختلفة من الأغنام المحلية التي كانت تعاني من الإجهاض، وتراوحت أعمارها بين (١-٣) سنوات من مناطق مختلفة من مدينة الموصل، وقد جُمعت العينات ابتداء من تاريخ ٢٠٢٢/٨/٢٥ حتى ٢٠٢٣/١/٤ ،فشملت العينات (٤٩ جنيناً مجهضاً و٥٢ مشيمة و٥٦ مسحة مهبلية) ، إذ اخذت مسحات من مهبل النعاج المجهضة ومن المشيمة ومن أنسجة الأجنة المجهضة، لغرض الفحص المجهري والاختبار السريع، و أخذت خزعات بحجم ١٠ غم من المشيمة ومن أعضاء الأجنة المجهضة (الكبد، محتويات المنفحة) التي نقلت بحافظات خاصة تحت ظروف مبردة (٤-٨م°)، وأضيف اليها محلول دارئ (Sucrose Phosphate Glutamate SPG Buffer 0.218 M/0.0072 M/0.0049 M)، وحفظت في درجة حرارة (-٢٠م°) الى حين إجراء التشخيص بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل، واستعملت العدة الجاهزة للفحص السريع للكشف عن مستضد الكلاميديا من المسحات المأخوذة سابقا، واستعملت العدة الجاهزة لاستخلاص الـ DNA الخاص بالكلاميديا، واستعملت البادئات الخاصة بالجينين 16S rRNA (16S ribosomal RNA) و OMP2 (membrane proteins outer) للكشف الجزيئي عن الكلاميديا المجهضة.

وقد بينت النتائج بناءً على العدد الإجمالي للعينات وهو (١٥٧) عينة مختلفة (مشيمة، أجنة مجهضة، مسحة مهبلية)، أن نسب الإصابة (١٨,٥٪) بالفحص المجهري باستعمال صبغة زيل نيلسن المحورة، وكان (٣٣,٨٪) باستعمال الاختبار السريع، وكان هناك توافق حقيقي عند مقارنة الفحص المجهري المباشر مع الاختبار السريع (قيمة كابا تساوي ٠,٦٢)، وجد أن الفحص المجهري المباشر والفحص السريع يتميزان بحساسية وخصوصية ودقة عالية مقارنة مع تفاعل البلمرة المتسلسل.

وبيّنت نتائج الكشف الجزيئي باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي أن عدد العينات الكلية الموجبة بلغ ١٨(١١,٥٪) للجين (16S rRNA)، في حين بلغت ٧ (٤,٥%) للجين (OMP2)، كما أنّ نتائج التضخيم الخاصة بالجين (16S rRNA) للعينات الموجبة أظهرت حجم ٢٧٨زوجاً قاعدياً بالمقارنة مع السيطرة السالبة بعد ترحيلها في هلام الأكاروز بتركيز ١,٥٪، كما أنّ نتائج التضخيم الخاصة بالجين (OMP2) للعينات الموجبة أظهرت حجم ٥٨٧ زوجاً قاعدياً بالمقارنة مع السيطرة السالبة بعد ترحيلها في هلام الأكاروز بالتركيز نفسه.

أظهرت نتائج التسلسل الجيني للجين 16S rRNA لجراثيم *C. abortus* وجود تسلسل جيني للعينات المرسلة (٢عينات) إلى شركة ماكروجين / كوريا الجنوبية التي تم تشخيصها في مدينة الموصل، تم تسجيلها في المركز الوطني للمعلومات الجينية National Center for Biotechnology Information (NCBI)بنك الجينات الامريكي (American GenBank) والحصول على رقم تسلسل Accession number(s)للتسلسلات الجينية المحلية لجراثيم *C. abortus* (OR334580) و (OR334581).

ومن النتائج تبين أن هناك قوة علاقة مثالية بين الفحص المـــجهري و الاختبار السريع إذ كانت قيمة مربع كاي ٦٩,٧٩ وقيمة كرامر ٠,٦٧عند مستوى معنوية ٠,٠١> P، في حين كانت قوة العلاقة معتدلة بين الفحص المجهري و تفاعل البلمرة المتسلسل إذ كانت قيمة كاي ٤٧,٤٨ وقيمة كرامر٠,٥٥ عند مستوى معنوية ٠,٠١> P، أما قوة العلاقة بين الاختبار السريع و تفاعل البلمرة المتسلسل فكانت معتدلة إذ كانت قيمة كاي ٣٩,٨٩ وقيمة كرامر٠,٥٠ عند مستوى معنوية ٠,٠١> P، كما تبين أن هناك ارتباطاً إيجابياً بين عينات الأجنة والمسحات المهبلية وبين عينات المشيمة إذ كانت قيمة الارتباط (٠,٧٦٥٤) و(٠,٧٧٠٦) لعينات الأجنة والمسحات المهبلية على التوالي، عند مستوى معنوية ٠,٠١>P .

استنتج من هذه الدراسة بأنَّ النسبة عالية للإصابة بالكلاميديا المجهضة وإمكانية استعمال الفحص السريع كفحص مسحي أولي، وأفضلية الجين 16S rRNA والجين Omp2 في الكشف عن الكلاميديا المجهضة وإمكانية اعتماد عينات المسحات المهبلية لأنها أسهل الطرائق في الكشف عن الإصابة.

University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Comparison method used for detection of *Chlamydophila abortus* in ewes in Mosul city, Iraq

Yarub Abulkhaliq Muhammad Salih Rhawy

M.Sc. Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Clinical pathology

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Osamah Muwaffaq Abduljabbar

2023 A.D. **1445 A.H.**

Abstract

This study is the first in the city of Mosul to detect *Chlamydophila abortus* in sheep by microscopic examination, rapid test, and molecular detection, using conventional Polymerase Chain Reaction (c-PCR).

A special form was used to collect information about the herds of sheep breeding during the collection of samples. The study included 157 samples of local sheep suffering from abortion, and their ages ranged between (1-3) years from different regions of the city of Mosul. The samples were collected starting from 25/8/2022 to 4/1/2023. The samples included (49 aborted fetuses, 52 placentas, and 56 vaginal swabs), as swabs were taken from the vagina of aborted ewes. The placenta and the tissues of aborted fetuses were for microscopic examination and rapid testing, and biopsies were taken from the placenta and the aborted fetuses' organs (liver, Abomasum contents). They were transported in special containers under refrigerated conditions (4-8 °C), to which a buffer solution Sucrose Phosphate Glutamate SPG buffer (0.218 M sucrose monobasic, 0.0072 M dibasic potassium phosphate; 0.0049 M potassium glutamate) was added, and kept at a temperature (-20 °C) until the diagnosis was made by the Polymerase Chain Reaction (PCR). A ready-made rapid test kit was used to detect chlamydial antigen from swabs taken previously, a ready-made kit was used to extract chlamydial DNA, and primers for the two genes 16S rRNA (*16S ribosomal* RNA) and OMP2 (outer membrane proteins) were used for the molecular detection of *Chlamydophila abortus*.

The results showed, based on the total number of samples, which is (157) different samples (placenta, aborted fetuses, vaginal swab), that the

infection rate was (18.5%) by microscopic examination using the modified Ziehl-Nielsen stain (MZN), and it was (33.8%) using the rapid test. There was a substantial agreement when comparing the microscopic examination (MZN) with the rapid test (kappa value = 0.62), these two tests depend on the presence of *Chlamydophila abortus* in the sample, and it was found that the direct microscopic examination and the rapid test are characterized by sensitivity, specificity and high accuracy compared to the polymerase chain reaction.

The results of molecular detection using the conventional polymerase chain reaction (c-PCR) showed that the number of positive total samples was 18, (11.5%) for the gene (16S rRNA), while it was seven, (4.5%) for the gene (OMP2), and the amplification results for the gene (16S rRNA) for positive samples. It showed a size of 278 base pairs compared to the negative control after being transferred in an agarose gel at a concentration of 1.5%, and the amplification results of the (OMP2) gene for positive samples showed a size of 587 base pairs compared to the negative control after being transferred in an agarose gel at a concentration of 1.5%.

The results of the genetic sequencing of the 16S rRNA gene of *Chlamydophila abortus* showed the presence of a genetic sequence of the samples sent (two samples) to the Macrogen / South Korea Company. They were diagnosed in the city of Mosul and were registered at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) US Gen Bank (American GenBank) and obtain the sequence number(s) for the local genetic sequences of *Chlamydophila abortus* (OR334580) and (OR334581).

From the results, it was found that there is a strong association between the Microscopic Examination with the Rapid Test. where the Chi-square was 69.79 and the value of Cramer value 0.67 at a significant level of P <0.01, while the strength of association was moderate between the Microscopy Examination with the Polymerase Chain Reaction. as the value of chi was 47.48 and the value of Cramer value 0.55 At a significant level of P<0.01, while the strength of the relationship between the rapid test with the Polymerase Chain Reaction was moderate, as the value of Chi was 39.89 and the value of Cramer value 0.50 at a significant level of P<0.01. It was also found that there was a positive correlation between samples of fetuses and vaginal swabs with samples of the placenta. As the correlation value was (0.7654) and (0.7706) for fetal samples and vaginal swabs, respectively, at a significant level of P < 0.01.

We concluded from this study there is a high rate of *Chlamydophila abortus* infection In addition, the possibility of using the rapid test as a primary screening test. The results showed the superiority of the 16S rRNA gene and the Omp2 gene in detecting a *Chlamydophila abortus*, and the possibility of adopting vaginal smear samples because they are the easiest methods of detecting infection.