

## 대장균의 장내 독소 생성 균주에 관한 연구

이 영 남

(연세대학교 의과대학 미생물학교실)

### A Study on Enterotoxigenic *Escherichia coli*

#### Detection of Enterotoxigenic Strain of *E. coli* from Diarrheal Children and Normal Children

LEE, Young Nam

(Dept. of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea)

#### ABSTRACT

*Escherichiae*-like organisms were isolated from rectal specimens of 56 children who were either in preschool age or in elementary school. The isolated strains were subjected to tests to screen enteropathogens producing heat-labile enterotoxin and susceptibility test to various antibiotics by disc diffusion method on agar plates. Production of heat-labile enterotoxin by the strains was assayed in the sensitive and reproducible cultured adrenal tumor cell system. The assay was possible by observing change of cell morphology and measuring degree of steroidogenesis of the cell in the presence of heat-labile enterotoxin. Among 56 strains, gave positive reaction in the test of toxin production. This meant that about 10% of the children population objected to the study harbored the toxigenic strain of enteropathogenes. Some of these toxigenic strains were resistant to the antibiotics employed in the test. This study suggested that considerable population in Korea may harbor enterotoxigenic *E. coli* as a part of intestinal normal flora. The toxigenic strains which are resistant to antibiotics may bring an issue of public health in the future.

#### 서 론

인체 및 가축의 장내에 상주하는 정상상주 균총의 하나인 대장균 (*Escherichia coli*) 이 소아 설사의 원인균임은 이미 널리 알려진 사실이지만, 근래에는 소아뿐만 아니라 건강한 성인에게도 급성설사를 일으키는 원인균의 하나로 주목을 받고 있다(Etkin

and Gorbach, 1971, Rosenberg, *et al*, 1977). 대장균에 의한 설사는 대장균이 대사 물질로 분비하는 장내독소(enterotoxin)에 의한다.

대장균의 장내독소 생성균주(enterotoxigenic strain of *E. coli*)에 의한 급성 설사 환자의 발생빈도는 남, 중미대륙, 동남아시아 등 비교적 위생환경이 우수하지 못한 지역으로 알려진 곳을 여행하는 여행자 및 주

민들에게 높지만 (Rowe, *et al*, 1970; Shore, *et al* 1974; Merson, *et al*, 1976; personal communication with Hernandez) 최근에는 구미 각국에서도 환자의 발생이 보고되고 있다. (Rosenberg, *et al*, 1977)

대장균의 장내독소는 그 화학적 성분이 단백질로 대상균의 장내독소는 열에 대한 감수성 정도에 따라 내열성인 독소(heat-stable toxin, ST)와 이열성인 독소(heat-labile toxin, LT)로 구분되며, 소아설사를 일으키는 균은 주로 내열성인 독소를 분비하는 대장균이고, 성인의 설사는 이열성인 독소를 분비하는 대장균에 의한 것으로 보고되어 있다. (Washmuth, *et al*, 1976).

대장균의 이열독소에 의한 급성 설사증은 *Vibrio cholerae*가 분비하는 코레라 장내독소에 의한 코레라증에 비해 약간 경미할 뿐 병증이 흡사하고 (Gorbach, 1970; Etkin, *et al*, 1971; Carpenter, 1972), 대장균의 이열성독소와 코레라독소는 그들의 생화학적, 분자생물학적, 면역학적면에서 유사관련성이 있는 것으로 보고 되어 있다. (Carpenter, 1972; Sack, 1975; Schenkein, *et al*, 1976).

코레라균의 장내독소가 장세포의 adenylate cyclase의 활성을 항진, 그 결과 장세포내의 cAMP의 양을 증가시켜 염류 및 수분의 과대배출을 야기시켜 급심한 탈수를 초래하는 병증을 일으키는데 (Carpenter, 1972; Guerrant, *et al*, 1974) 대장균의 이열성장내독소(LT)도 장세포내의 adenylate cyclase의 활성을 항진, 그 결과 AMP의 양을 증가시키며 (Evans, *et al*, 1972) 이로써 cAMP에 의해 매개되는 모든 생리적 기능에 변화를 가져온다 (Kwan and Wishnow, 1974). 즉 대장균의 이열성장내독소는 코레라 장내독소와 비슷한 생리적 기전작용에 의해 설사를 일으키고 있는 것으로 추측된다 (Dorner and Mayer, 1975).

현재 우리나라를 비롯 동남아 각국에서, 설사환자의 발생빈도가 높음에도 불구하고 이에 대한 기본 연구가 결여되어 있고 질병

의 사후대책으로 화학요법제의 다용이 행하여져, 대중 보건에 여러 문제점을 제시하고 있다.

이에 급성설사의 원인균의 하나로 지목받고 있는 대장균의 장내독소 생성균주(enteropathogenic *Escherichia coli*)에 연구의 일환으로 한국인의 대장균 이열성 장내독소 생성균주의 보유 여부를 살펴 보았다.

## 재료 및 방법

### 조사대상

조사대상은 연세대학교 부속의료원을 찾아 온 소수의 소아설사 환자(9명)과 충청북도 제천군 덕산면파 수산면의 유아 내지 국민학교 학동(51명)으로 이들에게서 직장 또는 항문 채취를 행한 후 채취물로부터 대장균을 분리 동정하였다.

### 균의 분리 동정

채취물을 5-ml의 nutrient broth에서 18~24시간, 37°C에서 배양한 후 각기 배양액을 eosine methylene blue 한천 배지에 도달한 후 다시 배양, 대장균상의 집락을 얻은 후 이를 다시 Mac Conkey agar plate 및 nutrient agar에 획선 접종하여 독립된 집락을 얻었다. 각 가검물로부터 분리된 균주를 triple sugar iron slant에 접종한 후 37°C에서 18~36시간 배양, slant의 상부, 하부, 사면 등의 색소 변화, 가스의 생성 여부 및 황화수소의 생성 시험 등을 행하여 분리된 각 균주를 동정, S-S medium 상에서 집락 형성상 및 배지 색깔의 변화를 관찰함으로써 대장균으로서의 적정성을 재검토한 후, 각 균주의 tryptophanase의 존재 여부, glucose에서의 산 생성력, glucose에서 acetylmethyl-carbinol의 합성여부 및 주석산을 영양원으로 이용할 수 있는지의 가능성을 시험함으로써 대장균을 판정하였다. (Ewing, 1973)

### 독소생성 균주를 감별하는 생화학적 시험 방법

대장균중 이열성 독소 생성균주를 독소비 생성균주로부터 감별하는 생화학적 시험 방

법으로 sucrose 배지에서의 성장 속도 및 가스의 생성능력을 조사하고, pH=8.5인 합성된 배지에서의 성장 여부 및 황산화 암모니아에 침전되는 물질의 생성력 등, Evans 등이 제시한 시험을 행하였다 (Evans and Evans, 1973).

#### 조직세포를 이용한 독소생성 균주의 감별법

각기 분리된 균을 pepton-tryptic soy broth [0.3% peptone, 1.7% tryptic soy, pH=8.5]에 접종, 37°C의 진탕수욕(100 RPM)에서 18-20시간 배양하였다. (Mundall, *et al*, 1976) 배양된 균액을 2,000 RPM으로 30분간 원심 분리한 후 그 상등액을 멸균된 0.2μ의 여과막(직경 2.5mm, Amicon membrane, Amicon Lexington Mass, U.S.A.)과 주사기형 여과장치를 이용하여 과액을 얻었다. 0.1ml의 여과액을 multiwell micro plates (Costar, Cambridge, Mass.)에 배양된 부신암 세포(Adrenal tumor cell)인 Y-1 cell의 confluent mono layer에 첨가하고 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator [5%CO<sub>2</sub>]에서 20시간 정도 계속 배양한 후 위상차 현미경(phase-contrast microscope, Nikon MS)으로 세포의 원형화를 관찰함으로써 여과액속의 독소 존재 여부를 확인하였다 (Gurwith, 1977). 대조군(control)으로는 독소생성균주로 널리 알려진 *E. coli* H-10407과 멸균 배양액을 택하였다.

#### 스테로이드 정량

Y-1 cell의 배양액속의 스테로이드 정량은 fluorometric법으로 행했다 (Wishnow and Feist, 1974; Wishnow, *et al*, 1976) Y-1 cell이 자란 배양액 1 ml를 원심분리관에 옮기고 여기에 5-ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 첨가하고 1~5초 가량 진탕한 후, 상온에서 15분간 방치하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층과 배양액층이 선명히 분리된 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층에서 1 ml의 용액을 취한 뒤 여기에 2 ml의 35% EtOH, 65% sulfuric acid 시약을 가하고 약 5초간 혼탕하고, 이 혼탕액을 냉온, 또는 상온에서 70분 이상 방치한 후 1st filter로는 460nm와 2nd filter는 546nm로 조절된

fluorometer [G.K. Tuner Associate fluorometer, Palo Alto, Ca, USA]을 사용하여 각기 배양액속의 steriod량을 측정했다.

#### 화학요법제에 대한 감수성 측정

아래에 열거한 상품화된 disc (Difco laboratories)을 이용해 분리된 균주의 화학요법제에 대한 감수성 또는 내성도를 측정하였다.

Chloramphenicol [10μg], Lincomycin [2μg], Neomycin [10μg], Novobiocin [30μg], Triple sulfa[50μg], Vancomycin [5μg], Colistin [10μg], Polymyxin B [50unit], Furadantin[50μg], Gentamycin [10μg], Nalidixic acid[5μg], Kanamycin [5μg]

#### 결 과

연세대학교 부속의료원 소아설사환자 9예와 제천군의 설사 아동 및 정상아동 51예, 통합 60예 중 nutrient broth→eosine methylene blue agar plate→MacConkey agar→nutrient agar plate등에 계대 배양되어 분리한 균의 순수 집락 중 대장균상 (*Escherichiae*-like strains)의 균주는 모두 56예로, 이 중 triple sugar iron slant 에서 49예가 *Escherichiae*양의 생화학적 반응을, 9예는 *Shigella* sp의 생화학적 반응을 보였다. Indole 생성, methly red test에 의한 glucose에서의 산 생성, Voges-Proskauer 반응에 의한 glucose에서 acetylmethylcarbinol의 합성 여부의 판정 및 주석산 배지에서의 성장 등의 시험에서 30균주 단이 전형적인 *Escherichiae* 양의 시험성적을 보여 주었다.

Evans (Evans and Evans, 1973)가 발표한 논문에 의거해, 독소 생성 균주를 비생성 균주로 부터 구별하는 방법으로 sucrose가 첨가된 배지에서 sucrose의 이용 유무 및 성장 속도, pH=8.5인 합성 배지에서 성장 여부 및 황산화 암모니아에 침전되는 물질의 대량 생성 등의 시험을 한 결과

Suc<sup>-</sup>가 21균주 pH=8.5인 phenotype이 14균주, Ams<sup>+</sup> phenotype이 16균주였으나, Suc<sup>-</sup>, pH=8.5 phenotype, Ams<sup>+</sup> phenotype 모두를 나타낸 균주는 7균주에 불과했다.

adrenal tumor cell인 Y-1 cell을 이용하여 균주의 장내독소 생성 여부를 조사한 결과, cell의 50%정도의 원형화를 보여준 세균여과액이 4예, cell의 10~30%의 원형화를 나타낸 세균여과액이 6예였으며, 이 실험의 positive control로 사용했던 *E. coli* H-10407의 여과액에 의해 Y-1 cell의 50% 이상의 원형화를 보였고 negative control인 멸균 배양액에 의해서는 Y-1 cell의 원형화는 별로 관찰할 수 없었다. (Table 1, Figure 1).

Table 2는 Y-1 cell의 배양 상등액 속에 생성되어 있는 steroid의 양을 fluorometer로 측정한 수치와 standard curve로 부터 각 수치에 대응하는 실제의 steroid 양을 환산한 것을 나타내는 것으로 약 50%의 원형화를 보여 주었던 plates는 0.4—0.6 $\mu$ g의 steroid를 함유, 10—30%의 원형화를 보여 주었던 6예 plates 중 한개가 약 0.4 $\mu$ g의 steroid를 함유 그리고 다른 한개가 0.3 $\mu$ g 정도의 steroid를 함유 했을 뿐 나머지는 negative control과 비해 큰 차이를 볼 수 없었다.

분리된 균주의 화학요법제에 대한 감수성 내지 내성도 측정 시험의 결과는 (Table 3) 균주의 90% 이상이 lincomycin (2 $\mu$ g) novobiocin (30 $\mu$ g), triple sulfa (50 $\mu$ g), vancomycin (5 $\mu$ g)에 내성을, 60% 이상의 균주가 chloramphenicol(5 $\mu$ g)에 내성을 보였다. colistin (10 $\mu$ g), neomycin (10 $\mu$ g), polymyxin B (50 unit)에 대해 85—95%의 균주가 내성 내지 약의 감수성을 나타낸 때 비해 kanamycin(5 $\mu$ g)은 낮은 농도에도 불구하고 60%의 균주가 중간 정도 이상의 감수성을 보였다. 그리고, 70—80%의 균주가 furadantin(50 $\mu$ g)와 gentamycin(10 $\mu$ g), nalidixic acid (5 $\mu$ g)에 대해 감수성을 보

였다.

nalidixic acid에 대해 감수성을 보인 균주 중 현재 내성 균주가 발견되고 있는 것이 종종 관찰되었는데 46예의 감수성을 보인 균주 중 21예에서 내성균주의 발현을 볼 수 있었다.

부신암 세포의 원형화 및 steroid 생성 여부 실험에 근거해 독소 생성균주로 간주되는 균주들에 대한 화학요법제에 대한 감수성 내지 내성도의 측정 결과는 Table 4에 나타나 있는데, 이 실험의 결과로 대부분의 독소 생성균주가 시험관 화학요법제에 대해 상당의 내성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Rounding of Y-1 Cell by Bacterial Culture Filtrate

Strains	Rounded Cell Population (%)
<i>E. coli</i> H-10407	more than 50%
5, 19, 104, 107	about 50%
13, 14, 18, 21, 102, 113	10—30%
Sterile Culture Broth	negligible

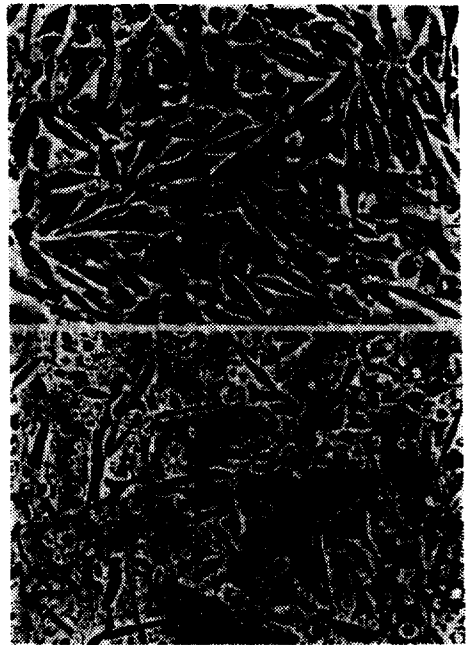


Fig 1. Normal cells of Y-1 cell line of adrenal tumor cell (top) and rounded Y-1 cells exposed to heat-labile enterotoxin of *E. coli* (bottom).

**Table 2.** Steroidogenesis of Y-1 Cell in Presence of Bacterial Culture Filtrate

Strain	Reading at 30X Window	Conc. of Steriod (ug)	Remark
<i>E. coli</i> H-10407	106*(89, 123)	1.05	Positive Control
5	45 (50, 40)	0.45	Toxigenic
13	27 (32, 22)	—	Non-toxigenic
14	26 (23, 29)	—	Non-toxigenic
18	32 (31, 32)	0.31	Weakly toxigenic
19	44 (45, 42)	0.44	Toxigenic
21	27 (26, 27)	—	Non-toxigenic
102	23 (22, 24)	—	Non-toxigenic
104	56 (43, 69)	0.56	Toxigenic
107	41 (38, 43)	0.41	Toxigenic
113	40 (36, 43)	0.40	Toxigenic
Sterile Culture Broth	20 (19, 20)	—	Negative Control

\*: Average of two readings

**Table 3.** Susceptibility of Strains to Various Antibiotics

Antibiotic	No Growth Inhibition No. of Strain (%)	Growth Inhibition (Diameter of Growth Inhibition Zone in Millimeter)				
		8-10	11-15	16-20	21-25	>25
Chloramphenicol (10µg)	30(54%)	1	7	14	—	—
Colistin (10µg)	25(45 )	30	1	—	—	—
Furadantin (50g)	15(27 )	2	23(2)*	16	—	—
Gentamycin (10µg)	11(20 )	6	34	4	1	—
Kanamycin (5µg)	19(34 )	2	32	3	—	—
Lincomycin (2µg)	55(98 )	1	—	—	—	—
Nalidixic Acid (5µg)	10(18 )	2	16(12)*	28(9)*	—	—
Neomycin (10µg)	43(77 )	12	1	—	—	—
Novobiocin (30µg)	50(89 )	4	1	—	—	1
Polymyxin B (50U)	32(57 )	24	—	—	—	—
Triple Sulfa (50µg)	54(96 )	2	—	—	—	—
Vancomycin (5µg)	54(96 )	1	1	—	—	—

\*: Number of episode showing resistant colonies inside inhibition zone.

Table 4. Susceptibility of Toxigenic Strains to Various Antibiotics

Antibiotic	Toxigenic Strain						
	5	18	19	21	104	107	113
Chloramphenicol (10 $\mu$ g)	S	R	R	S	R	S	R
Colistin (10 $\mu$ g)	R	R	R	R	R	R	R
Furadantin (50 $\mu$ g)	R	S	S	S	S	MS	MS
Gentamycin (10 $\mu$ g)	S	MS	MS	S	R	R	MS
Kanamycin (5 $\mu$ g)	MS	MS	R	MS	MS	S	MS
Lincomycin (2 $\mu$ g)	R	R	R	R	R	R	R
Nalidixic Acid (5 $\mu$ g)	S	S	S	S	R	S	S
Neomycin (10 $\mu$ g)	R	R	R	R	R	R	R
Novobiocin (30 $\mu$ g)	R	R	R	R	R	R	R
Polymyxin B (50U)	R	R	R	R	R	R	R
Triple Sulfa (50 $\mu$ g)	R	R	R	R	R	R	R
Vancomycin (5 $\mu$ g)	R	R	R	R	R	R	R

R:Resistant, zone of growth inhibition was less than 10mm. MS: Medium Sensitive, zone of growth inhibition was 11-14mm. S: Sensitive, zone of growth inhibition was more than 15mm.

## 고 찰

본 연구는 코레라증과 유사한 급성설사의 원인균에 대한 연구로, 그 중 이열성장내독소를 산생할 수 있는 대장균을 대상으로 하였다. 세균성 장내 질환 중, 병증이 극심하고 치사율이 높은 살모넬라증, 코레라, 이질에 대한 예방, 치료면에서의 국민이 인식도는 비교적 높으나, 계절의 구별없이 우리 대부분이 경험하는 급성설사에 대한 역할, 예방, 치료면에서 국민의 인식도는 낮을 뿐더러 급성설사를 가볍게 다루는 경향마저 있다. 근래에 이르러 구미 각국에서는 세균학적 면에서 급성 설사의 원인 기전에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 (Cushing, 1978) 이런 연구는 환자의 발생 빈도가 낮은 구미각국보다는 질환의 발생율이 높은 동남아 지역에서 질병의 지역적 특수성으로 보아 활발히 진행되어야 할 것이다.

코레라증은 세균독소(bacterial exotoxin)에 의한 질환으로 *Vibrio cholerae*가 장내에 침입하여 그 곳에서 단백질의 장내 독소

를 분비하면 이 장내 독소가 장세포에 미치는 영향의 결과로 급심한 설사가 초래되는 것이다. 이에 비해, 증세는 다소 경미하지만 유사한 질환(cholera-like disease)을 일으키는 세균들이 보고되었는데, *Clostridium perfringens* (Duncan and Strong, 1969) *Klebsiella pneumoniae* (Klipstein and Engert, 1976), *Aeromonas hydrophila* (Ljungh, et al. 1977), *Escherichia coli* (Sack, 1975)가 그 예들로 이균들 모두가 장내에 정상상주 균총이며, 장내 독소를 산생하고 있는 것이다(Lee, 1978).

*E. coli*의 이열성 장내독소는 면역학적, 생화학적, 생리학적 면에서 코레라 장내 독소와 유사한 점이 많다(Gyles, 1974). *E. coli*의 이열성 장내독소는 분자량 70,000~80,000 Dalton 정도의 단백질로 거의 순수하게 분리된 상태에 있다(Schenkein, et al. 1976; Personal communication with Wishnow). *E. coli*의 이열성 장내 독소를 산생하는 유전 인자(Tox<sup>+</sup> gene)은 plasmid에 있는 것으로 이 유전 인자는 접합과정에서 다른 균, 특히 *E. coli*와 여러가지 면

에서 밀접한 장내 세균층에 쉽게 전달될 수도 있다.

이렇듯 유전학적, 생화학적으로 *E. coli*의 이열성 장내독소에 관한 기초연구가 진행되고 있는데 우리나라에서는 급성설사의 원인균의 하나인 이열성 장내독소를 생산하는 대장균에 대한 연구가 거의 없기에, 이에 관심을 갖고 우선 소아 및 아동에게서 이열성 장내 독소 생성 대장균주의 분포를 살펴 보았다.

현재, 이열성 장내 독소 생성균주를 비생성균주로부터 간단히 시험관내에서 구별할 수 있는 생화학적 방법은 없다. 혈청학적 방법에 의해 독소 생성균주를 비생성균주로부터 구별하는 것도 거의 실행성이 없다(Goldschmidt and Dupont, 1976).

현재까지 알려진 독소 생성균주를 감별하는 방법은 배양된 조직 세포를 이용해독소에 의한 세포 형태의 변화를 관찰하거나(Guerrant, et al. 1974; Donta et al. 1974), 독소의 작용으로 인해 야기된 세포의 생화학적 변화를 측정하는 것이다(Evans

et al. 1972; Kwan and Wishnow, 1974). 또 토끼의 회장을 써서 독소 생성 균주를 감별하는 방법이 있으나(Sack, 1975), 이 방법으로 다량의 균주를 감별하는 데는 경제적, 시간적으로 큰 부담이 따른다.

본 연구에서 조사 대상이 되었던 소아중원세대학교 부속의료원을 찾았던 소아설사 환자에게서 분리한 대장균 중 독소 생성 균주는 없었다. 그러나 충북 제천군 덕산면과 수산면의 어린이에게서 분리한 50균주 중 6균주가 독소 생성 균주며 그 중 2균주는 수일간 심한 설사를 한 아동에게서 채취한 것이다.

분리한 균주는 장내 질환 치료제로 흔히 사용되는 항생제에 대해 비교적 내성을 보였는데 설사 아동에게서 얻은 2독소 생성균주의 항생제에 대한 내성도는 치료면에서 크게 관심을 모은다.

이에 설사 환자 및 정상인의 독소 생성균주의 보유 및 파급에 대한 연구가 좀 더 진행되면, 급성 설사 질환에 대한 예방, 치료면에서 적절한 대책이 마련되어야 할 것이다.

## 적 요

위생환경이 좋지 못하고 보건사업의 혜택이 원활치 못한 지역의 소아 및 국민학교에게서 분리한 장내 세균 중 이열성 장내 독소생성 대장균주의 분포를 배양된 부신암 세포를 이용하여 살펴 보았다. 이 열성 장내독소의 존재아래 부신암 세포는 세포의 원형화 및 steroid 생성력의 항진을 보이기에 이 두 성질에 기초를 두어 독소생성균주를 감별하였다.

실험의 결과 조사대상자의 약 10%에 해당하는 균주들이 독소 생성균주로 밝혀졌다. 분리한 균주의 화학요법제에 대한 감수성 내지 내성도를 측정하였는데 특히 주목할 것은 이열성 장내독소 균주들의 대부분이 gentamycin (10 $\mu$ g)과 nalidixic acid (5 $\mu$ g)에 감수성이 있는데 비해, colistin (10 $\mu$ g), novobiocin (30 $\mu$ g), sulfa drug (50 $\mu$ g)에는 내성을 나타냈으며, 장내 질환에 널리 쓰이는 chloramphenicol (10 $\mu$ g)에 대해서는 균에 따라 감수성 또는 내성을 보인바 있다.

이상의 조사로 우리나라 정상아동이 상당의 이열성 장내독소 생성균주를 보유하고 있음을 알 수 있다. 이를 균주중 몇개는 장내질환 치료제로 널리 사용하는 항생제에 대해 내성을 지니고 있음을 볼 수 있었다.

## 감사 드림

이 실험을 하는데 관심을 갖고 실험실 기구 및 재료를 사용하도록 편의를 보아 준 미국 Long Beach 소재 재향군인병원 감염병 연구실의 R. Wishnow와 C. Chen에게 감사드린다.

## REFERENCES

1. Carpenter, C.C.J. 1972. Cholera and other enterotoxin related diarrheal disease. *J. of Infect. Disease* **126**, 551
2. Cushing, A.H. 1978. Toxigenic and inva-

- sive *E. coli* in sporadic infantile diarrhea. *Clinical Research* **26**, 186 A
3. Donta, S.T., H.W. Moon and S.C. Whipp 1974. Detection of heat-labile *E. coli* enterotoxin with use of adrenal cell in culture. *Science* **183**, 334
  4. Dorner, F. and P. Mayer 1975. *Escherichia coli* enterotoxin: Stimulation of adenylate cyclase in broken-cell preparations. *Infect. and Immunity* **11**, 429
  5. Duncan, C.L. and O.H. Strong 1969. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. *J. Bact.* **100**, 86
  6. Etkin, S. and S.L. Gorbach 1971. Studies on enterotoxin from *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in man. *J. of Lab. and Clinical Med.* **78**, 81.
  7. Evans, D.J. Jr., L.C. Chen, G.T. Curlin and D. Evans 1972. Stimulation of adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *Nature (New Biology)*. **236**, 137.
  8. Evans, D.J. Jr., and D.G. Evans 1973. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. and Immunity* **8**, 322
  9. Ewing, W.H. 1973. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions. Center for disease control, US Public Health Service, 1973.
  10. Goldschmidt, M.C. and H.L. Dupont 1976. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Lack of correlation of serotype with pathogenicity. *J. of Infect. Disease* **133**, 153
  11. Gorbach, S.L. 1970. Acute diarrhea -A toxin disease? *New Engl. J. of Med.* **283**, 44
  12. Guerrant, R.L., L.L. Brunton, T.C. Schnatman, L.I. ReBhun and A.G. Gilman 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alternation of chinese hamster ovary cell morphology: A rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *E. coli*. *Infect. and Immunity* **10**, 320
  13. Gurwith, M. 1977. Rapid screening method for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. of Clinical Microbiol.* **6**, 314
  14. Gyles, C.L. 1974. Relationships among heat-labile enterotoxins of *E. coli* and *Vibrio cholerae*. *J. of Infect. Disease* **129**, 277
  15. Klipstein, F.A. and R.F. Engert 1976. Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect. and Immunity* **13**, 373
  16. Kwan, C.N. and R.M. Wishnow 1974. *Escherichia coli* enterotoxin induced steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *Infect. and Immunity* **10**, 146
  17. Lee, Y.N. 1978. Bacterial exotoxins: Biochemistry and pathogenic mechanisms at subcellular levels, *Yahhak Hoeji* **22**, 59
  18. Ljungh, A., M. Popoff and T. Walstrom 1977. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: Detection of enterotoxin and biotyping of strains. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 96
  19. Merson, M.H., G.K. Morris, D.A. Sack, J.G. Wells, J.C. Feeley, R.B. Sack, W. B. Creech, A.Z. Kapikian, and E.J. Gangarosa 1976. Traveller's diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress. *New Engl. J. of Med.* **294**, 1299
  20. Mundall, D.H., C.R. Anselmo and R.M. Wishnow 1976. Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. and Immunity* **14**, 383
  21. Rosenberg, M.L., J.P. Koplman, I.K. Washsmuth, J.G. Wells, E.J. Gangarosa, R.L. Guerrant and D.A. Sack 1977. Epidemic diarrhea at Carter Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annals of Internal Med.* **86**, 714
  22. Rowe, B., J. Taylor and K.A. Bettelheim 1970. An investigation of traveller's diarrhea. *Lancet* **1**, 1
  23. Sack, R.B. 1975. Human diarrheal disease



- caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* **29**, 333
24. Schenkein, I., R.F. Green, D.S. Santos and W.K. Maas 1976. Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *E. coli*. *Infect. and Immunity* **13**, 1710
25. Shore, E.G., A.G. Dean and K.J. Holk 1974. Enterotoxin-producing *Escherichia coli* and diarrheal disease in audit traveller's: A prospective study. *J. of Infect. Disease* **129**, 577
26. Washmuth, I.K., S. Falkow and R.W. Ryder 1976. Plasmid-mediated properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Infect. and Immunity* **14**, 403
27. Wishnow, R.M. and P. Feist 1974. The effect of cholera enterotoxin on steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *J. of Infect. Disease* **129**, 695
28. Wishnow, R.M., E. Lifrak and C-C. Chen 1976. Mode of action of *Vibrio cholerae* enterotoxin in cultured adrenal tumor cells. *J. of Infect. Disease* **133**, S108