University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Prevalence and Genetic Diversity of Causative Agent of Bovine Viral Diarrhea Among Cattle in Mosul

Sadam Dhahir Hasan Ali

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

Supervised by

Professor

Dr. Kamal Al-Deen Mohalhal AL-Saad

2018 A.D. **1439 A.H.**

ABSTRACT

The current study was conducted to determine the prevalence of bovine viral diarrhea (BVD) and persistently infected (PI) animals using different laboratory methods including antigen capture enzyme linked immunosorbent assay (AC-ELISA) and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in Mosul, and to investigate some of the epidemiological risk factors associated with occurrence of the disease, with evaluation of the clinical picture, hematological and serum biochemical changes, and the effects on blood coagulation indices of diseased animals. However, investigation of genetic diversity and phylogenetic analyses of BVDV were also detected.

From January 2017 to August 2017, 494 ear notches (112 cows, 30 calves and 352 beef lot calves) were sampled from cattle of different sex, age and origin were subjected to different management systems, however, they had no vaccination history against BVDV. The animals were from the five regions in Mosul/Iraq including Gogjalee, Jelekhwan, Entisar, Kolantapa and Bartilla. Ear notch samples were tested by AC-ELISA test and multiplex PCR technique. For investigating PI animals, the positive cattle were screened for a second time after four weeks from the first sampling.

Fifteen milliliter of blood samples was collected from the jugular vein of cattle and used for Hematological analysis, estimated blood coagulation parameters and serum biochemical analysis. The clinical examination card was used to record the clinical findings on all cattle through clinical examination. Moreover, epidemiological data were collected through interview with the owners of the farms. The 5' UTR gene of BVDV extracted from ear notch was analyzed for genetic diversity and phylogenetic tree using online NCBI BLAST, ClustalX (NCBI) and Neighbor-joining (NJ) programs.

The overall prevalence of BVD in Mosul based on AC-ELISA and multiplex PCR technique were 5.46% (27 out of 494) and 13.96% (69 out of 494) respectively. In addition, the overall prevalence of persistent infection (PI) in cattle was 0.8% for each test.

Risk factors that were associated with higher prevalence of BVDV: in cattle aged (> 6 month - 2 year) was 19.18% (RR-Relative risk-: 5.94 times), in males was 17.47% (RR: 5.32 times), in Iranian, Syrian and Turkish cattle were 16.66%, 17.57% and 23.91% respectively (RR: 2.63times, RR: 2.43 times, and RR: 2.18 times respectively), in imported cattle was 18.27% (RR: 2.51 times), in large herd size(n: ≥40) was 20.64% (RR: 7.59 times) in Gogjalee region was ١٩,١٥% (RR: 7.47 times) and in winter and spring seasons, they were 27.56 % and 12.12 % respectively (RR: 7.94 and 3.49 times respectively).

This study revealed that the cattle were infected with the disease showed fever, anorexia and emaciation, profuse watery, or mucoied and sometimes mixed with bloody diarrhea, dehydration, respiratory disturbance (coughing, nasal discharge) and erosive and ulcerative lesions in oral cavity and on muzzle, drooling saliva, lacrimation, petechial and ecchymotic hemorrhages were also detected on the visible mucosa, epistaxis, poor growth, with different frequency percentage.

Data concerning hematological parameters of cattle infected with BVD indicated no significant change ($P<0.05$), in the total erythrocytes count and hemoglobin concentration. A significant increase ($P<0.05$), in PCV was registered. Furthermore leukopenia due to lymphopenia was significantly ($P<0.05$) indicated.

In addition, there was a significant decrease in platelet count with a significantly increased platelet distribution width, clotting time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time ($P<0.05$). Results of serum biochemistry analysis of the infected cattle revealed a significant increase in AST, ALT, ALP, BUN, and creatinine. However, no change was detected in the protein values (Total protein, albumins and globulins), glucose, and calcium in diseased animals than in controls ($P<0.05$).

The overall detection of both genotypes was 13.96%, for BVDV1 (12.95%)and for BVDV2 (1.01%). Nine variable sequences of BVDV1 and Four of BVDV2 obtained from cattle were deposited in the GenBank under accession numbers (MF347398–MF347406), (MF491394- MF491397) respectively.

According to the individual sequencing analysis (BLASTn) which was done out of 69 sequences of 5'UTR gene, 64 sequences of BVDV1 and 5 sequences for BVDV2

out of 494 ear notch cattle samples. For the first time three subgenotypes of BVDV1 were detected in Mosul: subgenotypes A, B and E (3.44%, 7.89% and 1.61% respectively), with significant commonly detected BVDV1 subgenotype B in cattle in Gogjalee region ($P<0.05$). In addition, for the first time two subgenotypes of BVDV2 were detected in Mosul: subgenotypes A and B (0.60% and 0.20% respectively), with significant commonly detected BVDV2 subgenotypes A and B in cattle in Gogjalee region ($P<0.05$).

جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

الانتشار والتباين الجيني لمسبب مرض الاسهال الفيروسي البقري للماشية في الموصل

صدام ظاهر حسن علي

أطروحة دكتوراه

الطب البيطري/ الطب الباطني والوقائي

بإشراف

الأستاذ الدكتور

كمال الدين مهلهل السعد

1439 هـ **2018 م**

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية تحديد نسبة انتشار مرض الاسهال الفيروسي البقري والاصابة الدائمة في الابقار والعجول في محافظة نينوى باستخدام اختباري الامتزاز المناعية المرتبطة بالأنزيم المباشر وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد كفحوصات تشخيصية للمرض، فضلاً عن تحديد بعض عوامل الخطورة الوبائية المرتبطة بحدوث المرض، مع تقييم الصورة السريرية والدموية والتغيرات الكيموحيوية وتأثير المرض على عوامل تخثر الدم في الحيوانات المصابة، بالإضافة الى كشف التنوع الجيني للفايروس واستحصال شجرة النشوء والتطور من التحليلات الجينية.

تم فحص ٤٩٤ عينة من ثلمات الأذن للفترة من شهر كانون الثاني٢٠١٧ الى شهر اب ٢٠١٧والتي اخذت من حيوانات غير ملقحة من مختلف الاعمار والاجناس والمنشا وطرق التربية (ابقار ١١٢ وعجول صغيرة العمر ٣٠ وعجول تسمين ٣٥٢) من مناطق مختلفة في محافظة نينوى (كوكجلي ، جليوخان ،الانتصار، قولان تبه وبرطلة) . ولتحديد الاصابة الدائمة في حيوانات الدراسة تم اعادة الفحص المختبري للحيوانات الموجبة للفحص الاولي بعد اربعة اسابيع من تاريخ الفحص الاول لكلا الاختبارين.

استخدمت استمارة خاصة اعدت مسبقا لتسجيل العلامات والفحوصات السريرية المطلوبة، واستحصلت جميع البيانات الوبائية من مالكي الحيوانات. كما تم جمع ١٥مل من دم الوريد الوداجي لحيوانات الدراسة لغرض اجراء الفحوصات الدموية والفحوصات المصلية والكيموحيوية.

استخدم الجين 5UTR لفايروس الاسهال البقري لتحليل التنوع الجيني ولغرض استحصال شجرة النشوء والتطور باستخدامprograms(NJ)and Neighbor-joining(NCBI)Clustal ,NCBI BLAST.

اكدت نتائج الدراسة ان النسبة المئوية الكلية للمرض كانت ٥,٤٦% و ١٣,٩٦% باستخدام اختباري المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم المباشر وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد على التوالي، كما كانت النسبة المئوية للإصابة الدائمة % 0.8 لكلا الاختبارين..

تبين من نتائج الدراسة واعتمادا على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد ان عوامل الخطورة المرتبطة بنسبة انتشار المرض كانت % 19.81 للأعمار (اقل من ٦ اشهر –٢ سنة) بمخاطرة نسبية ٥,٩٤ مرة و في الذكور بنسبة ١٧,٤٧% و بمخاطرة نسبية ٥,٣٢ مرة، كما سجلت النسب ١٦,٦٦% ، ١٧,٥٧% ، ٢٣,٩١% في الحيوانات من المناشئ الايرانية والسورية والتركية بمخاطرة نسبية ٢,٦، ٢,٤٣ ، ٢,١٨ مرة على التوالي، وقد اختلفت نسب الاصابة للمرض حسب المناطق فقد سجلت اعلى نسبة اصابة ١٩,١٥% في كوكجلي بمخاطرة نسبية ٧,٤٧ مرة، في حين سجلت النسبتين ٢٧,٥٦% و ١٢,١٢% في فصلي الشتاء والخريف و بمخاطرة نسبية ٧,٩٤، ٣,٤٩ مرة على التوالي.

أظهرت حيوانات الدراسة المصابة علامات ارتفاع درجة حرارة الجسم وفقدان الشهية والهزال مع اسهال مائي مخلوط بالمخاط احياناً او مدمم والجفاف وعلامات تنفسية (كالسعال والافرازات الانفية)، كما لوحظت افات تقرحيه متأكلة داخل تجويف الفم وعلى مخطم الحيوان المصاب وزيادة افراز اللعاب وتدمع العينيين ونزف حبري ونقطي على الاغشية المخاطية، الرعاف مع تراجع في نمو الحيوان.

بينت نتائج الدراسة الكشف عن نوعين جينين لفايروس الاسهال الفيروسي البقري وهما النوعان ١ و٢ (BVD2 , BVD1) وبنسب مئوية (١٢,٩٥% و ١,٠١%) على التوالي، اودع تسعة تسلسلات متغايرة للنوع ١

BVDV في بنك المورثاتGenBank بالتسلسلات MF347398-MF347406 وأربع تسلسلات متغايرة للنوع BVDV٢ بالتسلسلات MF491394-MF491397.

بينت نتائج الدراسة ارتفاع معنوي في حجم كريات الدم المرصوصة فضلا عن تناقص معنوي في العدد الكلي لخلايا الدم البيض، كما سجل انخفاض معنوي في العدد الكلي للصفيحات الدموية مع ارتفاع معنوي في نسبة انتشار الصفيحات الدموية ووقت التخثر والخثير وسابق الخثرين الجزيئي. كما اظهرت نتائج الدراسة ارتفاعا معنويا في خمائر ناقلة الالنين الاميني والاسبارتيت الاميني و الفوسفات القاعدية ويوريا نتروجين الدم والكرياتنين.

طبقاً للتحليل الجيني لتسعة وستون تسلسل منفرد، اظهرت نتائج الدراسة ان ٦٤ تسلسلا منها كانت تابعة للنوع الجيني BVDV١ وخمسة تسلسلات تابعة للنوع الجيني BVDV٢ ، كما سجلت الدراسة وللمرة الاولى في محافظة نينوى ثلاثة مورثات تحت نوعية subgenotypes من فايروس الاسهال البقري النوع الاول (BVDV1) E,B,A وبالنسب ٣,٤٤%و ٧,٨٩%و ١,٦١% على التوالي ,وكان الموروث تحت النوع subgenotypes B الاكثر شيوعا وبشكل معنوي وبخاصة في منطقة كوكجلي، بالإضافة الى تسجيل وللمرة الاولى ايضا نوعين من موروثات فايروس الاسهال البقري BVDV٢ تحت النوع subgenotypes A و B وبالنسب % ٠,٦٠ و ٠,٢٠% على التوالي.