University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Phenotypic and genetic characterization of *Mycoplasma* species isolated from upper respiratory tract and conjunctival infections in household dogs

A Thesis submitted by:

To the Council of the College of Veterinary Medicine/University of Mosul in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Doctor of Philosophe

In

Veterinary Medicine / Veterinary Microbiology

Supervised by

Professor

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

Summary

The *Mycoplasma* species are capable of causing infections in a variety of animals (pigs, cows, dogs, cats, poultry) and also in humans. The study was performed to isolate and detect *Mycoplasma* as a causative agent of upper respiratory tract and conjunctival infections in household dogs in Mosul City. One hundred household dogs of different ages, sexes, and breeds were subjected to the study including (60) dogs suffering from moderate to severe respiratory infections and (40) healthy dogs from different veterinary clinics in Mosul city during the period 1/2/2022-1/1/2023. Three hundred swabs were collected including nasal swabs (100), oropharyngeal swabs (100), and conjunctival swabs (100). The swabs were cultured in *Mycoplasma* media and incubated at 37℃ with 5% Co2 in a candle jar for 4-14 days. The growing colonies were examined microscopically under low magnification by light, and the dissecting microscope. The colonies were also stained with modified Dienes' stain. The results of the current study indicated that respiratory infections were predominant in young male household dogs in comparison with conjunctival infections in all examined dogs. The high isolation rate of *Mycoplasma* was from upper respiratory tract infections in diseased female dogs more than one year age (100%), whereas the conjunctival infections were more dominant and higher isolation rate in less than one-year males. The existing study revealed a high *Mycoplasma* isolation rate in respiratory swabs of Terrier and German dogs, while the conjunctival swabs were positive for Mycoplasmal culture in Husky and Belgium dogs (100%). Thus, *Mycoplasma* infections were more dominant in upper respiratory infections in female German and Terrier dogs.

Genotypically depiction of *Mycoplasma* isolates was done by a PCR approach from the upper respiratory tract and conjunctival infections in domestic dogs in Mosul city. This was accomplished by amplifying the specific *Mycoplasma* genus 16S rRNA gene in isolated *Mycoplasma* from conjunctival, nasal, and oropharyngeal swabs. The DNA of growing colonies was extracted and amplified then migrated in agarose gel to observe the bands. The study's findings revealed the isolation of (58) *Mycoplasma* isolates, with an overall swab isolation rate of around (58%) and a high rate of (69%) from nasal swabs, then from oropharyngeal swabs and conjunctival swabs (60%, 45%) sequentially. PCR technique showed that (34) isolates (from the total of 58 isolates) were assured for the 16S rRNA gene and yielded a band at (270bp), These findings are regarded as distinctive for the genus *Mycoplasma*. Depending on the DNA samples (10 samples) that were sent for sequencing, the outcomes of the 16S rRNA gene sequencing specified two strains of *Mycoplasma cynos* while the others were *Ureaplasma* spp. First strain was named "SM-MY-M23" and confirmed in the GenBank nucleotide sequence database under accession number “OQ446513 “and the second strain is under processing, so current results are considered as the first record of *Mycoplasma cynos* in dogs in Iraq.

The current study confirmed that the two isolates of *M. cynos* (Pathogenic canine Mycoplasmas) and three isolates of *Ureaplasma* possess active molecules (neuraminidase), which could potentially be an important pathogenic factor that enables colonization and survival in immunocompetent hosts. Screening for the virulence factor Haemagglutinin in both isolates of *M. cynos* and in *Ureaplasma* did not yield any results.

The existing study is considered the first record of *M. cynos* and *Ureaplasma* and their important virulence factor (Neuraminidase) from household dogs in Mosul city in Iraq.

جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

التوصيف المظهري والجيني لأنواع المفطورات المعزولة من اصابات المجرى التنفسي العلوي وملتحمة العين في الكلاب المنزلية

اطروحة تقدمت بها

الى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل

في اختصاص الطب البيطري/ الاحياء المجهرية

وهي جزء من متطلبات شهادة الدكتوراه فلسفة

بأشراف

الاستاذ الدكتور

١٤٤٥هـ ٢٠٢٣م

الخلاصة :

المايكوبلازما بأنواعها قادرة على التسبب في العدوى في مجموعة متنوعة من الحيوانات (الخنازير والأبقار والكلاب والقطط والدواجن) وكذلك في البشر. أجريت هذه الدراسة لعزل وكشف المايكوبلازما كعامل مسبب لالتهابات الجهاز التنفسي العلوي والملتحمة في الكلاب المنزلية في مدينة الموصل. تضمنت الدراسة مائة كلب منزلي من مختلف الأعمار والجنس والسلالات، منها (٦٠) كلباً يعاني من التهابات تنفسية متوسطة إلى حادة و (٤٠) كلباً سليماً من العيادات البيطرية المختلفة في مدينة الموصل خلال الفترة ٢/١/٢٠٢٢ – ٢٠٢٣/١/١. جمعت ثلاثمائة مسحة، شملت مسحات الأنف (١٠٠)، ومسحات الفم والبلعوم (١٠٠)، ومسحات الملتحمة (١٠٠). تمت زراعة المسحات في وسط المايكوبلازما وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية في جو ٥% من ثاني أكسيد الكربون داخل ناقوس زجاجي بوجود الشمعة لمدة ٤–١٤ يومًا. تم فحص المستعمرات المتنامية مجهريا تحت التكبير المنخفض بالمجهر الضوئي والمجهر التشريحي. وصبغت المستعمرات أيضًا بصبغة دينيس المعدلة. أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن التهابات الجهاز التنفسي كانت سائدة في الكلاب المنزلية الذكور الفتية مقارنة بالتهابات الملتحمة في جميع الكلاب المفحوصة. كانت نسبة عزل المايكوبلازما عالية من التهابات الجهاز التنفسي العلوي في إناث الكلاب المريضة بعمر أكبر من سنة (١٠٠%)، في حين كانت التهابات الملتحمة أكثر انتشاراً وأعلى نسبة عزل في الذكور أقل من سنة. وكشفت الدراسة الموجودة عن ارتفاع نسبة عزل المايكوبلازما في المسحات التنفسية لكلاب تيرير والكلاب الألمانية، بينما جاءت مسحات الملتحمة إيجابية لعزل المايكوبلازما في كلاب الهاسكي والكلاب البلجيكية (١٠٠%). لذا كانت عدوى المايكوبلازما أكثر سيادة في التهابات الجهاز التنفسي العلوي في إناث الكلاب الألمانية وكلاب التريير.

تم التحديد الوراثي لعزلات المايكوبلازما بواسطة تقنية PCR من الجهاز التنفسي العلوي والتهابات الملتحمة في الكلاب المنزلية في مدينة الموصل. تم تحقيق ذلك عن طريق تضخيم جين ١٦ rRNA S الخاص بجنس المايكوبلازما المعزولة من مسحات الملتحمة والأنف والفم والبلعوم. تم استخراج الحمض النووي للمستعمرات المتنامية وتضخيمه ثم ترحيله في هلام الاكاروز لمشاهدة الحزم.

أسفرت نتائج الدراسة عن عزل (٥٨) عزلة من عزلات المايكوبلازما، وبلغت نسبة عزل المسحات الإجمالية حوالي (٥٨%) وبنسبة عالية (٦٩%) من المسحات الأنفية، ثم المسحات الفموية البلعومية ومسحات الملتحمة (٦٠%، ٤٥%) بالتتابع. أظهرت تقنية PCR أنه تم التأكد من (٣٤) عزلة (من إجمالي ٥٨ عزلة) لجين 16S rRNA وأعطى نطاق عند (٢٧٠bp)، وتعتبر هذه النتائج مميزة لجنس المايكوبلازما. اعتمادًا على عينات الحمض النووي (١٠ عينات) التي تم إرسالها للتسلسل، حددت نتائج التسلسل لجين 16S rRNA سلالتين من *Mycoplasma cynos* بينما كانت العزلات الأخرى تابعة لجنس *Ureaplasma*. تم تسمية إحدى السلالات باسم "SM-MY-M23" وتم تأكيدها في قاعدة بيانات تسلسل النيوكليوتيدات في GenBank تحت رقم الانضمام "OQ446513" والسلالة الثانية قيد المعالجة، لذا تعتبر النتائج الحالية بمثابة التسجيل الأول لجرثومة *Mycoplasma cynos* في الكلاب في العراق .

أكدت الدراسة الحالية أن عزلتي (*M. cynos* المايكوبلازما الكلابية المسببة للأمراض) وثلاث عزلات من *Ureaplasma* تمتلك أنزيم (neuraminidase) ، والتي من المحتمل أن تكون عاملاً ممرضًا مهمًا يمكّن من الاستعمار والبقاء على قيد الحياة في عوائل ذات كفاءة مناعية. لم تسفر عملية التحري عن عامل الضراوة Haemagglutinin في عزلتي *M. cynos*و ايضاً عزلات *Ureaplasma* عن اي نتيجة.

تعتبر الدراسة الحالية التسجيل الأول لجراثيم *M. cynos* و *Ureaplasma* وعامل الضراوة المهم لهما النيورامنيديز (Neuraminidase) في الكلاب المنزلية في مدينة الموصل في العراق.