------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد7، خاص بعلوم الحياة، ص 159-170، 2005-----

دراسة قابلية إنتاج الذيفان الخارجي من قبل انواع جرثومة *Aeromonas* المعزولة من حالات إسهال الاطفال في مدينة الموصل

صبحي حسين خلف
كلية التمريض
جامعة الموصل

ساهي جواد ضاحي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

ذكرى سليم علي
فرع الاحياء المجهرية
كلية الطب البيطري
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2004/5/20 ، تاريخ القبول 2004/11/7)

الملخص

فحصت عينات خروج مأخوذ من (850) طفلاً دون سن السادسة من العمر من مستشفى ابن الاثير للاطفال ومستشفى السلام العام في مدينة الموصل، لاجل التحري عن جراثيم *Aeromonas* وذلك باستخدام الصفات الشكلية والزرعية والكيمياحياتية.

تم الحصول على ثلاثة انواع من جراثيم *Aeromonas* استحصلت من (21) طفلاً أي بنسبة (2.47%) وعلى النحو الآتي: *A. sobria* (71.42%)، *A. hydrophila* (19.05%) و *A. caviae* (9.52%).

ان انواع *Aeromonas* تمتلك عوامل ضراوة مختلفة منها انتاج الذيفان فقد اظهر النوعان *A. sobria* و *A. hydrophila* قابلية لانتاج الذيفان وكان النوع *A. hydrophila* اشد امراضية من النوع *A. sobria* ومن خلال اختبار الذيفان في الفئران الرضع ، كما لوحظ عدم امكانية النوع *A. caviae* المعزول في الدراسة الحالية على انتاج الذيفان.

Study of Exotoxin Production Ability of *Aeromonas* species Isolated from Children Diarrhea in Mosul

Subhi H. Khalaf
College of Nursing
Mosul University

Sahi J. Dhahi
Department of Biology
College of Science
Mosul University

Thikra S. Ali
Department of Microbiology
College of Veterinary Medicine/
Mosul University

ABSTRACT

Diarrhoeal stool samples of (850) infants and children under six years of age were examined. Those children were hosted in Ibn-Al-Athir's Hospital and Al-Salam Hospital

in the city of Mosul in order to investigate the existence of *Aeromonas* by using microscopic, cultural and biochemical characteristics.

Three species of *Aeromonas* were detected in (21) children, that's (2.47%), arranged as follows: *Aeromonas sobria* (71.42%), *Aeromonas hydrophila* (19.05%), *Aeromonas caviae* (9.52%).

Aeromonas species possess various virulence factors such as toxin production for it has been found by suckling infants mouse assay that the *A. sobria* and *A. hydrophila* have a marked ability to produce toxins and that *A. hydrophila* is much more pathogenic (0.083-0.10) than *A. sobria* (0.083-0.096). *A. caviae* was incapable of toxin producing (0.075-0.077).

المقدمة

وصف (Ljungh et al., 1982) وجود ذيفان معوي خارج خلـوي مـوتر للخلايـا Cytotonic enterotoxin غير ثابت بالحرارة عند درجة (60) °م ولمدة (20) دقيقة ، ووزن جزيئـي يبلـغ قرابـة (15.000) كيلو دالتون، والذيفان المعوي الموصوف يتسبب بتجمع السوائل في اختبـار حلقـة الامعـاء المربوطة في الارانب، وعندما تم عزله عن الذيفانات الخلوية لم ينتج تلف نسيجي بعد (6) ساعات مـن التعرض للذيفان المعوي في الخلايا الظهاريـة المعويـة ، ويـشبه نـشاطه الحيـوي ذيفـان الكـوليرا Cholera Toxin (CT) والذيفان غير الثابت بالحرارة Heat-Labile Toxin (LT) الذي تنتجه اشـيريكيا القولون *E. coli*، الا ان اختبارات التعادل Neutralization اخفقت بايجاد علاقة مناعيـة بـين الـذيفان المعوي الناتج عن الـ *Aeromonas* وذيفانات CT و LT، فضلاً عن ذلك فان الذيفان المعوي المنتج من قبل *A. sobria* لوحظ انه ليس له متلقي نسيجي مثـل (GM1) (Gosling et al., 1992; Chopra and Houston, 1999). وتأكدت هذه النتائج باستخدام تقنيات حديثة مثل (PCR) مما طرح دليلاً حاسماً علـى انتاج ذيفان معوي موتر للخلايا متميز عن β-hemolysin cytotoxin واعطى هذا الذيفان نتيجة موجبـة في اختبار الفئران الرضع التي كانت منظومة اكتشاف معتمدة للذيفانات المعوية لجنس الـ *Aeromonas* (Kingomb et al., 1999).

وأشارت العديد من الدراسات إلى وجود ذيفان معوي اخر يتفاعل تداخلياً مع الامـصال المـضادة الناشئة ضد ذيفان الكوليرا (CT)، كما أشارت التقارير إلى وجود تفاعل مناعي متبادل بين ذيفان الكوليرا والذيفان المستخلص من انواع جرثومة *Aeromonas*، ولم تتم تنقية هذا الذيفان المعوي الخـاص بالـ *Aeromonas* قبل عام (1987)، إذ تمت تنقيته من قبل (Potomski *et al*., 1987) بتنمية الجرثومة فـي مرق مستخلص خميرة Casamino acid في درجة حرارة (37) °م مع الرج، ومن ثم تنقيتـه بوسـاطة كروماتوكرافيا الالفة وباستخدام الامصال المضادة لذيفان الكوليرا بالاكاروز، وكان هذا التحضير للـذيفان المعوي متحرراً من النشاط التحللي Haemolytic أو الذيفان الخلوي Cytotoxic ، وتتماثـل ميكانيكيـة

عمل هذا الذيفان المستخلص من جراثيم الـ *Aeromonas* مع ذيفان الكوليرا برفع مستويات الادينوسـين احادي الفوسفات الحلقي Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) (Koneman et al., 1997).

المواد وطرائق العمل

العينات:

اجريت دراسة جرثومية على (850) عينة براز مأخوذة من الاطفال المصابين بالاسهال، الذين هم دون سن السادسة من العمر ومن كلا الجنسين من مستشفى ابن الاثير للاطفال ومستشفى السلام في مدينة الموصل، وتم اخذ العينات من المستقيم بوساطة مسحات محفوظة داخل انابيب اختبار حاوية على المـرق المغذي المعقم، أخذت العينات إلى المختبر مباشرة إذ تم اختبارها خلال مدة زمنية اقل من ساعة.

التشخيص:

لغرض عزل وتشخيص جرثومة *Aeromonas* وتحديد انواعها تم استخدام:

الصفات الشكلية:

استخدمت صبغة كرام وصبغة الاسواط.

الصفات الزرعية:

تم استخدام الاوساط الزرعية الآتية:

وسط ماء البيتون القاعدي

وسط الاكار المغذي

وسط اكار الماكونكي

وسط اكار الدم المحور باضافة 10 مايكروغرام/ سم3 أمبسلين (Koneman et al., 1997)

وسط الكوليرا

وسط رملر - شوتس (Shotts and Rimler, 1973)

وسط اكار برل زايلوز أمبسلين (Rogol et al., 1979)

اختبارات التحري (Macfaddin, 1985):

اختبار الاوكسديز

اختبار تخمر الكربوهيدرات

اختبار IMVIC

اختبار تحلل الاسكولين (Baron and Finegold, 1990)

اختبار الظاهرة الانتحارية (Namdari and Cabelli, 1989)

استخلاص الذيفان الخارجي:

زرعت الجراثيم في (5) سم^3 من وسط مرق التربتون سويا Tryptone soya broth المجهز من شركة Oxoid والحاوي على (0.6%) (وزن إلى حجم) من مستخلص الخميرة Yeast extract في دورق زجاجي سعة (25) سم^3، حضنت سلالات الـ *Aeromonas* بأنواعها الثلاثة في درجة (37) °م لمدة (24) ساعة في حاضنة هزازة بسرعة (100) دورة في الدقيقة، تم اجراء طرد مركزي للمزارع باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد عند سرعة (10000) دورة في الدقيقة لمدة نصف ساعة وبدرجة (4) °م. ثم رشح السائل الراشح خلال ورق الترشيح حجم (0.45 µm Millipore Crop, Bedford, Mass)، وحفظ بدرجة (4) °م إذ اختبر بعد يوم واحد من التحضير (Burke et al., 1982).

اختبار الفئران الرضع:

تم تجريع الفئران الرضع البيضاء نوع Swiss mice بالسائل الراشح المحضر بحجم (100) مايكروليتر والمتضمن قطرة واحدة (0.01) سم^3 من صبغة ايفانز الزرقاء Evan's blue بتركيز (1.25%) عن طريق الفم وباستخدام انبوب اللي المطاطي Polyethylene Stomach Tube ، قطره الخارجي (0.6) مليمتر مرتبط بمحقنة سعة (1) سم^3، استخدم (78) فأراً تجريبياً وبواقع (15) فأراً تم اختيارهم كمجموعة ضابطة و (12) فأراً مثلت المجموعة التجريبية الاولى المعاملة بالسائل الراشح للنوع *Aeromonas hydrophila* والمؤلف من (4) عزلات و (45) فأراً للنوع *Aeromonas sobria* والمؤلف من (15) عزلة و(6) فئران للنوع *Aeromonas caviae* والمؤلف من عزلتين ، وبهدف ضبط المتغيرات التجريبية في اختيار عينات البحث فقد أجري تكافؤ بمتغير الوزن، إذ تراوحت اوزان الفئران المعتمدة في البحث بين (2.4-2.7) غرام، كما تم ضبط متغير العمر والذي تراوح بين (4-6) أيام ومتغير درجة حرارة التحضين للمجموعات كافة عند درجة حرارة (28) °م ولمدة (6) ساعات. وبهدف التأكد من ان التأثيرات الناتجة تعود للمتغير المستقل حصراً (السائل الراشح للانواع الثلاثة *A. hydrophila* و *A. sobria* و*A. caviae*) ولاتعود إلى صبغة ايفانز الزرقاء فقد أجريت دراسة تجريبية اولية حقن خلالها (3) فئران بهذه الصبغة وحضنت بعدها بالظروف التجريبية المحددة ثم قتلت الحيوانات بطريقة نزع الرقبة Cervical dislocation، ودرست الصفات التشريحية والنسجية، إذ تبين عدم وجود أي تاثيرات جانبية للصبغة. بعد ضبط المتغيرات الدخيلة المتوقعة ادخلت المجاميع الاربعة حيز التجربة الاساسية إذ جرعت الحيوانات في المجاميع التجريبية الثلاثة وبعد انتهاء فترة التحضين قتلت الحيوانات بطريقة نزع الرقبة وازيلت القناة المعوية الدقيقة والغليظة ثم قيس وزن الامعاء ووزن الجسم المتبقي وتم حساب نسبة وزن الامعاء إلى وزن الجسم المتبقي واعتماداً على:

(Gut / Remaining body weight ratio ≤ 0.083)

وللكشف عن حالة حدوث الاسهال تم وضع ورقة ترشيح تحت الحيوانات المحقونة، إذ ان الاسهال يلاحظ بلون ازرق نتيجة وجود الصبغة مع الراشح المحقون (Burke et al., 1981). فتحت الامعاء طولياً

واخذت منها نماذج ثبتت في محلول الفورمالين المنظم المتعادل (10%) لتحضير الشرائح النسجية لملاحظة التغيرات المرضية النسجية المحدثة من قبل الذيفان الخارجي مع العينات الضابطة.

العينات النسجية:

شملت الدراسة النسجية المحاور الرئيسة الاتية:

1. المثبت: تم تثبيت النماذج في محلول الفورمالين المنظم المتعادل بتركيز 10% (Luna, 1968).
2. تحضير الشرائح النسجية (Luna, 1968).

غسلت النماذج المثبتة في محلول الفورمالين 10% بالماء الجاري لمدة ساعة واحدة ثم مررت بتراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي ابتداءاً من 70% إلى 100% لغرض الانكاز، ولغرض الترويق وضعت العينات خلال مرحلتين من الزايلين مدة كل منها ساعة واحدة ثم مررت في شمع البرافين النقي بدرجة انصهار (58-60) م°، كررت هذه العملية ثلاث مرات مدة كل منها ساعة ووضعت في فرن كهربائي بدرجة 60 م° ثم طمرت بنفس نوعية الشمع المستعمل في التشريب، إذ وضع الشمع في قوالب حديدية خاصة وشذبت قوالب الشمع تشذيباً دقيقاً ووضعت بجهاز مشراح دوار للحصول على شرائط نسجية بسمك (5-6) مايكرومتر، حملت الاشرطة على شرائح زجاجية وسطحت بوضعها على صفيحة ساخنة بدرجة 45م° وتركت لتجف.

3. الفحص المجهري للعينات: لغرض الفحص النسجي استعملت صبغة ديلافيلد هيماتوكسلين–ايوسين وصبغة كمزا (Gurr, 1962).

الفحص العياني والنسجي للعينات:

تم اجراء الفحص العياني للنماذج المستخدمة في الدراسة (امعاء الفئران القياسية والمعاملة) باستخدام مجهر التشريح Dissecting Microscope، أما المقاطع النسجية فقد فحصت بالمجهر الضوئي. ولدراسة تأثير الذيفان الخارجي على النماذج المعاملة أجريت قياسات دقيقة لاطوال الزغابات والجريبات للامعاء الدقيقة (الجزء العلوي من الامعاء الدقيقة) للنماذج المعاملة والقياسية، وبناءاً على ذلك حددت نسبة الزغابات إلى الجريبات Villus to Crypt ratios (Thomson et al., 1976)، وقيس ارتفاع (10) زغابات وجريبات متجاورة إذ تم قياس اطوال النماذج باستعمال المقياس الدقيق للعدسة العينية Ocular Micrometer بقوة تكبير (7) بعد معايرته Calibration بالمقياس الدقيق للقاعدة Stage Micrometer ولقوى التكبير المختلفة (Thienpont et al., 1986)، وباستخدام عدسة شيئية بقوة تكبير (20) باستخراج معدلاتها وتطبيق المعادلة (المعدل ×8.0) مقاساً بالمايكرون. وتم اجراء اختبار تحليل التباين باتجاه واحد One-way Analysis of Variance (Steel and Torrie, 1984) لمقارنة الفروق بين المجاميع في اطوال الزغابات وللتعرف على دلالة الفروق بين مجاميع التفاعل استخدم اختبار دنكن Duncan's test وعند مستوى معنوية (0.05).

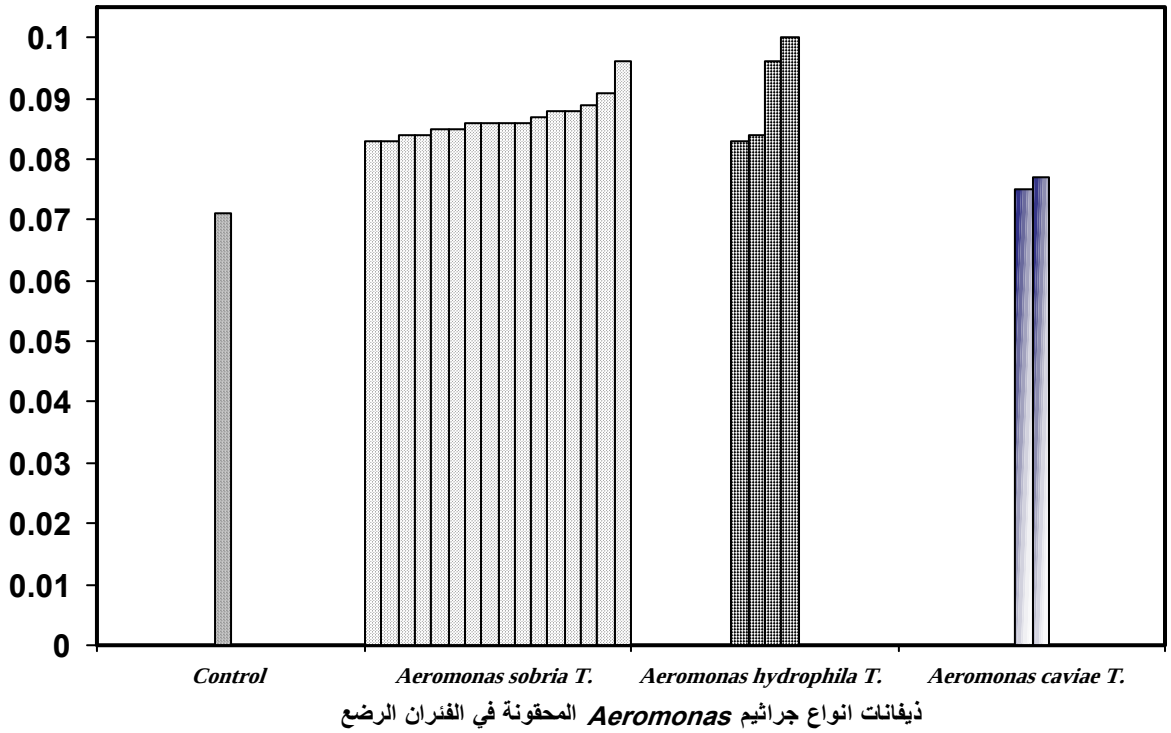
النتائج

عزل جرثومة *Aeromonas* من حالات الاسهال:

ثبت في هذه الدراسة (21) عزلة *Aeromonas* مأخوذة من خـروج (850) طفـلاً أي بنـسبة (2.47%)، وصنفت من هذه العزلات ثلاثة انواع عائدة لهذا الجنس وهي *A. sobria* وبنسبة (71.42%) و*A. hydrophila* وبنسبة (19.05%) و *A. caviae* وبنسبة (9.52%).

اختبار الذيفان الخارجي وحقن الفئران الرضع:

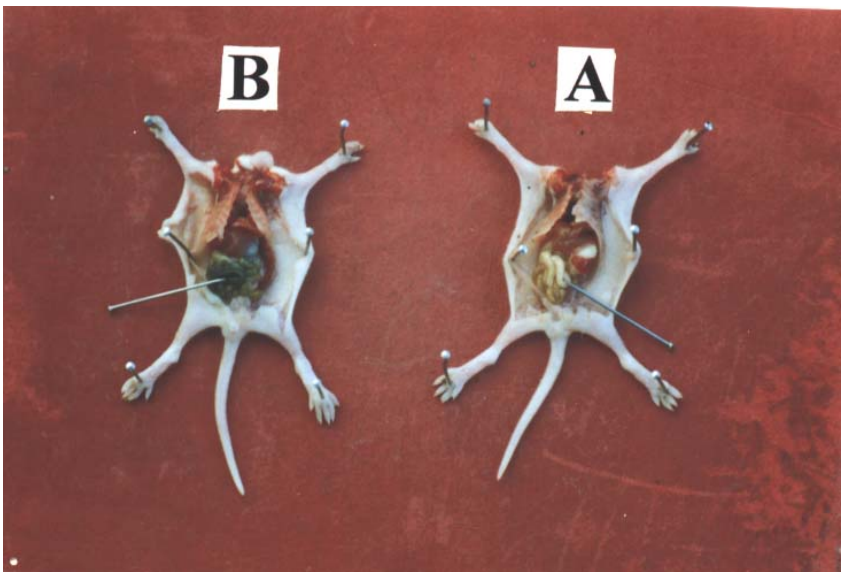
أوضحت تجارب استخلاص الذيفان الخارجي وحقنه في الفئران الرضع نتـائج متباينـة لـسلالات الانواع الثلاثة العائدة لجنس *Aeromonas* والمعزولة في الدراسة الحالية، فقد تبين مـن الـشكل (1) ان نسبة وزن الامعاء إلى وزن الجسم المتبقي للنوع *A. sobria* كانت تساوي أو اكبر من النـسبة (0.083) وهذا يبرهن ان جميع سلالات *A. sobria* المعزولة في الدراسة منتجة للـذيفان الخـارجي وان النـسبة تراوحت بين (0.083) إلى (0.096)، أما النوع *A. hydrophila* فكانت نسبة وزن الامعـاء إلـى وزن الجسم المتبقي مساوية أو اكبر من (0.083) أيضا وهذا يعني ان السلالات منتجـة للـذيفان الخـارجي وتراوحت النسبة بين (0.083) الى (0.1) ، في حين اظهر النوع *A. caviae* ومن خلال قياس نسبة وزن الامعاء إلى وزن الجسم المتبقي نسبة اقل من النسبة (0.083) وهذا دليل على عدم قابلية هذه الـسلالات على انتاج الذيفان الخارجي إذ تراوحت النسبة بين (0.075) إلى (0.077).



ذيفانات انواع جراثيم ***Aeromonas*** المحقونة في الفئران الرضع

الشكل 1: معدل تجمع السوائل نتيجة حقن الفئران الرضع بذيفانات الانواع الثلاثة لجـنس *Aeromonas* مع عينة السيطرة بالاعتماد على IW: BW≤ 0.083.

وتبين الصورة (1) حالة تضخم الامعاء في الفئران المعاملة مقارنة بعينة السيطرة نتيجـة تجمـع السوائل داخلها لحقنها بالذيفان المنتج من قبل الانواع المدروسة والمنتجة للذيفان بعد مرور (6) ساعات.

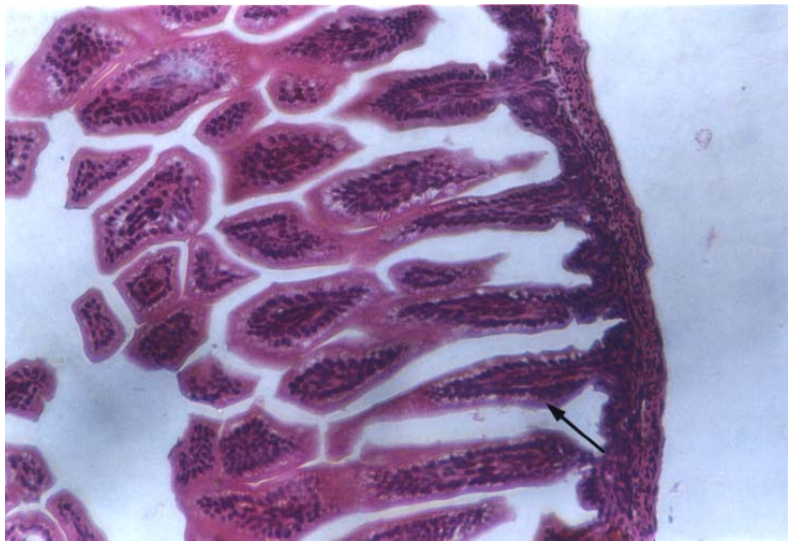


الصورة 1: تضخم الامعاء نتيجة تجمع السوائل داخلها في الفئران المحقونة بالذيفان مقارنة بعينة السيطرة في انواع *Aeromonas* المنتجة للذيفان. A- فئران غير محقونة (سيطرة)، B- فئران محقونة.

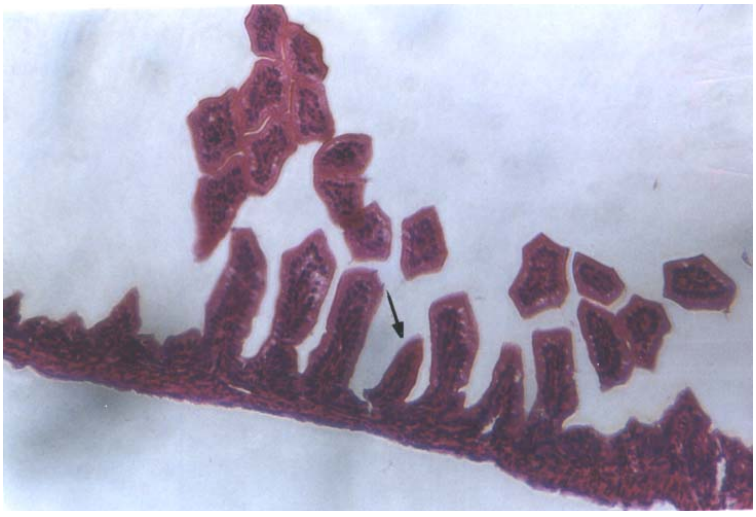
التغيرات المرضية العيانية والنسجية الناتجة من حقن الذيفان الخارجي:

لوحظ بعد انتهاء مدة التحضين، عند الحقن بالذيفان الخارجي ان الفئران كانت تعـاني مـن حالـة الخمول والانكاز، وبعد القتل تم اجراء الصفة التشريحية إذ لوحظ انتفاخ الامعاء وتمددها ابتداءً من الاثني عشر Duodenum وهو الجزء القريب من المعدة وحتى المستقيم Rectum نتيجة تجمع السوائل داخلهـا. وعند قياس اطوال الزغابات والجريبات في النماذج المـأخوذة مـن الامعـاء الدقيقـة Small intestine ومقارنتها بعينات السيطرة (الصورة 2) لوحظ تقصر في اطوالها (الصورة 3).

أظهرت نتائج تحليل التباين باتجاه واحد وجود فروق معنوية في متغير معـدل اطـوال الزغابـات والجريبات للمجموعات المستخدمة. وأفادت نتائج اختبار دنكن إلى وجود فرق معنوي بـين المعـاملات المستخدمة وعند مستوى معنوية (0.05)، إذ اظهرت المقارنات المتعددة بين متوسطات المعاملات افضلية المجموعة الاولى والمتمثلة بالمجموعة الضابطة على المجموعة الثانية والثالثة، وأفضلية المجموعة الثانية على الثالثة وكما هو موضح في الجدول (1).



الصورة 2: مقطع من أمعاء الفئران عند مجموعة السيطرة فـي منطقـة الزغابـات مـصبوغ بـصبغة هيماتوكسلين-ايوسين (250X).



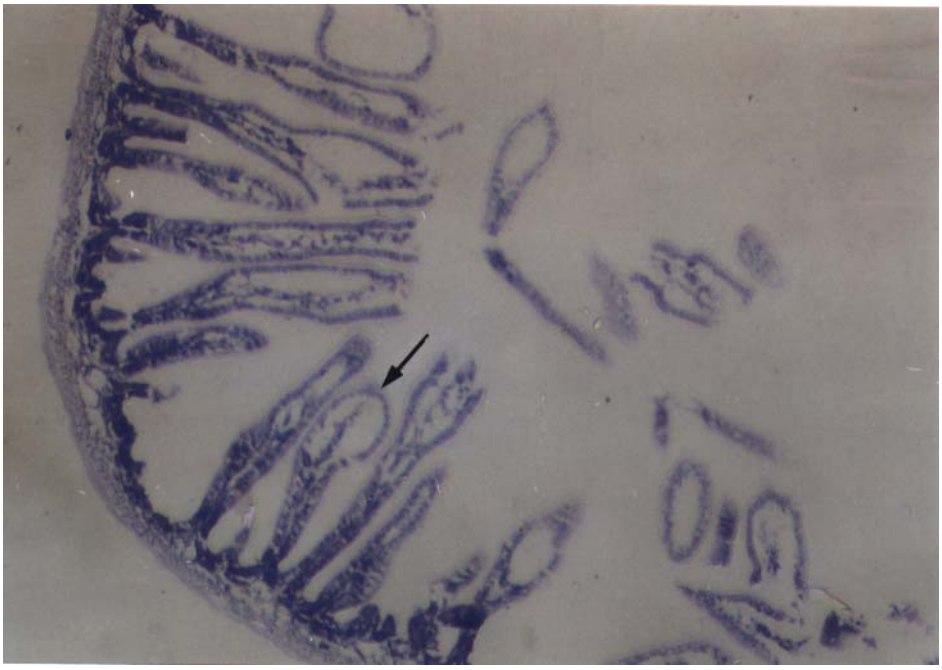
الصورة 3 : مقطع من امعاء الفئران المحقونة بالذيفان الخارجي عند المجموعة التجريبية يظهر التقـصر والتقزم والتوسف في الزغابات المعوية مصبوغ بصبغة هيماتوكسلين-ايوسين (250X).

الجدول 1: نتائج اختبار دنكن Duncan's test.

المعاملات	العدد	المعدل*
مجموعة السيطرة	15	3.67a
Aeromonas sobria	45	2.71b
Aeromonas hydrophila	12	1.39c

* الاحرف المختلفة تدل على وجود فرق معنوي بين المتوسطات حسب اختبار دنكن عند مستوى معنوية (0.05) .

أما التغيرات المرضية النسجية فتمثلت بوجود نخر Necrosis في بعض الاجزاء في الطبقة المخاطية والبعض الاخر يعاني من توسع وانتفاخ Broad and Blant في الزغابات المعوية، ولوحظ ارتشاح لخلايا التهابية وحيدة النواة، الصورة (4).



الصورة 4 : مقطع من امعاء الفئران المحقونة بالذيفان الخارجي عند المجموعة التجريبية يظهر حالة التوسع والانتفاخ والتوسف في الزغابات المعوية مصبوغ بصبغة كمزا (250X).

المناقشة

تشير العديد من الدراسات إلى ان انواع جنس الـ *Aeromonas* لها القابلية علـى انتـاج نـوعين مختلفين من الذيفانات المعوية احدهما يتداخل مع الامصال المضادة لذيفان الكوليرا والاخر لايتفاعل معها، وعلى أية حال فان اختبار الاليـزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) المـرتبط بالانزيم طبق بنجاح لتوضيح عامل التفاعل التداخلي مع (CT) في عزلات مأخوذة من اطفـال مـصابين بالاسهال بسبب جراثيم الـ *Aeromonas* (Chopra et al., 1986).

لوحظ ان سلالات النوع *A. hydrophila* و*A. sobria* منتجة للذيفان الخارجي إذ كانت نسبة وزن الامعاء إلى وزن الجسم المتبقي اكثر من (0.083)، وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسات عديـدة منهـا دراستي (Burke et al., 1982; Vadivelu et al., 1991) اللتين أشارتا إلى دور الذيفان الخارجي كعامل ضراوة والمنتج من قبل سلالات *Aeromonas* المنتجة للذيفان في احداث الاسهال الحـاد، وان الـذيفان الخارجي المنتج من قبل سلالات *A. hydrophila* يشابه في تأثيره الذيفان المنـتج مـن قبـل جرثومـة الضمات إذ يسبب تجمع السوائل في امعاء الفئران الرضع. كما أشـارت دراسـة (Burke et al., 1983) إلى ان جميع سلالات *Aeromonas* المنتجة للذيفان المعوي وخاصة *A. sobria* والتي تم اختبار انتاجهـا للذيفان كانت مسببة للاسهال الحاد لدى الاطفال، والتي تم عزلها من عينات الخروج للاطفال المـصابين. وقد يعزى ذلك إلى ميكانيكية عمل الذيفان الخارجي والتي تتضمن ارتبـاط الـذيفان مـع عقـد محـددة Gangliosides على الخلايا الطلائية بحيث ينشط انزيم Adenylate cyclase المرتبط بالغـشاء والـذي يؤدي بدوره إلى زيادة انتاج الادينوسين احادي الفوسفات الحلقي (cAMP) ويسبب افراز الالكتروليتـات والماء في مخاطية الامعاء (Dubey and Sanyal, 1979). ان سلالات *A. caviae* غير منتجة للـذيفان الخارجي إذ كانت نسبة وزن الامعاء إلى وزن الجسم المتبقي اقل من (0.083)، واتفقت هذه النتيجة مـع دراسة (Mehdi et al., 2000) في ان بعض سلالات *A. caviae* المعزولة كانت غير منتجة للذيفان ومن خلال تهجين المستعمرات باستخدام مجس الذيفان غير المستقر حرارياً.

واتضح ان حجم السائل المتجمع يختلف باختلاف السلالات، إذ لوحظ ان حجم السائل كان اعلى في سلالات النوع *A. hydrophila* مقارنة بالنوع *A. sobria* ، وتشير العديد من الدراسات إلى ارتباط الذيفان الخارجي لسلالات *A. hydrophila* بامراضية هذه الجراثيم والذي يسبب الاسهال، إذ انه يمثل مستضدات Antigens تتعادل مع مضادات الذيفان Antitoxin والتي تمنح مناعة لحالات الاسهال بهذا النوع أي انه ذات طبيعة مستضدية، يمتلك خصوصية للذيفان المنتج من قبل هذا النوع وليس الانواع الاخـرى لكـن تأثيره أشد (Dubey and Sanyal, 1979). كما ان الذيفان الخارجي المستخلص والمتسبب بتجمع السوائل في الفئران الرضع لم ينتج تلفاً نسجياً بعد مرور (6) ساعات من التعرض له في الخلايا الظهارية للامعاء المحقونة ولم يحدث تحلل لكريات الدم الحمر عدا ارتشاح خفيف لكريات الـدم البـيض وحيـدة النـواة (Ljungh et al., 1981; Saraswathi and Deodhar, 1986).

المصادر الاجنبية

Baron, E.J. and Finegold, S.M., 1990. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed., C.V. Mosby Company, St. Louis, USA, pp. 223-236.

Burke, V., Gracey, M., Robinson, J., Peck, D., Beaman, J. and Bundell, C., 1983. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. J. Infect. Dis., Vol.148, pp.68-74.

Burke, V., Robinson, J., Atkinson, H.M. and Gracey, M., 1982. Biochemical characteristics of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. J. Clin. Micorbiol., Vol.15, pp.48-52.

Burke, V., Robinson, J., Berry, R.J. and Gracey, M., 1981. Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by suckling-mouse test. J. Med. Micobiol., Vol.14, pp.401-408.

Chopra, A.K. and Houston, C.W., 1999. Molecular characterization of *Aeromonas* enterotoxins. International *Aeromonas*/ *Plesiomonas* Symposium, Swissotel, Chicago, Illinois, pp. 14-16.

Chopra, A.K., Houston, C.W., Genaux, C.T., Dixon, J.D. and Kurosky, A., 1986. Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. J. Clin. Microbiol., Vol.24, pp.661.

Dubey, R.S. and Sanyal, S.C., 1979. Characterisation and neutralisation of *Aeromonas hydrophila* enterotoxin in the rabbit ileal-loop model. J. Med. Microbiol., Vol.12, pp.347-354.

Gosling, P.J., Turnbull, P.C.B., Lightfoot, N.F., Pether, J.V.S. and Lewis, R.J., 1992. Isolation of *Aeromonas sobria* cytotonic enterotoxin and beta-haemolysin by fast protein liquid chromatography. J. Med. Microbiol., Vol.38, pp.227-234.

Gurr, E., 1962. Staining Animal Tissue, Practical and Theoretical. London, Leonard, Hill, p.552.

Kingombe, C.I.B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M.J., Swings, J., Peduzzi, R. and Jemmi, T., 1999. PCR detection characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. Appl. Environ. Microbiol., Vol.65, pp.5293-5302.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C., 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, USA, pp.348-353.

Ljungh, A., Eneroth, P. and Wadstrom, T., 1982. Cytotonic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Toxicon, Vol.20, pp.7.

Ljungh, A., Wretlind, B. and Mollby, R., 1981. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysin from *Aeromonas hydrophila*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Vol.89, pp.387-397.

Luna, L.G., 1968. Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology 3rd. ed., New York: McGraw Hill Book Company, pp.38-76.

Macfaddin, J.F., 1985. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2nd. ed. Waverly Press, Inc., Baltimore, USA, pp.4-10, 36-47, 173-181, 214-215, 249-257.

Mehdi, L.K., Abdul-Ghani, Z. and Al-Zaag, A.A., 2000. Incidence and virulence of *Aeromonas* spp. isolated from infants with diarrhea. Iraqi J. Sci., Vol.41, pp.12-20.

Namdari, H. and Cabelli, V.J., 1989. The suicide phenomenon in motile Aeromonads. Appl. Environ. Microbiol., Vol.55, pp.543-547.

Potomski, J., Burke, V., Robinson, J., Fumarola, D. and Miragliotta, G., 1987. *Aeromonas* cytotonic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. J. Med. Microbiol., Vol.23, pp.179.

Rogol, M., Sechter, I., Grinberg, L. and Gerichter, C.B., 1979. Pril- Xylose-Ampicillin Agar, a new selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol., Vol.12, pp.229-231.

Saraswathi, K. and Deodhar, L.P., 1986. Diarrhoea associated with *Aeromonas hydrophila*. Indian J. Med. Res., Vol.84, pp.571-573.

Shotts, E.B. and Rimler, R., 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila* . Appl. Microbiol., Vol.26, pp.550-553.

Steel, R.G. and Torrie, J.H., 1984. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach. 2nd ed., McGraw-Hill, Inc., Singapore, p. 183.

Thienpont, D., Rochette, F. and Vanparijs, O.F.J., 1986. Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. 2nd ed., Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium, pp.24-29.

Thomson, I.C.R., Stevens, D.P., Mahmoud, A.A.F. and Warren, K.S., 1976. Giardiasis in the mouse: An animal model. Gastroenterol., Vol.71, pp.57-61.

Vadivelu, J., Puthucheary, S.D. and Navaratnam, P., 1991. Exotoxin profiles of clinical isolates of *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol., Vol.35, pp.363-367.