Epidemiologicalandmolecularstudyof haemoparasitic Infection of camels (*Camelus dromedarius*) in Aswan Governorate, Egypt

Thesis Presented By

MohammedSamiAbdAl-HameedAhmed

(B.A.Sc., Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University, 2012)

For the degree of M.V.Sc.

(Infectious Diseases)

UnderSupervisionof

Prof.Dr./AhmedMahmoudAttiaZAITOUN

Professor of Infectious diseases Department
of Animal Medicine Faculty of Veterinary
Medicine Assiut University

Prof.Dr./AhmedAbdel-RadyMAHMOUD

Professor of Infectious diseases Department
of Animal Medicine Faculty of Veterinary
Medicine Assiut University

Prof.Dr./Mohsen IbrahimARAFA

Senior parasitologist
Chiefresearcher,AnimalHealthResearchInstitute,Assiutbranch

Department of Animal Medicine Faculty of Veterinary Medicine Assiut University

(2020)

CONTENTS

Page

1. INTRODUCTION 1

2. LITERATURE 3
   Importance of camels in the world 3
   Clinical signs of haemoparasitic infection 3
   Epidemiology of haemoparasitic infestation in camels 8
   Diagnosis of haemoparasitic infection in camels 13
   Molecular diagnosis of haemoparasitic infection in camels 17

3. MATERIAL AND METHODS 20
   Study area 20
   Animals 20
   Types of samples 21
   Parasitological examination 21
   Molecular examination 22

4. RESULTS 29
   Clinical examination of the camels 30
   Epidemiological pattern of T. evansi infection of clinically suspected cases 39
   Epidemiological pattern of Theileria infection in examined camels 52
   Morphological studies on *Babesia spp* in examined camels 58
   Ticks infestation in examined camels 60
   Epidemiological pattern of filarial infection in camels 63
   Toxoplasma gondii infection in camels 64

5. DISCUSSION… 65

6. CONCLUSION 75

7. SUMMARY 76

8. REFERENCES 81

الملخص العربي

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1	Age groups, sex and Seasons of the examined camels	20
2	Oligonucleotide primers sequences	23
3	Preparation ofPCR Master Mix according to Emerald Amp GT PCR master mix (Takara) Code No. RR310A kit	26
4	Cycling conditions of the different primers during cPCR	27
5	The overall prevalence of haemoparasites detected inexamined camels.	29
6	Clinical findings of the clinically suspected cases (n= 256)	30
7	Prevalence of *T.evansi* infection in examined camels by blood smear.	38
8	Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection by PCR	38
9	Seasonal distribution of samples of the examined camels	40
10	Effect of seasons on the infection rate of *T.evansi* by blood smear	41
11	Effect of seasons on the infection rate of *T.evansi* by PCR technique	41

CONTINUATION OFTABLES

No.	Title	Page
12	Effect of seasons on the infection rate with *T. evansi* in clinically suspected camels by blood film and PCR	42
13	Age distribution of the examined camels according to clinical state	43
14	Effect of age on the infection rate with *T. evansi* by blood smear	43
15	Effect of age on the infection rate with *T. evansi* by PCR	44
16	Effect of age on the infection rate with *T. evansi* by blood smear and PCR technique	44
17	prevalence of *Theileria* infection in examined camels	52
18	Seasonal influences on *Theileria* infection of the examined camels by blood smear	54
19	Effect of age on the infection rate with *T. evansi* by GBS	55
20	Total number of samples tested by thin blood smear and PCR for microfilaria infection	63

LIST OF CHARTS

No.	Title	Page
1	The overall prevalence of haemoparasites detected in examined camels by conventional parasitological tests	29
2	Clinical findings of the clinically suspected cases (n= 256) (%)	12
3	Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection in examined camels by blood film and PCR	39
4	Seasonal influences on *Trypanosoma* infection of the examined camels by blood smear &PCR	42
5	Effect of age on the infection rate with *T. evansi* by blood smear and PCR technique	45
6	Clinical and parasitological (GBS) examination for *Theileria infection* in camel	53
7	Seasonal influences on *Theileria* infection of the examined camels.	54
8	Age susceptibility of the examined camels to *Theileria* infection	55

LIST OF FIGURE

No	Title	Page
1	A, B Congestion of the blood vessels of dulla	32
2	corneal opacity	32
3	A, B and C -Characteristicdepthoftheflankregionduringstanding position. -Severemaciation,disappearanceofthehumpandprojectionofthe ribs. -Sloughing of the hairy coat of the hump. -Projection of the head of the hip bone.	33
4	A,Hyperlacrimationwiththepresenceofgabbetweenthe eyeball and the bone, when press tears down. B, Harsh, dried and scruffy skin.	34
5	AandB,Enlargementofsuperficialcervicallymphnodesat thebase ofthenecksurroundbywideedematousarea	34
6	A:Swellingofthescrotalsacwithabsenceofscrotalraphea. -Wrinklingand roughness ofscrotal skinwithcrust formation. B:Enlargementofscrotalsacincludingtheinternal structure. C:Rupture ofscrotal skin with protruded abscess fromenlarged testicle.	35
7	A- Edematous deviatedprepuce B-Balanoposthitis: edematous prolapsed penis with losingof thecharacteristic hook shaped of the glans penis (white arrow). -Edematous swelling of the knee joint (black arrow)	36
8	A–Numerousticks presentintheinnersideofthethigh. B-Numerousticks presentontheneckregionwithwrinkling of theskin	36

Continuation of Figure

No.	Title	Page
9	A and B, Blood film stained with Giemsa stain shows slender form of *T. evansi*. Typical forms of the parasite (free flagellum, central nucleus, undulating membrane, sub terminal small kinetoplast and pointed posterior end).	47
10	Blood film stained with Giemsa stain shows intermediate form of *T. evansi* in noticed the rounded posterior end (X1000)	47
11	Blood film stained with Giemsa stain shows stumpy form of *T. evansi*, noticed absent of free flagellum.	48
12	Blood film stained with Giemsa stain shows posterior nucleated slender form of *Trypanosoma evansi*	48
13	Blood film stained with Giemsa stain shows division of nucleus of slender form.	49
14	Blood film stained with Giemsa stain shows division of nucleus intermediate form, notes granulated cytoplasm and rounded posterior end X1000.	49
15	Blood film stained with Giemsa stain shows division of free flagellum of *T. evansi*.	49
16	Blood film stained with Giemsa stain shows division of nucleus and kinetoplast *T. evansi* X1000.	49
17	Blood film stained with Giemsa stain show two trypanosomes at late stage of division X1000	50
18	Blood film stained with Giemsa stain shows plenty of slender and dividing forms of *T. evansi* X1000	50
19	A and B, Blood film stained with Giemsa stain shows abnormal multiplying forms of T. *evansi*. Notes very thin of posterior end of the parasite (arrow).	51

Continuation ofFigure

No.	Title	Page
20	Agarose(1.5%)gelelectrophoresisof PCR-productin camel infected with *Trypanosomaevansi*.	51
21	Ring stages of *Theileria spp.* in the examined camel bloodsamples(X1000	56
22	*Theileria* (microschizontinfectedmononuclearcells) X1000.	56
23	Ring stages of *Theileria spp.* in examined camel blood samples.	57
24	Oval stage of *Theileria spp.* in examined camel blood samples.Note macrocyticanemiaofRBC.	57
25	Mixedinfection ofrodestage of *Theileria spp.* (black arrow) and *Anaplasma spp.* (white arrow) in examined camel bloodsamples.	58
26	Giemsastainedbloodsmearshows mixedinfectionof *T. evansi* (white arrow) and intra lymphocytic microschizont of *Theileria spp.* (black arrow)(×1000).	58
27	Giemsa stained blood smear showing *Babesia spp.* inside camel erythrocyte(X1000)	59
28	Mixed infection of *Theileria spp.* (rode stage) white arrow and *Babesia spp.* black arrow in examined camel blood samples (x1000).	59
29	Dorsal view of adult male (a) and female (b) of *Amblyommatuberculatum*	60

Continuation ofFigure

No.	Title	Page
30	Dorsal view, Shows the long hypostome of *Amblyomma* tick hadlong palps with 3 segments ×40	61
31	Ventrally view, shows characteristic dentition of hypostome× 40	61
32	Ventralview,Showsoffestoonsatposteriorendof *Amblyomma* tick, anal aperture and the anal groove posterior to the anus × 40	62
33	Photomicrographofsquashpreparationofadultticks shows several parasites (ring stage) lying in close to the borderofgut epithelium(blackarrow)andkinete *Theileria spp.* (Whitearrow)	62
34,35and 36	Tachyzoites of *Toxoplasmagondii*in blood smears of camelblood(x1000)	64

7. Summary

This study was carried out on 360 imported camels that coming from Sudan and temporarily kept in Abu-simbuel Quarantine station of Aswan Governorate, southern Egypt in the period from November 2016 to October 2017.

The imported camels were clinically examined and sampled during different months of the year, different age, and with male in relation to sex for epidemiological studies using blood smear and PCR techniques for diagnosis of blood parasites.

According to the clinical abnormalities related to blood parasites infection of the examined camels noticed in the current study were, camels classified to 256 (71.11 %) were clinically suspected, while 104 (28.88 %) of camels were apparently healthy.

The clinical abnormalities noticed in clinically suspected cases (n= 256) were rising of body temperature up to (39.1 ± 0.5°C) that found in 63 camels (24.61%) case from clinically suspected cases .Testicular enlargement and prolapsed penis, we found that in 56 camels (21.87%) from the clinically suspected cases . Edema in different body parts also recorded in this study that found 32 camels (12.5%).All clinically suspected camels 256 (100%) were infested with hard ticks at different sites particularly genital system and neck. Diarrhea was noticed in low number 8 camels (12.5%) from clinically suspected cases. Presence of abscess in different body regions also noticed that may be due to immune insufficiency that caused by blood parasites infection . Poor general condition represented in pale mucus membrane (52.12%) and emaciation (34. 37 %). Other abnormalities that recorded in present study were; lacrimation (6.25%), rough coat (25%), lymphadenitis (15.62%) that related to blood parasites infection.

Four parasites were detected in the present study; *Theileria* was the most common pathogen 25%, *Trypanosoma evansi* 12.5%, and a lesser extent *Babesia sp.* 0.55 % and *Toxoplasma gondii*. 0.55 %, while *Dipetalonema evansi* can't detected in examined camels.

Out of 360 examined camels, using Giemsa blood stain, 24 (6.7%) were positive for *T. evansi* infection that classify as follow, 16.32 % in clinically suspected camels and the apparently healthy camels were *Trypanosoma* free. Whereas, the prevalence of *T. evansi* in the present study by ITBR 1/2 primer-based PCR was in 63.6 % of examined camels.

Regarding to seasonal influences on *T. evansi* prevalence in the present study, the obtained results indicated that the prevalence rate of infection was high in hot months, followed by warm months and the lower prevalence were recorded in extra hot months while the lowest rate of infection were in cold months.

Concerning the relationship between age of the examined camels and the prevalence of *T. evansi* infection in the current study it was found that age group (≥5- ≥7 years) is less susceptible than the age group (<7-≤10 years) for *Trypanosoma* infection.

In the current work the prevalence of *Theileria* infection using blood film technique was 25% (90/360 camels) classify as follow, (38.75%) in clinically suspected camels and (8.58%) in apparently healthy camels.

The relationship between seasonal variation and prevalence of *Theileria* , The highest prevalence in the current study was recorded in extra hot months, followed by warm months then hot months and the lower prevalence was recorded in cold months.

The relationship between age groups of the examined camels and the prevalence of *Theileria* infection in the current study, the obtained results revealed that age group (≥5≥7 years) is more susceptible than the age group (<7-≤10 years).

Wilson, A. J.; Schwartz, H. J.; Dolan, R. and Olaho -Mukani, W. (1983): A simple classification of different types of trypanosomiasis occurring in four camel herds in selected areas of Kenya. Tropenmed Parasitology, 34: 220-224.

Youssef, S.Y. (2012): Clinicopathological Studies on Camel Theileriosis. M.V.Sc. Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University.

Youssef, S.Y., Yasien, S.,, Mousa, W.M.A., & Nasr, S.M., El-Kelesh, E.A.M., Mahran, K.M and Abd-El-Rahman ,A. H. (2015): Vector identification and clinical, hematological, biochemical, and parasitological characteristics of camel (*Camelus dromedarius*) theileriosis in Egypt. Trop Anim Health prod 47:649-656

Zaitoun, A.M.A (2007): Contagious skin necrosis of dromedary camels in South Egypt. J.of Camel Pract Res, 14, 2, 125-132 .

Zarif-Fard, M. R. and Hashemi-Fesharaki, R. (2000): Study on tissue and blood protozoa of camels in southern Iran. J Camel Pract Res 7: 193–194.

Zayed, A. A.; Habeeb, S. M.; Allam, N. A. T.; Ashry, H. M. Z.; Mohamed, A. H. M.; Ashour, A. A. and Taha, H. A. (2010): A critical comparative study of parasitological and serological differential diagnostic methods of *Trypanosoma evansi* infections in some farm animals in Egypt. Am-Eurasian J Agr Environ Sci 8: 633–642.

Zeleke, M. and Bekele, T. (2001): Camel herd health and productivity in eastern Ethiopia: selected semi-nomadic households. Rev Elev Med Vet Pays Trop 55: 213– 217.

Zhang, Z. Q.; Giroud, C. and Baltz, T. (1993): *Trypanosoma evansi*. In vivo and in vitro determination of trypanocide resistance profile. Experimental Parasitology, 77: 387-394.

الملخص العربى

الملخص العربى

دراسة وبائية وجزيئية عن عدوى الطفيليات الدموية فى الإبل وحيدة السنام بمحافظة أسوان – مصر

أجريت هذه الدراسة على عدد 360 إبل مستوردة من السودان والموجودة مؤقتا فى محطة الحجر الصحى أبو سمبل بمحافظة أسوان ، جنوب مصر فى الفترة من نوفمبر2016 إلى أكتوبر 2017.

كانت الابل المستوردة مختلفة الاعمار وكلها ذكور من ناحية الجنس وقد تم فحصها سريريا واخذت منها عينات خلال مختلف شهور السنة وذلك لعمل الدراسةالوبائية باستخدام تقنية المسحة الدموية وتفاعل البلمرة المتسلسل لتشخيص طفيليات الدم.

وفقً اللأعراض السريرية المتعلقة بعدوى طفيليات الدم التي تمت ملاحظتها من الإبل والتي تم فحصها في الدراسة الحالية،كانت عدد 256 من إجمالى الإبل بنسبة (71.11٪) مشتبه بها سريريًا، في حين كان 104 بنسبة (28.88٪) من الإبل سليمة ظاهريا .

فيما يتعلق بالأعراض السريرية التي لوحظت في الحالات المشتبه بها سريريًا (ن = 256):
ارتفاع في درجة حرارة الجسم حتى (39.1 ± 0.5 درجة مئوية) والتي وجدت في 63 (24.61٪) من الحالات المشتبه بها سريريًا.تضخم الخصية والقضيب المتدلى:وجدت في 56 (21.87 ٪) من الحالات المشتبه سريريا.التورم في أجزاء مختلفة من الجسم سجلت أيضا في هذه الدراسة حيث وجدت فى 32 جملا (12.5 ٪).وجودالقراد الصلب في أجزاء مختلفة من الجسم: حيث جميع الإبل المشتبه بها سريريًا (100٪) كانت بها قراد صلب في مواقع مختلفة خاصة الجهاز التناسلي والعنق. وقد لوحظ الإسهال في عدد قليل من الابل (12.5 ٪) من الحالات المشتبه سريريا. لوحظ أيضًا وجود خراريج في مناطق مختلفة من الجسم وقد يكون ذلك بسبب القصورالمناعى الناجم عن عدوى طفيليات الدم. سوء الحالة العامة بنسبة (52.12) متمثلة في شحوب الغشاء المخاطي (52.12٪) والهزال (34.37). وكانت العلامات الاخري الغير طبيعية و التي سجلت في هذه الدراسة مثل :التدميع بنسبة (6.25 ٪)،الوبر الخشن (25 ٪) ،التهاب الأوعية اللمفية ب (15.62 ٪) والتي تتعلق بعدوى طفيليات الدم.

تم التعرف علي أربعة طفيليات فالإبل التى تم فحصها في هذه الدراسة؛كانت عدوي الثيليريا هو العامل الممرض الاكثر شيوعا بنسبة 25 ٪ ، المثقبيات إيفانسي بنسبة 12.5٪ وبدرجة أقل البابيزيا والتوكسوبلازما جوندي. 0.55 ٪. بينما الديبتولونيما ايفانسى لم نتمكن من اكتشافه في الإبل التى تم فحصها.

من اجمالي العدد الكلي للابل (360) التي تم فحصها باستخدام المسحة الدموية بصبغة الجيمسا، كانت24(6.7٪) من الابل إيجابية للإصابة بعدوى المثقبيات ايفانساى و التي تقسم على النحوالتالي: 16.32٪ من الإبل المشتبه بها سريريًا والإبل السليمة ظاهريا كانت خالية من المثقبيات، بينما كان معدل الاصابة بالمثقبيات ايفانساى في هذه الدراسة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل – بريمر TBR1.2 63.6 ٪ من الإبل التي تم فحصها.

فيما يتعلق بالعلاقة بين التباين الموسمي ومعدل الاصابة بالمثقبيات ايفانساى في هذه الدراسة،أشارت النتائج إلى أن معدل انتشارعدوى المثقبيات ايفانساى كان مرتفعًا في الأشهرالحارة يليه الأشهرالدافئة وتم تسجيل انخفاض معدل الانتشار في الأشهر شديدة الحرارة بينما سجلنا أدنى معدل في الأشهر الباردة.

فيما يتعلق بين عمرالإبل التي تم فحصها من الناحية الدموية والجزيئية وانتشارعدوى المثقبات ايفانساى، تبين أن الفئة العمرية (≥5-≥7 سنوات) أقل عرضة من الفئة العمرية (> 7 - ≥10 سنوات) لعدوى المثقبيات.
في الدراسة الحالية كان معدل الاصابة بالثيليريا باستخدام تقنية المسحة الدوية (38.75 ٪) فى الإبل المشتبه بها سريريا بينما كانت(8.58 ٪) فى الإبل التى تبدو سليمة ظاهريا.

فيما يتعلق بالعلاقة بين التباين الموسمي ومعدل الاصابة بالثيلريا،تم تسجيل معدل اصابة اعلى في الأشهر شديدة الحرارة يليه الأشهرالدافئة ثم الأشهر الحارة وسجل أقل انتشارفي الأشهرالباردة.

أظهرت العلاقة بين الفئات العمرية للإبل التى تم فحصها وانتشار عدوى الثيلريا فى الدراسة الحالية أن الفئة العمرية (≥5-≥7 سنوات) أكثرعرضة للاصابة من الفئة العمرية (> 7 - ≥10 سنوات).

تم التعرف علي البابيزيا في مسحات الدم بصبغة الجيمسا فى عدد 2 من المسحات (0.55 ٪) من أصل 360 من الإبل.
كشفت دراسة مسحات الدم المصبوغة تحت المجهرالضوئي في العمل الحالي وجود ميروزويت البيضاوي أوالكمثرى من البابيزيا في شكل فردى أوأزواج داخل كريات الدم الحمراء فى الإبل.

لوحظ وجود التوكسوبلازما في المسحة الدموية الخاصة بعدد 2 (0.55 ٪) من الإبل . كانت على شكل هلال مع نواة مميزة،وكان لها نهايتان مدببتان ولكن الأخرى غالبًا ما كانت لها نهاية مدببة وأخرى مدورة

جامعة اسيوط
كلية الطب البيطرى
قسم طب الحيوان

دراسة وبائية وجزيئية عن عدوى الطفيليات الدموية فى الإبل وحيدة السنام بمحافظة أسوان – مصر

رسالة مقدمة من :

محمد سامى عبد الحميد أحمد
(بكالوريوس العلوم الطبية البيطرية - جامعة أسيوط 2012)

للحصول على درجة الماجستير فى العلوم الطبية البيطرية
(الأمراض المعدية)

تحت إشراف /

أ.د / أحمد محمود عطية زيتون
أستاذ الأمراض المعدية
قسم طب الحيوان
كلية الطب البيطرى
جامعة أسيوط

أ.د / أحمد عبد الراضى محمود
أستاذ الأمراض المعدية
قسم طب الحيوان
كلية الطب البيطرى
جامعة أسيوط

أ.د / محسن إبراهيم عرفة
كبير اخصائي الطفيليات
رئيس بحوث بمعهد بحوث الصحة الحيوانية

كلية الطب البيطرى – قسم طب الحيوان
جامعة أسيوط
(2020)