| | |
|---|---|
| **MABS** | **Monoclonal Antibodies** |
| **MDCK** | **Madin-Darby Canine Kidney Cells** |
| **MAVS** | **Mitochondrial Antiviral Signaling Protein** |
| **MCV** | **Mean Corpuscular Volume** |
| **MDA5** | **Melanoma Differentiation-Associated Protein 5** |
| **MEGA7** | **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7** |
| **MERS** | **Middle East Respiratory Syndrome-Related Coronavirus** |
| **MHV** | **Mouse Hepatitis Virus** |
| **MT** | **Methyltransferase** |
| **N** | |
| **N** | **Nucleocapsid Protein** |
| **NC** | **Negative Control** |
| **NCBI** | **National Center for Biotechnology Information** |
| **NEJM** | **New England Journal of Medicine** |
| **NF** | **Nuclear Factor** |
| **NL** | **Normal (Nl) Or Necrotizing Lymphadenitis (Nl) Or Nanoliter (Nl)** |
| **NL63** | **Hcov-Nl63 (Human Coronavirus Nl63)** |
| **NLRP12** | **Nod-Like Receptor Family Pyrin Domain-Containing 12** |
| **NMP** | **Nuclear Matrix Protein (NMP)** |
| **NSPS** | **Nonstructural Proteins** |
| **NS6** | **Non-Structural Protein 6** |
| **NTD** | **N-Terminal Domain** |
| **N-PCR** | **Nested-Polymerase Chain Reaction** |
| **NTU336** | **Canine Coronavirus (CCoV) Strain Isolated and Sequenced in Taiwan.** |
| **NXF1** | **Nuclear RNA Export Factor 1** |
| **NXT1** | **Nuclear Transport Factor 2 Like Export Factor 1** |
| **O** | |
| **OC43** | **Hcov-Oc43 (Human Coronavirus Oc43)** |
| **ORF** | **Open Reading Frames** |
| **P** | |
| **PRCV/ PRCOV** | **Porcine Respiratory Coronavirus.** |
| **PEDV** | **Porcine Epidemic Diarrhea Virus** |
| **PHEV** | **Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus.** |
| **PDCV** | **Porcine Deltacoronavirus** |
| **POL** | **The Polymerase Polyprotein** |
| **PLPRO** | **Papain-Like Protease** |
| **PP1A AND PP1B** | **Two Large Polyproteins** |
| **3′ POLY(A) TAIL** | **3′ Polyadenylated Tail** |
| **PAMP** | **Pathogen-Associated Molecular Patterns** |
| **PC,** | **Positive Control** |
| **PCR** | **Polymerase Chain Reaction** |
| **PDK** | **Primary Dog Kidney Cells** |
| **PCV** | **Packed Cell Volume** |
| **PDC** | **Plasmacytoid Dendritic Cells** |
| **PHB1,** | **Prohibitin 1** |
| **PMC** | **Pubmed Central** |
| **PRNT** | **Plaque Reduction Neutralization Test.** |
| **R** | |

Positive amplicons from PCR were purified and submitted for Sanger sequencing (Macrogen, Korea). Obtained nucleotide sequences were analyzed using MEGA X software to construct phylogenetic trees and compare the molecular identity of local isolates with selected international reference strains.

To investigate viral biological characteristics, representative CCoV isolates were propagated in vitro using canine kidney cell (CKC) cultures. Viral replication was monitored through observation of cytopathic effects (CPE) across six serial passages. Viral titers were quantitatively assessed at each passage using the tissue culture infectious dose 50 (TCID50) assay, with the progression and magnitude of CPE and viral load compared among isolates.

Out of 100 dogs sampled, rapid antigen tests identified 43 dogs (43%) as positive for CCoV, 29 dogs (29%) as positive for CPV, and 28 dogs (28%) as negative for both pathogens. No co-infections were detected. Infection rates were higher among stray compared to household dogs, and among females compared to males, but differences in these variables did not reach statistical significance ($p > 0.05$).

Age-specific analysis revealed the highest CCoV detection rate (statistically significant, $p < 0.05$) in dogs under one year of age, with declining prevalence in older cohorts. Breed analysis highlighted significantly elevated infection rates in large-breed and local/native dogs relative to small-breed and imported counterparts, particularly regarding the enteric form of CCoV.

Clinical manifestation in infected dogs commonly included multiple overlapping signs; diarrhea, vomiting, and dehydration predominated. Molecular testing confirmed the presence of both CCoV-I and CCoV-II by M gene

amplification. Genotyping identified the CCoV-IIa subtype based on SIIa gene detection, while no amplification was observed for SI and SIIb, indicating the absence of CCoV-I-specific or TGEV-like CCoV-IIb genotypes.

Sequencing was successfully performed for five representative isolates, which were subsequently deposited in GenBank (accession numbers: PV454546.1–PV454550.1). Comparative phylogenetic analysis revealed these Nineveh strains showed high similarity (98–100% nucleotide identity) to international CCoV strains from China (OQ407503.1, OL687146.1), Italy (GU146061.1), and Hungary (GQ148772.1), while the lowest similarity (98.06%) was with EU924791.1. The constructed phylogenetic tree based on the SIIa gene placed the local isolates in evolutionary proximity to certain Asian and European genotypes, supporting possible epidemiological linkage.

In cell culture, all five isolates successfully adapted to CKC monolayers, producing progressive CPE characterized by cell rounding at 48 hours and extensive cell detachment by 72 hours post-inoculation across six serial passages. Quantitative titration indicated a steady rise in infectious viral load, with peak titers surpassing 10^6 TCID50/mL at 72 hours for all isolates. Notably, the dynamics and magnitude of CPE and viral proliferation exhibited isolate-dependent variability, reflecting underlying biological diversity among local strains.

This comprehensive investigation reveals a substantial burden of CCoV infection among dogs in Nineveh, with age and breed identified as significant risk factors. Molecular profiling affirms the circulation of diverse CCoV genotypes locally, closely related to international strains, emphasizing the need for coordinated veterinary surveillance and interventions in the region. The successful propagation of local isolates in vitro further provides a platform for future research on CCoV pathobiology and vaccine development.

جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

# العزل والتوصيف الجينى للفايروسات التاجية المعوية الكلبية

مروه يوسف احمد حمش

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الأحياء المجهرية البيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتور

صفوان يوسف محمود البارودي

---

2025 A.D. 1446 A.H.

# الخلاصة

يُعد الفيروس التاجي المعوي الكلبي (CCoV) أحد أهم العوامل المسببة للأمراض المعوية الحادة في الكلاب، حيث يسبب خسائر صحية واقتصادية كبيرة، خاصةً في الحيوانات الصغيرة. تهدف هذه الدراسة إلى التقصي عن معدل انتشار الفيروس التاجي المعوي الكلبي وتحديد أنماطه الجينية لدى الكلاب في محافظة نينوى، العراق، بالإضافة إلى دراسة العوامل الوبائية المرتبطة بالإصابة.

تم جمع 300 مسحة شرجية من 100 كلب ظهرت عليها علامات سريرية للإصابة المعوية (قيء، إسهال، ضعف، فقدان شهية، ارتفاع حرارة، جفاف). الكلاب المختارة شملت مختلف الفئات العمرية (أقل من سنة، ١–٢ سنة، أكثر من سنتين)، الجنسين (ذكور وإناث)، ومن سلالات مختلفة (كبيرة وصغيرة)، ومن مصادر متنوعة (كلاب ضالة، منزلية، محلية ومستورد). شملت مناطق جمع العينات عدة مناطق من محافظة نينوى لضمان تمثيل جغرافي متنوع.

استُخدم اختبار الاستشراب المناعي السريع للكشف عن المستضدات الفيروسية في العينات، وذلك للتحري عن فيروس الكاسي الكلبي (CCoV) وفيروس بارفو الكلاب (CPV) . تم تصنيف الكلاب إيجابية أو سلبية بالاستناد إلى نتائج الاختبار السريع لكلا الفيروسين.

أُخضعت العينات الإيجابية بالاختبار السريع، بالإضافة إلى 28 عينة أخرى ظهرت عليها علامات سريرية لكن أعطت نتائج سلبية، لفحص تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي العكسي (qRT-PCR). تم استهداف جين الـM للتحقق من وجود الفيروس (CCoV-I و CCoV-II)، والجين SIIa للنمط الجيني CCoV-IIa، مع استخدام بادئات S I و SIIb للتحري عن الأنماط الجينية الأخرى (CCoV-I, CCoV-IIb, TGEV).

أُرسلت العزلات الجينية التي أعطت نتائج إيجابية للتحليل التسلسلي (سانجر) إلى Macrogen-كوريا. استُخدم برنامج MEGA X للتحليل التطوري وإنشاء الشجرة الوراثية، ومقارنة عزلات الدراسة مع عزلات عالمية من GenBank. تم تسجيل خمس عزلات محلية جديدة تحت الرموز PV454546.1 حتى PV454550.1.

زُرعت العزلات المؤكدة على خلايا كلية الكلاب (MDCK cell line)، وأُجري تمرير الفيروس ست مرات متتالية. رُصدت التغيرات المرضية الخلوية (CPE) بعد 48 و72 ساعة من الحقن، وشُخِّص معيار الفيروس بقياس $TCID_{50}$/مل.

من أصل 100 كلب، أظهرت 43 حالة (43%) نتائج إيجابية لفيروس الكاسي الكلبي (CCoV) في الاختبار السريع، و29 حالة (29%) لفيروس بارفو الكلاب (CPV). كانت 28 عينة (28%) سلبية للفيروسين بالاختبار السريع، لكن أُعيد فحصها جزيئيًا لظهور علامات سريرية معوية.

الكلاب الضالة أظهرت معدلات إصابة أعلى من المنزلية، لكن الفرق لم يكن ذا دلالة إحصائية. الذكور سجلت معدلات إصابة أعلى من الإناث، مع عدم وجود فروق معنوية. الفئة العمرية أقل من سنة سجلت أعلى نسب إصابة مع فارق معنوي واضح عند مقارنتها بالفئات الأخرى ($P<0.05$). السلالات الكبيرة المحلية أظهرت نسب إصابة أعلى بكثير مقارنة بالسلالات الصغيرة والمستوردة.

أظهر اختبار qRT-PCR تضخيماً إيجابيًا لجين M وجين SIIa فقط (النمط الجيني CCoV-IIa)، مع غياب تضخيم S I وSIIb الدالين على الأنماط الجينية الأخرى. لم تُكتشف إصابات مزدوجة بفيروس الكاسي الكلبي وفيروس البارفو في نفس العينة.

أظهرت العزلات المحلية (خمسة عزلات مسجلة في GenBank) تشابهًا وراثيًا مرتفعًا (حتى 100%) مع عزلات من الصين وإيطاليا والمجر. أدنى نسبة تشابه كانت مع عزلة من أوروبا الشرقية (EU924791.1) بنسبة تطابق 98.06%. التحليل التطوري أظهر قرب الأنماط العراقية محليًا من تلك العالمية، مع علاقة قرابة تراوحت بين 68%–96%.

تكيّفت الفيروسات الخمسة المعزولة مع خلايا الكلى الكلبية بعد ست تمريرات متتالية. ظهرت التأثيرات المرضية الخلوية (CPE) على شكل انفصال وتلف الخلايا بعد 48–72 ساعة، مع اختلاف شدة وسرعة ظهور التأثير بين العزلات. بلغ معيار الفيروس $TCID_{50}$ أكثر من $10^6$/مل بعد 72 ساعة، ما يؤكد الكفاءة العالية لتكاثر الفيروس في هذا النوع من الخلايا.

تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في محافظة نينوى التي تسلط الضوء على النمط الجيني السائد وتباين السلالات المحلية مقارنة بالعزلات العالمية، وتؤكد دور العوامل الوبائية (العمر، السلالة، المصدر) في انتشار العدوى. ويوصي البحث بأهمية تطبيق برامج رقابة ورصد مستمرة، وتوعية مربي الكلاب بأهمية التحصين والوقاية، وضرورة دراسة سلوك الجينات الفيروسية محلياً لمواجهة مخاطر الطفرات المستجدة مستقبلاً.