



جامعة الموصل  
كلية الطب البيطري

# دراسة مرضية وتشخيصية جزيئية للإصابة الطبيعية والتجريبية بجرثومة بروفيدنسيا في أسماك الكارب الشائع

امير حميد نواف عليوي الحمدي

رسالة ماجستير

الطب البيطري / أمراض بيطرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

بلسم يحيى رشيد

الأستاذ المساعد الدكتورة

شهباء خليل إبراهيم

## الخلاصة

الانتان النزفي من الامراض الجرثومية الشائعة في قطاع تربية الاحياء المائية والذي تسببه جراثيم عديدة، وبما انه لا توجد مراجع بحثية عن جرثومة الـ *Providencia* كونها إحدى مسببات لهذا المرض، لذا كان الهدف الاول من هذه الدراسة هو عزل وتشخيص جرثومة البروفيدنسيا من اسماك الكارب الاعتيادي، اذ تم جمع (30) مسحة قطنية من كبد و كلية الاسماك المستزرعة في منطقة الخازر التي ظهر عليها الخمول والنزف والتقرح في مناطق الجسم المختلفة وكانت نسبة العزل لهذه الجرثومة 50%. وتبين من التشخيص المختبري المتضمن الزرع الجرثومي والفحص المجهرى والاختبارات الكيموحيوية باستخدام نظام الفايترك Vitek 2 system والتشخيص الجزيئي وتحليل بيانات الشجرة الوراثية باستعمال برنامج MEGA 11 وباختيار طريقة Maximum Likelihood method لعزلات البروفيدنسيا و المشخصة بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وبالاعتماد على المورثة 16S rRNA وبحجم 515 زوج قاعدي عائلية العزلات من الاصابات الطبيعية والتجريبية لجرثومة *P. alcalifaciens*، وبينت النتائج ان التطابق بين العزلات المحلية والمسجلة عالميا في المركز العالمي لمعلومات التقنيات الاحيائية NCBI كان بنسبة 99-100%، وكانت ارقامها الامتدادية PV101576 و PV101577 و PV101578 و PV101579

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية وكانت العزلات حساسة بنسبة 100% لكل من المضاد الحيوي Ceftriaxone و Ciprofloxacin واعتبرت اعلى نسبة مقاومة لكل من المضاد الحيوي Erythromycin و Chloramphenicol و Trimethoprim/ Sulphamethoxazole، كما بلغت نسبة المقاومة الجرثومية 75% لمضادات Pipracillin و Ofloxacin.

اما الهدف الثاني من هذه الدراسة فقد كان تحديد امراضية الجرثومة اذ تم الاعتماد على الدراسة الاولى بمعاملة الاسماك بالعالق الجرثومي وبالتراكيز (1.5 و 3 و 9 و 15)  $\times 10^8$  وحدة تكوين المستعمرة وبالطرائق الحقن بالخلب والتجريع الفموي والحمام المائي وكانت نسبة نفوق الاسماك 21% في المجموعة المحقونة بالعالق الجرثومي  $15 \times 10^8$  خلال 96 ساعة واختلفت شدة التغييرات السلوكية اعتمادا على تركيز العالق الجرثومي وطريقة التعرض ولم يكن للتركيزين (1.5 و 3)  $\times 10^8$  وحدة تكوين المستعمرة اي تأثير على الاسماك وبالطرائق الثلاث.

وقد تم الاعتماد على التركيزين (6 و 12)  $\times 10^8$  وحدة تكوين المستعمرة في الدراسة التجريبية اذ ظهر على الاسماك الخمول والنزف النقطي وتلون منطقة السرج باللون الاسود مع تثخن الصفاق وحدوث الالتصاقات مع الاحشاء الداخلية، وقد ادى هذان التركيزان في مجموعة التجريع الفموي وبعد 7 ايام من بدء التجربة الى ارتفاع معنوي ( $P \leq 0.05$ ) في انزيمي ALT و AST 5.08 و 193.50 وحدة دولية /لتر على التوالي، وظهرت نتائج التحليل الاحصائي الانخفاض المعنوي في معدل تركيز الكرياتينين في مصل دم اسماك كل المعاملات ولكنه كان اكثر انخفاضا في مجموعة التجريع الفموي والحمام المائي وبالتركيزين (6 و 12)  $\times 10^8$  على التوالي، فضلا عن فقدان التوازن في الالكترولولايت في كل المجاميع.

لم يكن هنالك فروق معنوية في معدل تركيز الكلوبولين المناعي IgM في مصل دم الاسماك ضمن المجموعة الواحدة ماعدا ارتفاعه معنويا في مجموعة الاسماك المعاملة بالعالق الجرثومي بالحمام المائي وتركيز  $12 \times 10^8$  مقارنة مع التركيز  $6 \times 10^8$  وحدة تكوين المستعمرة اذ بلغا (815.5 و 713.56) وبصورة عامة فقد كان معدل الكلوبولين المناعي IgM مرتفع معنويا في مصل دم اسماك كل المجاميع مقارنة مع مجموعة السيطرة (625) مايكروكرام/ملي مول.

اظهر الفحص المجهرى بان جرثومة *P. alcalifaciens* ادت الى حدوث تغييرات مرضية نسجية في كل من الغلاصم والكبد والكلية الجذعية والاعضاء المناعية (الكلية الراسية والطحال) تم تصنيف هذه التغييرات الى نوعين الاول منها التغييرات المرضية الرجعية كالتغييرات الوعائية وارتشاح الخلايا الالتهابية والاذى الخلوي وتكثيف الخلية والثاني منها فهي التغييرات المرضية التقدمية والتي تشمل التغيير في الهيكلية النسجية الشكلية كفقدان استقامة والتصاق الخيوط الغلصمية الثانوية وتكون النسيج الدهني في النسيج الكبد-البكرياسي والجيب الكلوي فضلا عن موت ونخر النسيج.

من خلال العزل والتشخيص المجهرى ودراسة الصفات الكيموحيوية والتحليل الوراثي (لعزلات الاصابة الطبيعية والتجريبية) تبين ان جرثومة *P. alcalifaciens* تصيب اسماك الكارب وتسبب مرض الانتان النزفي، واستنتج من الدراسة التجريبية بان شدة المرض تعتمد على تركيز وطريقة تعرض الاسماك للعالق الجرثومي وكان التركيز الاعلى وطريقة الحقن بالخلب أكثر تأثيرا في الاسماك.

**University of Mosul**  
**College of Veterinary Medicine**



# **A Pathological and Molecular Diagnostic Study of Natural and Experimental Infection with Providencia Bacteria in Common Carp**

**Ameer Hameed Nawaf Aliwi Al-Mohammadi**

**MSc/Thesis**

**Veterinary Medicine / Veterinary Disease**

**Supervised by**

**Assist. Prof. Dr.**

**Shahbaa Khalil Ibrahim**

**Prof. Dr.**

**Balsam Yahya Rashid**

## Abstract

Hemorrhagic sepsis is a common bacterial disease in the aquaculture sector caused by several bacteria. However, there are no research references on the *Providencia* bacteria as one of the causes of this disease. Therefore, the primary objective of this study was to isolate and identify the *Providencia* bacteria from common carp. 30 cotton swabs were collected from the liver and kidney of fish farmed in the Khazir area, which showed lethargy, bleeding and ulceration in different areas of the body. The isolation rate of this bacteria was 50%. Laboratory diagnosis, including bacterial culture, microscopic examination, biochemical tests using Vitek 2 system, molecular diagnosis, and genetic tree data analysis using MEGA 11 program, and by choosing the Maximum Likelihood method for the *Providencia* isolates, and diagnosed by polymerase chain reaction technology and based on the 16S rRNA gene with a size of 515 base pairs, showed that the isolates belong to natural and experimental infections of *P. alcalifaciens*. It was found that the identity between the local isolates and the globally registered ones in the National Center for Biotechnology Information was 99-100%, with accession numbers PV101576, PV101577, PV101578, PV101579.

Antibiotic susceptibility testing was performed and the isolates were 100% sensitive to antibiotic Ceftriaxone and Ciprofloxacin, with the highest resistance to antibiotic Erythromycin, Chloramphenicol, and Trimethoprim/Sulphamethoxazole. 75% of the isolates were resistant to Piperacillin and Ofloxacin.

The second objective of this study was to determine the pathogenicity of the bacteria, as the initial study was based on treating fish with bacterial suspension at concentrations of  $(1.5, 3, 9 \text{ and } 15) \times 10^8$  colony forming

---

units, using chelation injection, oral dosing and water bath methods. The fish mortality rate was 21% in the group injected with bacterial suspension  $15 \times 10^8$  CFU within 96 hours. The severity of behavioral changes varied depending on the concentration of the bacterial suspension and the method of exposure. The concentrations of  $(1.5 \text{ and } 3) \times 10^8$  CFU had no effect on the fish using the three methods.

The experimental study used bacterial suspension at concentrations of  $(6 \text{ and } 12) \times 10^8$  CFU. The fish showed lethargy, petechial hemorrhage, black discoloration of the saddle area, thickening of the peritoneum, and adhesions with the internal organs. These two concentrations led to a significant increase ( $P \leq 0.05$ ) in the ALT and AST enzymes in the oral dosing group, 7 days after the start of the experiment, to (5.08 and 193.50) IU/L, respectively. The results of the statistical analysis showed a significant decrease in the average creatinine concentration in the blood serum of fish in all treatments, but it was lower in the oral dosing and water bath groups, at concentrations  $(12 \text{ and } 6) \times 10^8$  CFU, respectively. This was in addition to a loss of electrolyte balance in all groups.

There were no significant differences in the concentration rate of immunoglobulin IgM in the blood serum of fish within one group, except for its significant increase in the group of fish treated with bacterial suspension in the water bath at a concentration of  $12 \times 10^8$  CFU compared to the concentration of  $6 \times 10^8$  CFU, as they reached (815 and 713.56). In general, the rate of immunoglobulin IgM was significantly high in the blood serum of fish of all groups compared to the control group (625) mg/mmol

Microscopic examination showed that *P. alcalifaciens* caused histopathological changes in the gills, liver, kidney, and immune organs

(head kidney and spleen), these alterations were classified into two types: the first is regressive pathological alterations such as vascular changes, inflammatory cell infiltration, cellular damage, and cell adaptation. The second is progressive pathological alterations, which include changes in the morphological histopathological structure such as loss of straightness and adhesion of secondary gill filaments, steatosis in the hepato-pancreatic tissue, and renal sinus, in addition to necrosis and tissue death

Through isolation, microscopic diagnosis, biochemical characterization study and genetic analysis (of natural and experimental isolates), it was shown that *P. alcalifaciens* infects carp and causes hemorrhagic sepsis. The experimental study concluded that the severity of the disease depends on the concentration and method of exposure of fish to the bacterial suspension, and the higher concentration and method of injection by chelation were more effective in fish.