



شبكة المعلومات الجامعية  
التوثيق الإلكتروني والميكرو فيلم

# بسم الله الرحمن الرحيم



**HANAA ALY**



شبكة المعلومات الجامعية  
التوثيق الإلكتروني والميكروفيلم



# شبكة المعلومات الجامعية التوثيق الإلكتروني والميكروفيلم



**HANAA ALY**



شبكة المعلومات الجامعية  
التوثيق الإلكتروني والميكروفيلم

# جامعة عين شمس

## التوثيق الإلكتروني والميكروفيلم

### قسم

نقسم بالله العظيم أن المادة التي تم توثيقها وتسجيلها  
علي هذه الأقراص المدمجة قد أعدت دون أية تغييرات

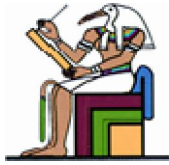


### يجب أن

تحفظ هذه الأقراص المدمجة بعيدا عن الغبار



**HANAA ALY**



Cairo University

Cairo University  
Faculty of Veterinary Medicine



# **Studies on Virulence and Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma* Species Recovered from Sheep and Goat**

*A Thesis Presented by*

**Mona Mahdy Osman Abd Eldaym**

Assistant researcher, *Mycoplasma* Department, Animal Health  
Research Institute, ARC  
Master degree in Veterinary Medical Sciences  
Microbiology (Bacteriology, Immunology and Mycology)  
Cairo University 2015

**To**

Cairo University,  
Faculty of Veterinary Medicine,

For the Degree of PhD of Veterinary Medical Sciences, Microbiology  
(Bacteriology, Immunology and Mycology)

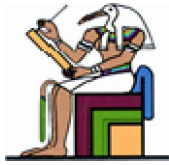
**Under Supervision of**

**Prof. Dr. Kamelia Mahmoud Osman**  
Professor of Microbiology  
Faculty of Veterinary Medicine  
Cairo University

**Prof. Dr. Mahmoud El-Said Hashad**  
Professor and head of Microbiology  
Department  
Faculty of Veterinary Medicine  
Cairo University

**Prof. Dr. Manal Abu Elmakarm Mohamed**  
Chief researcher in *Mycoplasma* Department  
Animal Health Research Institute, ARC

**(2022)**



Cairo University

Cairo University  
Faculty of Veterinary Medicine



## Supervision Sheet

**Prof. Dr. Kamelia Mahmoud Osman**

Professor of Microbiology  
Faculty of Veterinary Medicine  
Cairo University

**Prof. Dr. Mahmoud El-Said Hashad**

Professor and Head of Microbiology Department  
Faculty of Veterinary Medicine  
Cairo University

**Dr. Manal Abu Elmakarm Mohamed**

Chief Researcher in *Mycoplasma* Department  
Animal Health Research Institute-ARC.



Cairo University  
Faculty of Veterinary Medicine  
Department of Microbiology

Name : **Mona Mahdy Osman Abdel-daym**  
Nationality : **Egyptian**  
Birth date : **2/9/1984**  
Degree : **PhD**  
Specification : **Microbiology (Bacteriology, Immunology, Mycology)**  
Thesis title : **Studies on virulence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma* species recovered from sheep and goat**

**Supervisors:**

**Prof. Dr. Kamelia Mahmoud Osman**

Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University

**Prof. Dr. Mahmoud El-Said Gamel Hashad**

Professor and head of Microbiology Department- Faculty of Veterinary Medicine- Cairo University

**Dr. Manal Abou El-Makarem Mohamed**

Chief Researcher, *Mycoplasma* Department, Animal Health Research Institute, El Dokki, Giza. AHRI. ARC

**Abstract**

In the present study, a total of 400 samples; collected from sheep and goat; were processed for isolation and identification of *Mycoplasma* species, microbiologically and by molecular techniques. Out of the examined samples, only 43 *Mycoplasma* isolates (10.75%) were identified as *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* and untyped *Mycoplasma* species. *M. arginini* showed the highest isolation rate from both sheep and goat with incidences of 58.3% and 58.1%, respectively. While, the incidence of *M. ovipneumoniae* was 11%, and 30% for the untyped *Mycoplasma* species. Confirmation of the isolates was done by PCR then by sequencing of the PCR products. The sequence results of 5 *M. arginini* sheep isolates, 4 *M. arginini* goat isolates, 4 *M. ovipneumoniae* sheep isolates, one *M. ovipneumoniae* goat isolate were all submitted to the Genbank taking the accession numbers; MK291433, MK291434, MK291435, MK291436, MK291437, MK640677, MK640679, MK643127, MK774823, MK300052.1, MK 300042.1, MK 361039.1, MK 361029.1 and MK300051.1, respectively, in addition to one untyped *Mycoplasma* species with the accession number MK910041. The phenotypic virulence traits of sheep and goat isolates including hemolytic activity, biofilm formation, hydrogen sulfide production and catalase enzyme activity were tested. *Mycoplasma* species isolates showed weak adherence ability to the polystyrene multiwall plates. Phenotypically, the hemolytic activity was recorded in 18 sheep isolates and 13 goat isolates. The antibiotic susceptibility testing by MIC showed sensitivity of both sheep and goat isolates to tulathromycin, tylosin, streptomycin and oxytetracycline. All the isolates were resistant to lincomycin. H<sub>2</sub>S was detected in eight sheep isolates and 5 goat isolates. Genotypic characterization of the tested positive isolates showed negative results for fluoroquinolone and macrolide resistance genes (*gyrB*, *parC*, *parE*, 23S rRNA D2, 23S rRNA D5, *rplD*, and *rplV*). The present study highlights the role of *Mycoplasma* species affecting sheep, goat. To our knowledge, it is the first record for biofilm production by *Mycoplasma* isolates, also, the first record of studying the hemolytic activity of *Mycoplasma* species of veterinary origin.

**Key words:** Biofilm, MIC, *Mycoplasma*, PCR, Sequencing.

جامعة القاهرة  
قسم الميكروبيولوجيا

الإسم : منى مهدى عثمان عبدالدايم  
تاريخ الميلاد : ١٩٨٤/٩/٢  
الجنسية : مصرية.  
الدرجة : الدكتوراة.  
التخصص : الميكروبيولوجي (البكتريولوجي والمناعة والفطريات).  
عنوان الرسالة : دراسات على ضراوة وحساسية الميكوبلازما المعزولة من الاغنام والماعز للمضادات الحيوية

تحت اشراف

أ.د. كاميليا محمود عثمان  
أستاذ الميكروبيولوجي كلية الطب البيطري - جامعة القاهرة  
أ.د. محمود السيد جميل حشاد  
أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجي كلية الطب البيطري - جامعة القاهرة  
د. منال أبو المكارم محمد  
رئيس بحوث - قسم الميكوبلازما - معهد بحوث صحة الحيوان

المستخلص العربي

في الدراسة الحالية، مجموعة من ٤٠٠ عينة؛ تم تجميعها من الأغنام والماعز. تم معالجتها لعزل وتعريف أنواع الميكوبلازما، ميكروبيولوجيا ومن خلال التقنيات الجزيئية. من بين العينات التي تم فحصها، تم تحديد ٤٣ عزلة من الميكوبلازما (١٠،٧٥ ٪) على أنها ميكوبلازما أوفينيوموني وميكوبلازما أرجيني وميكوبلازما لم يتم تصنيفها. أظهرت الميكوبلازما أرجيني أعلى معدل عزل من كل من الأغنام والماعز بنسبة ٥٨،٣ ٪ و ٥٨،١ ٪ على التوالي. بينما كانت نسبة عزلات الميكوبلازما أوفينيوموني ١١ ٪ و ٣٠ ٪ لأنواع الميكوبلازما التي لم يتم تصنيفها. تم تأكيد العزلات بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل ثم عن طريق تسلسل منتجات تفاعل البلمرة المتسلسل. تم تقديم نتائج تسلسل ٥ عزلات من الأغنام للميكوبلازما أرجيني، ٤ عزلات من الماعز للميكوبلازما أرجيني، ٤ عزلات من الأغنام للميكوبلازما أوفينيوموني، عزلة واحدة من الميكوبلازما أوفينيوموني لبنك العترات الدولي، وأخذت العينات أعداد المدخلات. MK291434، MK291433، MK640679، MK640677، MK291437، MK291436، MK291435، MK643127، MK774823، MK300052.1، MK300042.1، MK361039.1، MK361029.1 و MK300051.1 على التوالي، بالإضافة إلى نوع واحد غير محدد من الميكوبلازما برقم إدخال MK910041. تم اختبار سمات الضراوة المظهرية لعزلات الأغنام والماعز بما في ذلك النشاط الانحلالي، تكوين الأغشية الحيوية، إنتاج كبريتيد الهيدروجين ونشاط إنزيم الكاتلاز. أظهرت عزلات أنواع الميكوبلازما ضعف قدرة الالتصاق بالواح البوليسترين متعدد الجدران. ظاهريا، تم تسجيل النشاط الانحلالي في ١٨ عزلة من الأغنام و ١٣ عزلة من الماعز. أظهر اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بواسطة MIC، حساسية كل من عزلات الأغنام والماعز للتولاثرومييسين، التيلوزين، الستريتومايسين والأوكسي تتراسيكلين. جميع العزلات كانت مقاومة للينكومايسين. تم الكشف عن كبريتيد الهيدروجين في ثمانى عزلات من الأغنام و ٥ عزلات من الماعز. أظهر التوصيف الوراثي للعزلات الإيجابية المختبرة نتائج سلبية للجينات المقاومة للفلوروكينولون والماكروليد (gyrB، parC، parE، 23S rRNA D2، 23S rRNA D5، rplD و rplV). تسلط الدراسة الحالية الضوء على دور أنواع الميكوبلازما في الأغنام والماعز. على حد علمنا، هذا هو السجل الأول لإنتاج الأغشية الحيوية بواسطة عزلات الميكوبلازما، وهو أيضا السجل الأول لدراسة النشاط الانحلالي لأنواع الميكوبلازما من أصل حيواني.

الكلمات الدالة: بيوفيلم- أقل تركيز فعال- التحليل الجيني.

## *Dedication*

*To*

*My dear parents, my dear brothers and sisters*

*And my children*

*And my friends*



# *Acknowledgment*

*ALLAH, the Most Gracious, the Most Merciful, is to be praised for all the blessings awarded upon me throughout my life, as well as for providing me with the patience and strength to complete this task,*

*Prof. Dr. Kamelia Mahmoud Osman, the professor of microbiology at Cairo University Faculty of Veterinary Medicine. I'd like to express my gratitude to her for assisting and encouraging me at every stage of my work,*

*Prof. Dr. Manal Abu El-makarem Mohamed, Chief researcher in Department of Mycoplasma Animal Health Research Institute, Dokki, Giza, for her wise guidance, careful monitoring, persistent support, and sincere aid and personal supervision during this work.*

*I am deeply grateful to Dr. Mahmoud hashad professor of Microbiology and the head of the department Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, for his sincere help and useful guidance.*

*I am deeply grateful to Dr. Heba Naim Mohamed, the assistant professor of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, for her sincere help and useful guidance, in addition to writing and finishing this document.*

*I would like to express my deepest gratitude to all the members of Microbiology Department at Cairo University, Faculty of Veterinary Medicine. In addition, all staff members of Mycoplasma Department, Animal Health Research Institute for the sincere help.*

## Contents

Title	Page
<b>1-Introduction.</b>	<b>1</b>
<b>2-Review of literature.</b>	<b>9</b>
General overview	9
Pathogenicity of <i>Mycoplasma</i>	10
Isolation of <i>Mycoplasma</i> species from sheep	20
Isolation of <i>Mycoplasma</i> species from goat	22
Phenotypic virulence determinant	29
Ovine non progressive pneumonia	37
<b>3-The Published.</b>	<b>43</b>
<b>4-Discussion.</b>	<b>65</b>
<b>5-Conclusion and future prospective.</b>	<b>80</b>
<b>6-English Summary.</b>	<b>82</b>
<b>7-References.</b>	<b>86</b>
المخلص العربي	-
المستخلص العربي	-

## List of Figures

Fig. No.	Title	Page No.
1	Categories of environmental determinant for disease occurrence	2
2	Diagnosis of infectious respiratory diseases of small ruminants	28
3	<i>M. ovipneumoniae</i> invasion and persistence in bighorn sheep populations: epidemiology and epidemiology	41
4	Environmental factors increasing oxidative stress leading to initiation and progression of respiratory problems.	65

## List of Tables

Table No.	Title	Page No.
1	The major pathogenic mollicutes of ruminants	4
2	Details of the geographical distribution and the associated diseases of <i>Mycoplasma</i> species affecting sheep and goats	13

## List of Abbreviations

Abbreviation	Complete name
<b>A</b>	<i>Acholeplasma</i>
<b>bp</b>	Base pair
<b>cfu</b>	Colony forming unit
<b>CA</b>	Contagious agalactia
<b>CBPP</b>	Contagious Bovine Pleuropneumonia
<b>CCPP</b>	Contagious caprine pleuropneumonia
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>LC</b>	Large colony
<b>MAKePS</b>	Mastitis ,arthritis ,keratoconjunctivits ,pneumonia
<b>Ma</b>	<i>Mycoplasma agalactia</i>
<b>Mcc</b>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subspecies <i>capricolum</i>
<b>MCCP</b>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subspecies <i>capripneumoiea</i>
<b>Mmc</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subspecies <i>capri</i>
<b>MmmLC</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subspecies <i>mycoides</i> Large colony
<b>Mp</b>	<i>Mycoplasma putreficiens</i>
<b>OIE</b>	Office International des Epizooties
<b>ORC</b>	Ovine respiratory complex
<b>PPLO</b>	Pleuropneumonia like organism
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>QRDRs</b>	Quinolones resistant determining regions
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>rRNA</b>	Ribosomal ribonucleic acid
<b>SOD</b>	superoxide dismutase

## **Chapter 1**

### **Introduction**



## Introduction

Small ruminants; which can provide meat, milk, and wool; are valuable assets for Mediterranean, African, and Southeast Asian countries. Respiratory disorders are very common in these species, and they account for nearly half of their deaths. Respiratory diseases due to infectious causes in sheep and goats account for 5.6 % of all diseases in small ruminants, inspite of causative agent (**Kumar *et al.*, 2014**). Sheep and goats suffer from similar health issues. Although there are some significant variations between the species, there are also some similarities. In sheep and goats, respiratory infections are a widespread and cause severe diseases. Sheep and goats are susceptible to a variety of pneumonia complexes. In sheep-raising countries, respiratory diseases are major welfare and economic problems. Economic casualties include not only deaths, but also condemnations, lower growth rates, carcass downgrading, and treatment or prevention costs. These diseases can affect animals of any age, but they are more common in lambs older than three weeks (**Lacasta *et al.*, 2008**). The disease's multi-factorial nature adds to its complexity. Respiratory diseases are the result of a complex relationship between the host, the disease-causative agent and the environment.

As a result, respiratory disorders in ovine or as known Ovine Respiratory Complex (ORC), just as they are in bovines and porcinis, since they cannot be understood as a single-factor disease condition. Environmental factors have long been thought to be the most important determinants of disease occurrence (Figure 1). This principle is used in both conventional and chemical disease prophylactic and therapeutic