University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Molecular and Epidemiological Study of *Mycoplasma bovis* in Cattle in Nineveh Governorate, Iraq

Khoder Ahmed Mahmood AL-Azow

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

Supervised by

Prof. Dr.
Qaes Talb Shukur

Prof. Dr.
Mohammad Ali Hamad

2024 A.D. **1446 A.H**

ABSTRACT

The present study aimed at: determining the prevalence of *Mycoplasma bovis* in cattle in Nineveh Governorate, Iraq, using different diagnostic methods: culture method, indirect enzyme immunosorbent assay (i-ELISA), and polymerase chain reaction (PCR) techniques, evaluating the efficiency of these laboratory methods; investigate some of the epidemiological risk factors associated with the prevalence of the microorganism, recording the clinical manifestations in infected animals, and investigating the phylogenetic analyses of *M. bovis* detected in this study.

The study included 352 cattle with different ages, sexes, breeds, herd sizes, health states, pregnancy states, regions of samples collection, and seasons. These cattle comprising 15 cattle which were apparently healthy and tested negative for *M. bovis*, were used as a control group. In the period from (March 2022) to (February 2023), a unique clinical examination card was used to clinical signs record, and other information of epidemiology. Different samples were collected from 352 cattle, including blood samples (n=352), nasal swabs (n=352), ocular swabs (n=40), synovial fluid (n=65), and milk samples (n=30), that were obtained from different regions in Nineveh Governorate. The nasal swabs were used for the culture method and conventional PCR (c-PCR) technique based on the 16S rRNA gene for Mycoplasma spp., and using nasal swabs and the other samples mentioned above for multiplex PCR (m-PCR) technique based on the *uvr*C and *gap*A genes for *M. bovis*. Furthermore, using serum samples for the indirect ELISA (i-ELISA) test to detect the antibody against *M. bovis*. The agreement between the involved diagnostic techniques was assessed according to the Kappa value.

Additionally, computed the accuracy, specificity, and sensitivity of the m-PCR technique and i-ELISA compared to the culture method. A total of 30 PCR positive products for *M. bovis* DNA amplicons of the *uvr*C gene (n=15) and *gap*A gene (n=15) from various cattle samples, three products for each type of sample, respectively, were sent to a commercial company for purification and sequencing. The phylogenetic and trees for the local *M. bovis* sequences were constructed using different online programs. In the current study, the overall prevalence of *M. bovis* in cattle from Nineveh Governorate was 23.57%, 47.15%, and 30.68% using the culture method, i-ELISA, and m-PCR technique, respectively. Based on the kappa value (0.807), there was perfect agreement between m-PCR technique and the culture method, with sensitivity 98.79%, specificity 90.33%, and accuracy 92.32%, for m-PCR technique. Whereas, based on kappa (0.444), there was a moderate agreement between i-ELISA and culture method, sensitivity 89.15%, specificity 65.79%, and accuracy 71.30%, for i-ELISA. According to the m-PCR technique, there was no significant difference in the prevalence of *M. bovis* in various types of samples: blood samples, nasal swabs, ocular swabs, synovial fluid, and milk samples, which were 27.55%, 30.68%, 22.50%, 27.69%, and 23.33%, respectively. In addition, there were significant risk factors associated with a higher prevalence of *M. bovis* recording in calves more than 6 months to 2 years old, ox, imported animals, pregnant cows, large herd sizes, indoor and outdoor management, the eastern regions of Nineveh Governorate, and the autumn and winter seasons. Clinical examination of cattle observed that were suffering from fever, loss of appetite, depression, emaciation, bronchopneumonia, keratoconjunctivitis, arthritis, and mastitis. Significantly increased in body temperature, respiratory rate, and heart rate in clinically infected cattle compared to clinically healthy animals. The phylogenetic analysis for the first time, 5 local sequences of the *uvr*C gene

for *M. bovis* in Nineveh Governorate that were deposited in the NCBI GenBank under the accession numbers (OR784598.1, OR784599.1, OR784600.1, OR784601.1, OR784602.1) were highly related (99.13% - 100% identity) to other sequences that were registered in the GenBank from different countries, including Canada, Iran, Poland, Switzerland, and Egypt. Moreover, for the first time, 5 local sequences of the *gap*A gene for *M. bovis* in Nineveh Governorate that were deposited in the NCBI GenBank under the accession numbers (OR792211.1 - OR792215.1) were highly related (99.81% -100% identity) to other sequences that were registered in the GenBank from different countries, including Canada and Egypt. In conclusion, *M. bovis* is widely spread in cattle in Nineveh Governorate, Iraq; the m-PCR technique is more efficient than ELISA for diagnosing *M. bovis*; there are several risk factors associated with the higher prevalence of *M. bovis*. Furthermore, the phylogenetic analysis of the local sequences that were first reported in Nineveh Governorate is important for the strategic control of *M. bovis* in the study regions.

جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

دراسة جزيئية ووبائية للتمفطرات البقرية في الابقار في محافظة نينوى، العراق

خضر أحمد محمود العزو

أطروحة دكتوراه

□ الطب البيطري / الطب الباطني والوقائي البيطري

□

بإشراف

الأستاذ الدكتور
قيس طالب شكر

الأستاذ الدكتور
محمد علي حمد

2024م □ 1446هـ□

المستخلص

تهدف الدراسة الحالية ما يلي: تحديد مدى انتشار المتفطرات البقرية في الابقار في محافظة نينوى، العراق، باستخدام طرائق تشخيصية مختلفة: طريقة الزرع الجرثومي، واختبار الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم غير المباشر وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل؛ مع تقييم كفاءة الطرائق المختبرية المستخدمة؛ والتحقق من بعض عوامل الخطورة المرتبطة بانتشار الجرثومة؛ وتسجيل العلامات السريرية الظاهرة على الحيوانات المصابة؛ مع التحقيق من تحليلات النشوء الجيني للمفطورات البقرية المشخص في هذه الدراسة. شملت الدراسة 352 من الابقار مختلفة الاعمار والاجناس والمنشاء حجم القطيع والحالة الصحية وحالة الحمل، ومناطق جمع العينات، والمواسم. ومن ضمنها 15 من الابقار السليمة سريريا والسالبة مختبريا للمتفطرات البقرية والتي عدت كمجموعة سيطرة. من خلال الفترة الممتدة من أذار 2022 إلى شباط 2023، استُخدم نموذج استمارة فحص سريري خاصة لتسجيل العلامات السريرية وغيرها من المعلومات الوبائية. وجمعت عينات مختلفة من 352 من الابقار، شملت عينات دم (352) ومسحات الانف (352) ومسحات من العين (40) والسائل المفصلي (65) وعينات الحليب (30)، تم الحصول عليها من مناطق مختلفة في محافظة نينوى. استُخدمت المسحات الانفية لكل من طريقة الزرع الجرثومي وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي اعتمادا على الجين 16S rRNA لجنس المفطورات، كما استخدمت عينات الانف والعينات المذكورة اعلاه في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد اعتمادا على الجين *uvrC* والجين *gap*A للمفطورات البقرية. فضلا عن، استخدام عينات مصل الدم لاختبار الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم غير المباشر للكشف عن الاجسام المضادة للمفطورات البقرية. كما تم تقييم التوافق بين الطرائق التشخيصية المختلفة على أساس قيمة كابا. فضلا عن، حساب الحساسية والخصوصية والدقة لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد واختبار الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم غير المباشر مقارنة مع طريقة الزرع الجرثومي. مما مجموعه 30 ناتج موجب لتفاعل البلمرة المتسلسل للحامض النووي منقوص الاوكسجين للمفطورات البقرية للجين *uvrC* (15) والجين *gap*A (15) من العينات الابقار المختلفة (عينات الدم ومسحات الأنف ومسحات العين والسائل المفصلي وعينات الحليب)، تم إرسال ثلاثة نواتج لكل نوع من العينات على التوالي، الى شركة تجارية للتنقية والحصول على التسلسل الجيني. كما تم التحليل الجيني وانشاء شجرة النشوء الجيني للتسلسلات المحلية للمفطورات البقرية باستخدام برامج مختلفة على متصفح ويب. في الدراسة الحالية، بلغت نسبة الانتشار الكلي للمفطورات البقرية في الابقار في محافظة نينوى 23.57% و47.15% و30.68% باستخدام طريقة الزرع الجرثومي واختبار الممتز المناعي المرتبط

بالأنزيم غير المباشر وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد على التوالي. واعتمادا على قيمة كابا (0.807) لوحظ وجود توافق تام بين تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد وطريقة الزرع الجرثومي، مع نسبة حساسية 98.79% وخصوصية 90.33% وبدقة 92.32%، لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد. في حين اعتمادا على قيمة كابا (0.444) لوحظ وجود توافق معتدل بين اختبار الممتز المناعي غير المباشر وطريقة الزرع الجرثومي، مع نسبة حساسية 89.15%، وخصوصية 65.79%، وبدقة 71.30%، لاختبار الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم غير المباشر. اعتمادا على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي، لم يكن هناك فرق معنوي في نسبة انتشار المفطورات البقرية في مختلف أنواع العينات: عينات الدم ومسحات الأنف ومسحات العين والسائل المفصلي وعينات الحليب، والتي بلغت 27.55% و30.68% و22.50% و27.69% و23.33% على التوالي. فضلا عن انه كانت هناك عوامل خطر معنوية مرتبطة بارتفاع نسبة انتشار المفطورات البقرية في سجلت العجول التي اعمارها أكبر من 6 أشهر إلى سنتين وذكور الأبقار والحيوانات المستوردة والأبقار الحوامل والقطعان الكبير الحجم والأبقار التي تتغذى داخل الحضائر والمناطق الشرقية من محافظة نينوى وفصلي الخريف والشتاء. كما لوحظ من خلال الفحص السريري للأبقار المصابة أنها عانت من الحمى وفقدان الشهية والخمول والهزال واضطراب التنفسية وعلامات على العينين وعلامات على المفاصل، وعلامات على الضرع. حدثت زيادة ملحوظة في درجة حرارة الجسم ومعدل ترداد التنفس ومعدل ضربات القلب في الأبقار المصابة سريرياً مقارنة مع مجموعة السيطرة. اظهرت نتائج تحليل 5 تسلسلات جينية محلية الجين *uvrC* للمفطورات البقرية والتي تم تسجيلها في بنك الجينات وبأرقام تسلسلية (OR792211.1 - OR792215.1)، انها مرتبطة وبشكل كبير (99.81% - 100٪ نسبة تشابه) بالتسلسلات الاخرى المسجلة في بنك الجينات من بلدان مختلفة شملت كندا وإيران وبولندا وسويسرا ومصر. كما واظهرت نتائج تحليل 5 تسلسلات جينية محلية الجين gapA للمفطورات البقرية والتي تم تسجيلها في بنك الجينات وبأرقام تسلسلية (OR784598.1 - OR784602.1)، انها مرتبطة وبشكل كبير (99.13% - 100% نسبة تشابه) بالتسلسلات الاخرى المسجلة في بنك الجينات من بلدان مختلفة شملت كندا ومصر. استنتج من الدراسة، الانتشار الواسع للمفطورات البقرية في الأبقار في محافظة نينوى، العراق؛ تعد تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد أكثر كفاءة من اختبار الممتز المناعي غير المباشر في تشخيص المفطورات البقرية؛ هناك العديد من عوامل الخطر المرتبطة بارتفاع نسبة انتشار المفطورة البقرية؛ عانت الابقار المصابة بالمفطورات البقرية وبشكل رئيسي من اضطرابات تنفسية وعلامات على العين والمفاصل والضرع؛ تساهم الابقار المصابة سريريًا وتحت سريري، في انتشار المفطورة البقرية. فضلا عن التحليل النشوئي الجيني

للتسلسلات الجينية المحلية التي تم تسجيلها ولأول مرة في محافظة نينوى، تعد مهمة للسيطرة الاستراتيجية على المفطورات البقرية في مناطق الدراسة.