



جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

دراسة تشخيصية للإصابة بمرض الحمى المنقولة بالقراد في الأبقار في مدينة الموصل، العراق

عبير سالم حازم محمد النقيب

رسالة ماجستير
الطب البيطري / التشخيصات المرضية البيطرية

بإشراف
الأستاذ الدكتور
قيس طالب شكر السرحان

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية لتشخيص وتحديد نسبة العينات الموجبة للإصابة بجراثيم *Anaplasma phagocytophilum* في الأبقار والقراد المخمج لها باستخدام الفحص المجهرى لمسح الدم وتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل في مدينة الموصل، العراق مع تحديد التوافق بين الاختبارين اعتماداً على قيمة كابا وحساب حساسية وخصوصية ودقة الفحص المجهرى بالمقارنة مع تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل، وتحديد معايير الجودة للمقارنة بين الصبغات المختلفة المستخدمة في مسح الدم لتشخيص جراثيم *A. phagocytophilum*، مع تشخيص وتصنيف أنواع القراد المتطفل على الأبقار اعتماداً على الصفات الشكلية وتحديد امكانية نقله لجراثيم *A. phagocytophilum* إلى الأبقار، فضلاً عن تحليل شجرة النشوء الجينية لجراثيم *A. phagocytophilum* المشخصة في الدراسة.

شملت الدراسة 50 حيواناً من الأبقار مثلت (38 بقرة و 12 ثور) وبأعمار مختلفة وسلالات ونظم تربية مختلفة، تم تأمينها جميعاً من مناطق مختلفة من مدينة الموصل والحالات الواردة إلى المستشفى التعليمي البيطري للفترة الممتدة من بداية شهر أيلول 2022 إلى نهاية شهر تموز 2023. تم جمع 3 مليلتر من 50 رأساً من الأبقار من الوريد الوداجي ووضعها في انابيب حاوية على مانع تخثر نوع (EDTA) لغرض عمل مسح الدم الرقيقة والسميكة ، كما تم عمل مسح من الغلالة الشهباء للكشف الأولي عن جراثيم *A. phagocytophilum* ، وتم حفظ الباقي من الدم وبدرجة - 20 م° لحين اجراء تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل لغرض تأكيد الإصابة بجراثيم *A. phagocytophilum*. كما تم عمل مسح لمفية من الخزع المأخوذة من العقد اللمفية امام لوح الكتف لغرض الكشف عن الاجسام الاشتمالية (Morulae) داخل الخلايا اللمفية. وتم أيضاً جمع 169 من القراد المتطفل على الأبقار ومن مناطق مختلفة من جسم الحيوان لغرض تصنيفها وعمل مسح من سائل الدم اللمفي للقراد للكشف عن الاجسام الاشتمالية في خلايا سائل الدم اللمفي باستخدام الفحص المجهرى وتشخيص اصابتها بجراثيم *A. Phagocytophilum* باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل.

استخدمت أنواع مختلفة من الصبغات شملت صبغة الكيمزا الجاهزة وصبغة المثيلين الأزرق وصبغة كرام الجاهزة وصبغة الأكردين البرتقالية، لغرض صبغ المسح المحضرة في الدراسة.

ولتحليل شجرة النشوء الجيني استعملت التسلسلات الجينية المحلية للجين 16SrRNA لجراثيم *A. phagocytophilum* المشخصة في الدراسة تم استخدام برامج خاصة، وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن الأبقار المصابة عانت من الشكل الحاد من المرض، وبلغت نسبة

ب

العينات الموجبة بجراثيم *A. phagocytophilum* 58% و 72% بإستخدام الفحص المجهرى و تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل على التوالي. كما لوحظ وجود توافق حقيقي بين الاختبارين في تشخيص الإصابة بجراثيم *A. phagocytophilum* في الأبقار بالاعتماد على قيمة كابا والتي بلغت (0.699) مع نسبة حساسية وخصوصية ودقة بلغت 80.55% و 100% و 86% على التوالي للفحص المجهرى مقارنة بتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل، وهذا يدل على كفاءة كل من الفحص المجهرى وتقانة تفاعل البلمرة المتداخل في الكشف عن الإصابة بجراثيم *A. phagocytophilum* في الأبقار المصابة.

كما اظهرت نتائج الفحص المجهرى لمسح الدم ومسح الغلالة الشهباء والمسح اللمفية وجود التويثة داخل خلايا الدم البيض وبأحجام مختلفة مع نسبة تطفل تراوحت 6 - 29% و 10-40% و 30-35% على التوالي، تضمنت أعلى نسبة تطفل معنوية ($P<0.05$) في الخلايا العذلة مقارنة مع بقية خلايا الدم البيض. وعدت صبغة الكيمزا الجاهزة كأفضل صبغة في تشخيص الأجسام الاشمالية لجراثيم *A. phagocytophilum* مقارنة بالصبغات الأخرى المستخدمة في الدراسة اعتماداً على معايير الجودة.

تم في هذه الدراسة تصنيف أربعة أنواع من القراد الصلب المتطفل على الأبقار تضمنت *Rh. Hyalomma anatolicum anatolicum* و *Rhipicephalus sanguineus* و *Boophilus annulatus* و *turanicus* وبنسب تطفل بلغت 39.64% و 23.07% و 21.89% و 15.38% على التوالي، وكان النوع *H. anatolicum anatolicum* هو النوع الشائع معنويًا ($P<0.05$). واعتماداً على الفحص المجهرى لمسح سائل الدم اللمفي وتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل تم تشخيص الإصابة بجراثيم *A. phagocytophilum* في جميع أنواع القراد المشخصة في الدراسة.

أظهرت نتائج تحليل التسلسلات الجينية المحلية لجراثيم *A. phagocytophilum* 5) (تسلسلات) والمسجلة في بنك الجينات بأرقام تسلسلية (OR002120.1 و OR002121.1 و OR002122.1 و OR002123.1 و OR002124.1) وجود نسبة تشابه 100% مع التسلسلات الجينية المسجلة في جنوب النرويج وجنوب كوريا وإسبانيا وجنوب أفريقيا واليابان وبولندا وملايو وليتوانيا وبدرجة محاذاة 100، وبينت شجرة النشوء الجيني بعد إجراء إعادة تشكيل التسلسلات النيوكليوتيدية 1000 مرة وجود علاقة تطورية عالية بين التسلسلات الجينية المحلية لجراثيم *A. phagocytophilum* مع التسلسلات العالمية للجراثيم نفسها المشار إليها في اعلاه.

ج

استنتجنا من هذه الدراسة تشخيص جراثيم *A. phagocytophilum* في دم الأبقار والقراد المتطفل عليها في مدينة الموصل-العراق، وتسجيل ولأول مرة تسلسلات جينية محلية لجراثيم *A. phagocytophilum* في بنك الجينات العالمي والتي قد تكون مفيدة للدراسات المستقبلية ولاستراتيجية السيطرة على هذه الجراثيم في منطقة الدراسة.

University of Mosul
College of veterinary medicine



Diagnostic Study of Tick Born Fever in Cows in Mosul City, Iraq

Abeer Salim Hazim Mohammed Alnakeeb

M.Sc. Thesis
Veterinary Medicine / Veterinary Clinical Pathology

Supervised by
Professor
Dr. Qaes Talb Shukur Alsarhan

2023A.D.

1445 A.H.

smears preparing to detect the morulae in the hemolymph cells inside them using ME. In addition, to diagnose *A. phagocytophilum* inside infected ticks using N-PCR technique. Different types of stains were used, including ready- Giemsa stain, methylene blue stain, ready-Gram stain, and acridine orange stain, for staining the smears prepared in the current study. Special programs were used to phylogenetic tree analysis used of the local genetic sequences for the 16S rRNA gene of *A. phagocytophilum* detected in the present study.

The results of the current study observed that the infected cows suffering from acute form of the disease, with the percentage of positive samples to *A. phagocytophilum* was 58% and 72% using ME of blood smears and N-PCR technique respectively. A substantial agreement was showed between ME of blood smears and N-PCR technique according to Kappa value (0.699), with high sensitivity, specificity and accuracy of ME method were 80.55%, 100%, 86% respectively compared with N-PCR technique. This indicate that the both ME method and N-PCR technique were efficient in the detection of *A. phagocytophilum* in infected cows.

In the present study, ME of blood, buffy coat and lymphatic smears observed that the presence of the morulae inside white blood cells of different sizes, with parasitemia ranged from 6-29%, 10-40%, and 30-35%, respectively, which included statistically significant ($P < 0.05$) highest parasitemia in neutrophils compared to other white blood cells. Moreover, the ready-Giemsa stain was used as the best stain for the detection of the morulae of *A. phagocytophilum* compared to other stains used in the present study based on the quality criteria.

In the current study, four species of hard ticks infested cows were identified and classified includes *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rh. Turanicus* and *Boophilus annulatus* with the infestation rate were 39.64%, 23.07%, 21.89% and 15.38% respectively, with significantly ($P < 0.05$) most common *H. anatolicum anatolicum* species. Moreover, based on ME of hemolymph smears and N-PCR technique, *A. phagocytophilum* infections were detected within all species of hard ticks diagnosed in this study.

The phylogenetic analysis of the local genetic sequences of *A. phagocytophilum* which were recorded in the NCBI Genbank under the accession numbers (OR002120.1, OR002121.1, OR002122.1, OR002123.1 and OR002124) were observed highly related (100%) to those sequences has been recorded in the Genbank such South Norway Southern Korea, Spain, South Africa, Japan, Poland, Malawi, and Lithuania with alignment score 100 . Additionally, the phylogenetic tree after performing 1000 nucleotide sequence reconstructing using MEGA 11-Bootstrap analysis showed a high developmental relationship between the local sequences of *A. phagocytophilum* with other global sequences same bacteria indicated above.

Authors concluded that *A. phagocytophilum* is detected in cows and it is infested ticks in Mosul city-Iraq, and local genetic sequences of *A. phagocytophilum* were recorded in the NCBI Genbank for first time, This finding might be advantageous for the future studies and strategically control of these bacteria in the study area.

Diagnostic Study of Tick Born Fever in Cows in Mosul City, Iraq

A thesis submitted
By
Abeer Salim Hazim Mohammed Alnakeeb

To
The Council of the College of Veterinary Medicine
University of Mosul
In
Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
In
Veterinary Medicine / Veterinary Clinical Pathology

Supervised by
professor
Dr. Qaes Talb Shukur Alsarhan