University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Prevalence and Some Risk Factors with Diagnostic Study of Listeriosis in ewes in Nineveh Governorate, Iraq

Hadeel Asim Mohammad Mustafa

Ph.D./Dissertation
Veterinary Medicine / Internal and Preventive Medicine

Supervised by

Prof. Dr
Maab Ibrahim Al-Farwachi

Assist. Prof. Dr
Balsam Yehia Rasheed

2024 A.D **1445 A.H**

ABSTRACT

The study aims to determine the prevalence of listeriosis in ewes and the risk factors related to it, The prevalence diagnose of the disease clinically and laboratory using anti-listeriolysinO (LLO) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (i-ELISA), standard double enrichment method of bacterial culture, and conventional polymerase chain reaction (c-PCR) techniques during the period from February 2022 to June 2023. The specimens were obtained from 450 diseased ewes (Blood, Brain, Placenta, Milk, Vaginal Swabs and Gall bladders) with an average age of 1.5 to 5 years old who belonged to 50 flocks N= 8408 and 100 aborted fetuses (Brain, Blood and Stomach contents) in various regions of Nineveh Governorate, Northern Iraq. In complet information of twenty-three clinically healthy ewes negative for i- ELISA and c-PCR were used as control negative. The prevalence of listeriosis in ewes is varied according to diagnostic methods, as the highest were recorded using c-PCR 15.3%. Listeric abortion was the most frequent clinical signs followed by circling movement, unilateral facial paralysis, twisting of head and conjunctivitis, significant $P<0.05$ recorded in body temperature, respiratory rates and heart rates of infected ewes compared to who are clinically healthy. Abortive form 92.8% of the disease was significant recorded during this study compared to the neurological form 65.2% During the study period, the total abortion rate was 12.6% and 23% of aborted cases were caused by *Listeria* . From Multivariable analysis, most cases of listeriosis occurred in local breed ewes that were less than two and a half years old and belonged to large flocks during the autumn and spring seasons. Anti-Listeriolysin O antibodies were identified in 11.5% the highest prevalence was observed in aborted ewes 12.1% at > 0.450 optical densities than in those with neurological symptoms 10.7% at > 0.420 optical densities. The overall percentage of bacterial isolation was 4.3% (45/1042). *Listeria. monocytogenes* 3.5% (36/1042) was the most prevalent *Listeria* spp.

Detected, followed by *Listeria.ivanovii* 0.9% (9/1042). Bacterial isolation rates varied according to the type of sample. Fetus brain samples had the highest percentage of isolation of both *Listeria.monocytogenes* 30.6% and *Listeria. ivanovii* 4.4% followed by blood samples of diseased ewes 22.2% and aborted fetuses 13.9% .

The overall prevalence of molecular detection was 13.3% (139/1042). *Listeria. monocytogenes* 12.1% (127/1042) was the most prevalent *Listeria* spp, detected followed by *Listeria.ivanovii* 1.2% (12/1042), two *Listeria. monocytogenes* strains HMB1 listeriolysin, HMB 2 listeriolysin deposited in GenBank under accession numbers LC769365.1 and LC769366.1 and two isolates of *Listeria. ivanovii* were deposited in GenBank under accession numbers OQ983887.1 and OQ983888.1. All strains of *Listeria. monocytogenes* were positive 100% for inlJ and hylA genes ,while only 93.4% and 73.6 % of bacterial isolates were positive for inlA and actA genes respectively , two strains were virulence factors of *Listeria .monocytogenes* deposited in GenBank under accession numbers were HMBJ1 internalin J gene and HMBJ2 internalin J gene LC769367.1, LC769368.1, HMBinlA1 internalin A gene, HMBin2A1 internalin A gene. LC769373.1, LC769374.1, HMBLLO1 listeriolysinOgene, HMBLLO2 listeriolysinOgene LC769369.1, LC769370.1, HMBactA1 actin-assembly inducing protein precursor gene, HMBactA2 actin-assembly inducing protein precursor gene) LC769371.1and LC769372.1. Astrong positive correlation coefficient was recorded between indirect ELISA and c-PCR techniques, while it was a medium positive correlation coefficient between bacterial culture and c- PCR techniques. The phylogenetic analysis of *Listeria monocytogenes* and *Listeria. ivanovii* were 99.4-99.54 % identical and 99.50-99.79 % identical to sequences deposited in the GenBank of many countries respectively. *Listeria.monocytogenes* (Australia, USA, Poland, China,

Russia, Netherlands, Canada, South Africa, Germany), whiel *Listeria.ivanovii* (USA, Turkey, United Kingdom, Switzerland, Germany, France, China)

جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

الانتشار وبعض عوامل الخطورة مع الدراسة التشخيصية لداء اللستريات في النعاج في محافظة نينوى/العراق

أطروحة تقدم بها

هديل عاصم محمد مصطفى

أطروحة دكتوراه فلسفة

الطب البيطري/ الطب الباطني والوقائي البيطري

بأشراف

الاستاذ الدكتور
مأب ابراهيم الفروه جي

الأستاذ المساعد الدكتور
بلسم يحيى رشيد

١٤٤٥هـ

٢٠٢٤م

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى تحديد مدى انتشار داء اللستريات في النعاج وعوامل الخطورة المرتبطة به، وكذلك تشخيص المرض سريرياً ومختبرياً بأستخدام مقايسة الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم، والطرائق القياسية للعزل البكتيري، وتفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي للمدة من شباط ٢٠٢٢ إلى حزيران ٢٠٢٣. جمعت عينات الدم و الدماغ و المشيمة و الحليب و المسحات المهبلية و المرارة بمتوسط أعمارمابين١.٥ إلى ٥ سنوات من ٤٥٠ نعجة مصابة تنتمي إلى ٥٠ قطيعاً العدد= ٨٤٠٨ و١٠٠ جنيناً مجهضاً (محتويات المعدة و الدم و الدماغ) في مناطق مختلفة من محافظة نينوى شمال العراق. تم إستخدام ثلاثة وعشرون نعجة سليمة سريريا (سالبة لاختبار الاليزا غير المباشرو تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل) كمجموعة سيطرة سالبة. تباينت معدلات انتشار داء اللستريات في النعاج حسب طرائق التشخيص، اذ سجلت أعلى المعدلات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ١٥.٣%. كان الإجهاض هوالعلامة السريرية الاكثرشيوعاً بين علامات المرض تلتها علامات الحركة الدائرية و شلل الوجه الأحادي الجانب و فقدان الشهية و التواء الرأس والتهاب الملتحمة مع ارتفاع معنوي في درجة حرارة الجسم، ومعدلات التنفس ومعدلات ضربات القلب مقارنة بتلك التي كانت سليمة سريريا. كان الاجهاض هو الأكثر تسجيلاً خلال الدراسة وبنسبة ٩٢.٨% مقارنة بالشكل العصبي ٦٥.٢%. وبلغت نسبة الإجهاض الإجمالي ١٢.٦%، و٢٣% من حالات الإجهاض. من خلال التحليل متعدد المتغيرات، فإن معظم حالات داء الليستريات حدثت في النعاج المحلية التي كان عمرها أقل من سنتين ونصف وكانت تنتمي إلى قطعان كبيرة خلال فصلي الخريف والربيع. كانت ١١.٥% من النعاج الموجبة مصلياً لاختبار الاليزاغير المباشر.كما لوحظ أعلى معدل إيجابية مصلية في النعاج المجهضة ١٢.١% عند كثافة بصرية > ٠.٤٥٠ مقارنة بالنعاج ذات الأعراض العصبية ١٠.٧% عند كثافة بصرية > ٠.٤٢٠. وكانت النسبة الكلية للعزل البكتيري هي ٤.٣ % (١٠٤٢/٤٥) .أذ لوحظ ان الليستيريا المستوحدة(مونوسيتوجينز) ٣.٥% (٣٦/ ١٠٤٢) هي الأكثر عزلا, تلتها اللستريا ايفانوفي ٠.٩% (٩/ ١٠٤٢). تباينت معدلات العزل البكتيرية حسب نوع العينة المدروسة. أذ سجلت عينات دماغ الاجنة أعلى نسبة عزل لكل من الليستريا مونوسيتوجينز ٣٠.٦% والليستيريا إيفانوفي ٤٤.٤%، تليها عينات دم النعاج ٢٢.٢% والأجنة ١٣.٩%. وقد لوحظ انحلال الدم من نوع بيتا حول المستعمرات البكتيرية بعد ٢٤ ساعة من التحضين عند٣٧ درجة مئوية على وسط أكار الدم. وعلى وسط اكار أوكسفورد، لوحظت مستعمرات صغيرة نموذجية، مستديرة، رمادية الى سوداء، قطرها حوالي ٠.٥ مم، تحدها

مناطق سوداء منتشرة من التحلل المائي للإسكولين. أظهرت نتائج جميع العزلات من كلا النوعين من الجرثومة تفاعلات كيموحيوية نموذجية شملت على انتاج الكتاليز والتحلل المائي للاسكولين ونتائج موجبة لكل من الفوكسبروسكر والمثيل الاحمر وسالبة لكل من اختباري الكلوكوز والمنيتول .كانت عزلات اللستريا مونوسيتوجينز موجبة لتفاعلي الرامنوز والألفا ميثيل, بينما كانت عزلات اللستريا ايفانوفي موجبة للزايلوز فقط . كمالوحظ ظهور مستعمرات الليستريا مونوسيتوجينز بلون أخضر مزرق مع هالة صفراء بينما ظهرت مستعمرات اللستريا ايفانوفي باللون الازرق بدون هالة صفراء عند الزرع على وسط (HI Crome™ Listeria Agar Base / Modifie M1417) اما النسبة الإجمالية للفحص الجزيئي كانت ١٣.٣% (١٠٤٢/١٣٩). وظهرت الليستيريا مونوسيتوجينز بنسبة ١٢.١% (١٢٧/١٠٤٢) تليها جراثيم الليستريا ايفانوفي بنسبة ١.٢% (١٢\١٠٤٢).

تم ايداع عزلتين لكل من الليستيريا مونوسيتوجينز و الليستريا ايفانوفي في بنك الجينات تحت ارقام انضمام هي HMB2 listeriolysin, (LC769365.1) HMB1 listeriolysin (LC769366.1), امالليستريا الايفانوفي LIVANOVII31 (OQ983887.1) LIVANOVII53, (OQ983888.1.). كانت عزلات الليستريا مونوسيتوجينزموجبة لعوامل الفوعة inIj و hly وبنسبة 100 % في حين كانت نسية عوامل الفوعة inIA و ActA 93.4% , 73.6% كما تم تسجيل عوامل الفوعة في بنك الجينات بواقع عزلتين لكل جين HMBJ2internalinJgene ,HMBJ1internalin Jgene بارقام LC769367.1 , LC769368.1 ,HMBinlA1 internalinA gene , (LC769373.1) و (LC769374 .1) HMBLLO2 listerolysin O gene,HMBLLO1 listerolysin O gene , (LC769369.1) و (LC769370), HMB actA1 , HMBactA2 (LC769371.1) , (LC769372.1),كما تم تسجيل معامل ارتباط موجب قوي ما بين كل من تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل واختبارالاليزاغيرالمباشر في حين كان معامل الارتباط متوسط مابين تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وطرائق الزرع البكتيري.

اما التحليل التطوري لليستيريا مونوسايتوجينيز ولليستريا ايفانوفي متطابقين بنسبة (٩٩.٤-٩٩.٥٤%) على التوالي ومتطابقين بنسبة (٩٩.٥-٩٩.٧٩%) مع السلالات المستودعة في بنك الجينات في العديد من دول العالم ,حيث سجلت عترةاللستريةالمستوحدة تطابق مع عتر البلدان التالية (استراليا, الولايات المتحدة الامريكية ,بولندا, الصين,روسيا,كندا,المانيا,جنوب افريقيا).

في حين سجلت عتر اللستريا ايفانوفي تطابق مع عتر البلدان التالية (الولايات المتحدة الامريكية,تركيا , المانيا,فرنسا).