

## 송아지 大腸菌 Pilus Vaccine 開發에 관한 研究: I. 송아지 泄瀉原因 大腸菌(K99, F41)의 分布 및 Pilus 精製試驗

金鍾萬·尹用德·朴政文·金鳳煥\*  
家畜衛生研究所·慶北大學校 農科大學 獸醫學科\*  
(1986. 2. 28 接受)

### Studies on Development of *Escherichia coli* Subunit Vaccine against Calf Diarrhea: I. Distribution of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Purification of K99 and F41 Pilus Antigens

Jong-man Kim, Young-dhuk Yoon, Jeung-moon Park and Bong-hwan Kim\*  
Veterinary Research Institute, Rural Development Administration  
Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Kyungpook National University\*  
(Received February 28th, 1986)

**Abstract:** The prevalence of diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* was surveyed on 445 calves in 6 farms which were located in the central part of Korea.

The incidence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with diarrhea was investigated by detecting the K99 and F41 antigens from the isolated strains of *Escherichia coli*

The incidence of colibacillosis in calves was 23.3%. Of 238 strains of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea, 73 strains(30.6%) were proved possessing the K99 antigen by mannose-resistant hemagglutination(MRHA) using horse red blood cells and 79(33.1%) possessing F41 antigens by MRHA using guinea-pig red blood cells.

The minca medium, nutrient broth, tryptic soy broth and brain heart infusion were tested for yield of K99 and F41 pili. The production of pili was greatest in minca medium.

The best detachment method of the K99 and F41 pili from the cells was heat treatment for 20 minutes at 60°C and concentration by precipitation with ammonium sulfate.

The purified antigens of K99 and F41 were polypeptides with molecular weights of 18,500 and 29,500, respectively by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

### 緒 論

病原性大腸菌에 의한 어린 송아지泄瀉症은 주로菌體表面에 있는 솜털처럼 가늘고 긴蛋白質性分의 pilus에 의해小腸上部粘膜에附着·增殖하면서分泌하는腸毒素(enterotoxin)에 의해發生된다는 것이 여러研究者들에 의해 밝혀진 바 있다.<sup>5,13,17,18,30,37)</sup> Ashwell<sup>2)</sup>, Gaastra와 Graaf<sup>10)</sup> 그리고 Ørskov 등<sup>35)</sup>은 이러한 pilus

에는 家畜의 種類에 따라 特異한 型(type)이 있으며, 송아지와 양에서는 K99와 F41이 돼지에서는 K88, K99 그리고 987P가 關係한다고 하였다.

Morris<sup>32)</sup>, Graaf<sup>10)</sup>은 K99 pilus의 굵기는 4.8nm, F41은 3.2nm이며 길이는 0.3 $\mu$ m로서 菌體當 약 100個 정도가 있으며 이러한 pilus의 生成은 菌株·培地組成·培養時間 및 溫度에 따라 影響을 받는다고 했다. 또한 Evans 등<sup>12)</sup>과 Evans와 Evans<sup>14)</sup>은 이들 菌體에서 pilus

를 分離하고 精製하는 方法에 따라 分離되는 pilus量과 純도에 差異가 있다고 하였으며, 이들 分離·精製된 pilus는 mannose-resistant hemagglutination(MRHA) test, 형광항체 또는 전자현미경 등에 의해서 증명할 수 있고 純도는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 의해서 確認할 수 있다는 것이 여러 研究者들에 의해서 報告된 바 있다. 8,9,15,16,19)

우리나라에서 家畜의 大腸菌 백신으로는 菌을 全培養하여 不活化시켜 만든 돼지 대장균백신이 있으나 송아지 대장균백신은 開發되어 있지 않다.

本 研究에서는 效果 높은 송아지 대장균 pilus 精製 백신 開發을 爲한 基礎試驗으로 설사 송아지로부터 分離된 大腸菌의 pilus 分布를 調査하고 이들 大腸菌으로부터 pilus 分離·精製試驗을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

**泄瀉發生率調査 및 試料採取:** 경기, 충청, 강원 3개 지역 6개 大規模 牧場에서 飼育하고 있는 송아지중 調査當時의 泄瀉發生狀況을 調査하였고, 試料는 直腸綿棒法(rectal swab)으로 설사를 하고 있는 송아지로부터 便을 採取하여 使用하였다.

**大腸菌 分離·同定:** 採取한 便을 少量의 食염수에 浮游시켜 MacConKey agar plate에 分離培養한 뒤 乳糖을 分解한 菌을 集落性狀에 따라 각기 選定하여 Cowan<sup>4)</sup> 및 Edward 와 Ewing<sup>11)</sup>의 方法에 따라 IMVIC test 등 24種의 生化學的 性狀을 調査하여 同定하였다.

**MRHA에 의한 分離大腸菌의 pilus 分布調査:** 大腸菌을 tryptic soy broth(TSB)에서 37°C, 18시간 培養하여 5% sheepblood agar plate에 옮겨 다시 37°C, 18시간 배양 후 smooth colony를 選定하여 Minca medium에서 37°C, 36시간 培養하였다. 이 배양균을 5°C에서 8,000rpm, 20분간 遠心分離(Hitach: 18RP-2 type)하여 蒐集하고 PBS(pH 7.2)로 1회 洗滌한 뒤 菌을 0.5% D-mannose 含有한 PBS에 浮游시켜 ( $1 \times 10^{11}$ /ml) pilus 有無를 調査하는 菌液으로 使用하였다. 이 菌液 50 $\mu$ l를 U bottom microplate에 넣고 2進稀釋한 뒤 同量의 1% 기니픽 또는 馬 赤血球를 加하고 5°C 冷藏庫에서 3時間 反應시킨 뒤 凝集與否를 判讀하여 調査하였다.

**Pilus 生成培地 選拔:** 6株의 K99 陽性菌, 12株의 K88陽性菌 그리고 2株의 987P陽性菌을 Minca medium, tryptic soy broth(TSB), brain heart infusion broth(BHI) 그리고 nutrient broth(NB)에 각각 接種

한 뒤 37°C, 36시간 培養하고 菌體를 遠心·蒐集하여 MRHA test에 의해 培地別, 菌株別 pilus 生成량을 調査하였다.

**Pilus 分離·精製:** K99, F41 陽性菌 1株를 選定하여 minca medium에서 培養하여 遠心分離에 의해 集菌한 뒤 saline(0.15M), salt PBS(1M NaCl 0.2g KCl, 1.15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, D. W. 1,000ml), PBS(8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, D. W. 1,000ml pH7.5), tris buffer(3g tris, 8g NaCl, 0.38g KCl, 0.1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g Dextrose, DW 950ml, pH 7.4~7.5), urea buffer(10mM Tris, 2M urea, pH 7.0)에 각각 浮游시킨 뒤 機械的 方法(blender mixer)으로 均質化하거나 熱處理方法(60°C 20分 또는 85°C 5分)에 의해서 菌體로 부터 pilus를 分離한 뒤 5°C에서 ammonium sulfate를 加하여 pilus를 沈澱시킨 뒤 10,000rpm 30分間 遠心分離에 의해 蒐集, PBS에 浮游시켜 pilus의 量과 純도를 浮游液別 分離方法으로 比較하였다.

**分離·精製된 Pilus의 性狀確認:** pilus의 分子量은 Hames 와 Rickwood<sup>21)</sup>의 方法에 따라 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로, pilus量은 MRHA에 의해서 調査하였다.

### 結 果

송아지 泄瀉發生率: 6個 牧場 445頭의 송아지를 대상으로 調査된 泄瀉發生率은 Table 1에서와 같이 1週齡에 33頭(7.4%), 2~3週齡에 50頭(11.2%), 4~8週齡에 21頭(4.7%)로 全體적으로는 104頭(23.3%)였으며 牧場別로는 16%에서 34%로 多樣하였다.

**Table 1.** Prevalence of Colibacillosis in Calves by Weeks

Farms	No. of calves surveyed	No. of diarrheal calves			Total(%)
		1	2~3	4~8wks	
A	50	2	1	5	8(16.0)
B	45	4	4	2	10(22.2)
C	94	2	3	14	19(20.0)
D	41	3	11	—	14(34.1)
E	70	11	8	—	19(27.1)
F	145	11	23	—	34(23.4)
Total (%)	445	33 (7.4)	50 (11.2)	21 (4.7)	104(23.3)

**Table 2.** Distribution of Pili-Containing *E. coli* Isolated from Calves with Diarrhea

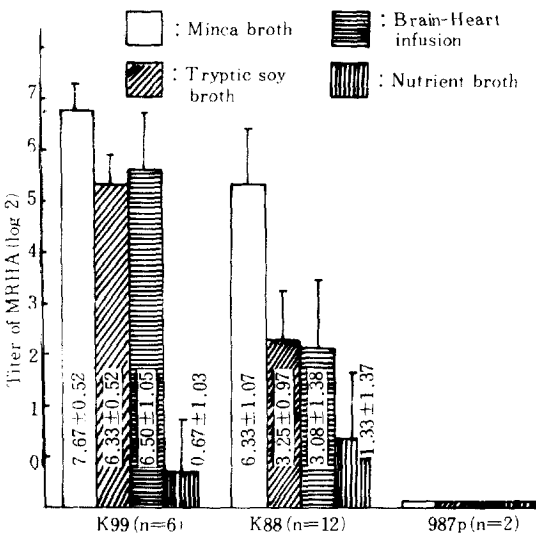
No. of strains tested	Methods	No. of pili positive strains(%)	
		K99 (Equine Rbc)	K88 & F41 (G-pig Rbc)
238	HA	86(36.1)	123(51.6)
	MRHA	73(30.5)	79(33.1)

HA: Hemagglutination test

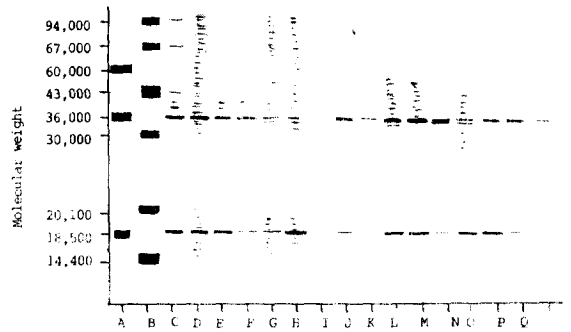
MRHA: Mannose-Resistance Hemagglutinating Activity

**分離 大腸菌의 Pilus 分布:** 分離, 同定된 大腸菌 238 株의 MRHA能에 의한 pilus type과 陽性菌 分布는 table 2에서와 같다. D-mannose를 加하지 않은 馬赤血球 凝集菌은 86株(36.1%), 기니피크赤血球 凝集菌은 123株(56.1%)였으며, D-mannose를 加한 馬赤血球 凝集菌은 73株(30.5%), 기니피크赤血球 凝集菌은 79株(33.1%)로 減少하였으며 全體의 陽性菌株는 152株(63.7%)이었다.

**Pilus 生成 優秀培地:** 培地別·菌株別 pilus 生成量을 MRHA가 (log 2)로 調査한 성적은 Fig. 1에서와 같이 pilus type에 關係없이 Minca medium이 가장 優秀하여 K99는  $7.67 \pm 0.52$ , K88은  $6.33 \pm 1.07$ 였으며 TSB와 BHI는 K99가  $6.33 \pm 0.52$ 와  $6.50 \pm 1.05$ , K88은  $3.25 \pm 0.97$ 과  $0.8 \pm 1.38$ 로 비슷하였고, NB가 가장 不良하여 K99는  $0.67 \pm 1.03$ , K88은  $1.33 \pm 1.37$ 였으며, 987

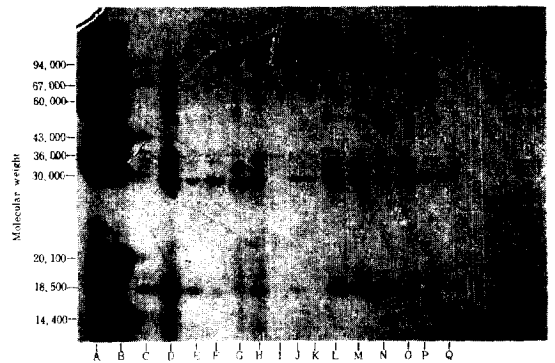


**Fig. 1.** Productivity of pili in *E. coli* cultured in various media



**Fig. 2.** Diagram of SDS-PAGE patterns of pili preparations

- (A) High molecular weight marker
- (B) Low molecular weight marker
- (C) Salt PBS, 85°C, 5min.
- (D) Urea PBS, homogenizing
- (E) Salt PBS, 60°C, 20min.
- (F) Salt PBS, homogenizing
- (G) Urea buffer, 85°C, 5min.
- (H) Urea buffer, 60°C, 20min.
- (I) Tris buffer, 60°C, 20min.
- (K) Tris buffer, Homogenizing
- (L) PBS, 85°C, 5min.
- (M) PBS, 60°C, 20min.
- (N) Saline, 60°C, 20min.
- (O) Saline, 85°C, 5min.
- (P) Saline, 60°C, 20min.
- (Q) Saline, homogenizing



**Fig. 3.** Photograph of SDS-PAGE patterns of pili preparations same as Fig. 2.

P는 赤血球凝集能이 없기 때문에 이 方法으로 調査할 수 없었다.

**Pilus 分離 精製法 比較:** pilus 分離 精製의 浮游液別 處理別 pilus 生成量을 MRHA가 (log 2)로 比較한 성적은 Table 3과 같이 PBS에 浮游시켜 60°C 20分 處理한 것이 K99는 5, F41은 9, urea buffer에서 均質化한 것이 K99는 6, F41은 8로 두가지 方法이 가장 好

**Table 3.** Comparisons of MRHA Titres of K99 and F41 Pili Purified by Various Treatments

Suspending solutions	MRHA titres(log 2) of pili treated with					
	Homogenizing		60°C 20min. 85°C 5 min.			
	K99	F41	K99	F41	K99	F41
Saline(0.15M)	4	7	3	8	1	6
PBS(pH 7.5)	3	7	5	9	0	2
Salt PBS(1M)	1	5	2	7	0	2
Tris buffer(20mM)	4	5	3	6	0	0
Urea buffer(2M)	6	8	0	0	0	0

었다. 浮游液別로는 PBS가 處理別로는 60°C 20分 熱處理가 比較的 우수하였다.

分子量(M. W.) 確認 및 純度を 比較한 성적은 Fig. 2 및 Fig. 3에서와 같이 處理方法에 關係없이 M. W. 29,500의 F41 pilus와 18,500의 K99 pilus를 確認할 수 있었으며 純도는 不純 protein band가 없는 tris buffer에서 60°C 20分 處理한 것과 saline에서 60°C 20分, 또는 85°C 5分 處理한 것이 가장 좋았다.

### 考 察

송아지 泄瀉發生은 原因體나 季節, 飼養管理狀態 등에 따라 매우 多樣하다. 調査된 송아지의 平均 泄瀉發生率 23.3%는 調査當時의 설사발생율(point prevalence)이나 송아지 설사발생의 被害가 가장 심한 分娩後부터 離乳期까지 一定期間 發生率(period prevalence)을 調査한다면 이보다 매우 높은 發生率을 보일 것으로 생각되며 이에 대한 보다 廣範圍한 調査가 이뤄져야 正確한 被害狀況이 밝혀질 것으로 생각된다.

Ofek와 Beachery<sup>34)</sup>, Levine 등<sup>29)</sup>은 大腸菌의 小腸壁 附着能力은 yeast cell이나 赤血球 凝集能力과 밀접한 關係가 있으며 K88과 K99는 MRHA 能力이 있는 반면 type I somatic(common) pili는 MSHA(mannose-sensitive hemagglutination)하고 987P는 血球凝集能力이 없다고 했으며, Isaacson<sup>35)</sup>은 F41은 기니피과 사람 A型 赤血球를 弱하게 凝集하나 K99는 전혀 凝集하지 않으며 반대로 K99는 馬赤血球를 強하게 凝集하나 기니피赤血球는 凝集하지 못한다고 했다 本 研究에서 調査된 大腸菌 238株中 病原性大腸菌(ETEC)으로 분수 있는 MRHA 陽性菌 中에서 K99 陽性菌(馬血球凝集)은 73株(48%)로 Moon 등<sup>30)</sup>의 46株의 ETEC 中 35株(76%), Burrows 등<sup>31)</sup>의 소, 양 分離大腸菌의

70~95%가 K99陽性菌株었다는 報告와는 큰 差異를 보였는데 이는 調査對象이나 泄瀉原因의 分布의 差異 때문에 生覺된다.

Pilus는 菌體에 붙어 있는 매우 微細한 subunit로 이것만을 純粹精製하여 백신을 製造하는데는 大量의 pilus를 生産하는데 어려움이 있다. 供試한 4種의 培地에 대한 pilus 生成能 比較에서 Minca medium이 pilus type에 關係없이 가장 많은 量의 pilus를 生成하였으며 이는 Graaf와 Roorda<sup>9)</sup>의 複合培地서 K99 生成은 alanine, glucose 등의 存在로 強하게 抑制되며 Minca나 minimal 배지같이 菌成長에 必要한 最小限의 營養분이 含有된 培地가 좋았다는 성적과 一致하였다.

Pilus 大量 生産에 있어 또 하나의 問題는 菌體에서 效果의 ため로 pilus를 分離하는데 있다 Graaf<sup>9)</sup>는 熱處理에 依해 菌體에서 pilus를 分離하는 경우 약 90%, omni mixer로 分離하는 경우 약 50%의 pilus가 分離되었고, phosphate-urea buffer가 가장 純粹한 pilus 抗原을 얻는 데 좋았다고 하였으나 pilus 分離方法의 結果는 本 研究成績과 같았으나 純粹分離 結果에서는 若干의 差異가 있었다.

### 結 論

6個 牧場, 445頭의 송아지에 對한 泄瀉發生 狀況과 이들로부터 分離된 大腸菌의 pilus 分布를 MRHA test로 調査하였고 pilus 精製백신 開發의 基礎試驗으로 pilus 分離精製法 選抜試驗을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 調査한 445頭의 송아지 中 泄瀉發生이 104頭로서 發生率은 23.3%였다.
2. 分離大腸菌 238株中 K99 陽性菌(馬血球凝集)은 73株(30.6%), F41 등의 pilus 陽性菌(기니피赤血球凝集)은 79株(33.1%)였다.
3. Minca medium이 pilus 生成에 가장 우수하였다.
4. Pilus 分離精製에는 菌을 PBS에 浮游시켜 60°C 20分 熱處理 方法이 가장 좋았다.
5. SDS-PAGE에 의해 分離精製된 K99 pilus의 分子量(M. W)은 18,500, F41은 29,500으로 確認되었다.

### 參 考 文 獻

1. Acres, S. D., Laing, C. J., Saundders, J. R. and Radostits, O. M.: Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves. Can. J. Comp. (1975) 39:116.
2. Ashwell, G.: Colorimetric analysis of sugars. Methods Enzymol. (1975) 3:73.

3. Burrows, M.R., Sellwoods, R. and Gibbons, R.A.: Hemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. (1976) 96:269.
4. Cowan, S.T.: Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. 2nd. ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge. (1974) p.245.
5. Davidson, J.N. and Hirsch, D.C.: Use of the K88 antigen for *in vivo* bacterial competition with porcine strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. immun. (1975) 12:134.
6. De Graaf, F.K. and Roorda, I.: Production, Purifications and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. Infect. Immun. (1982) 36:751.
7. De Graaf, F.K., Klemm, P. and Gastra, W.: Purification, characterization and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of *Escherichia coli*. Infect. Immun. (1981) 33:877.
8. De Graaf, F.K., Klaasen-Boor, P. and van Heer, J.E.: Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. Infect. Immun. (1980) 30:125.
9. De Graaf, F.K., Wientjes, F.B. and Klaasen-Boor, P.: Production of K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen groups O<sub>8</sub>, O<sub>9</sub>, O<sub>26</sub>, and O<sub>101</sub> grown at different conditions. Infect. Immun. (1980) 27:216.
10. Duguid, J.P., Clegg, S. and Wilson, M.I.: The fimbrial and nonfimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. (1979) 12:213.
11. Edward, P.R. and Ewing, W.H.: Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota. (1972).
12. Evans, D.G., Satterwhite, T.K., Evans, D.J. and Dupont, H.L.: Differences in serological responses and excretion patterns of volunteers challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* with and without the colonization factor antigen. Infect. Immun. (1978) 19:883.
13. Evans, D.G., Evans, Jr. D.J., Clegg, S. and Pauley, J.A.: Purification and Characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. (1979) 25:738.
14. Evans, D.G. and Evans, Jr. D.J.: New surface associated heatlabile colonization factor antigen (CFA/II) Produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O<sub>6</sub> and O<sub>8</sub>. Infect. Immun. (1978) 21:638.
15. Evans, D.G., Evans, Jr. D.J., Tjoa, W.S. and Dupont, H.L.: Detection and Characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun. (1978) 19:727.
16. Gaastra, W. and De Graaf, F.D.: Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. (1982) 46:129.
17. Gaastra, W., Klemm, P., Walker, J.M. and De Graaf, F.K.: K88 fimbrial proteins: amino and carboxyl terminal sequences of intact proteins and cyanogen bromide fragment. FEMS Microbiol. Lett. (1979) 6:15.
18. Guinee, P.A.M. and Jansen, W.H.: Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin: a comparative study. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A (1979) 243:245.
19. Guinee, P.A.A., VeldKamp, J. and Hansen, W.H.: Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. (1977) 15:676.
20. Guinee, P.A.M. and Jansen, W.H.: and Agterberg, C.M.: Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect. Immun. (1976) 13:1369.
21. Hames, B.D. and Rickwood, D.: Gel electrophoresis of protein. IRL press Limited, Oxford and Washington DC. (1981).
22. Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E.: Chemical analysis of microbial. Cells. (1971) p. 209.
23. Isaacson, R.E.: Factors affecting expression of

- the *Escherichia coli* pilus K99. Infect. Immun. (1980) 28:190.
24. Isaacson, R.E., Moon, H.W. and Schneider, R.A.: Distribution and virulence of *Escherichia coli* in the small intestines of calves with and without diarrhea. Am. J. Vet. Res. (1978) 39: 1750.
  25. Isaacson, R.E.: K99 surface antigen of *Escherichia coli*. Infect. Immun. (1977) 15:272.
  26. Levine, M.M., Ristaino, P., Sack, R.B., Kaper, J.B., Ørskov, F. and Ørskov, I.: Colonization factor antigens I and II and type 1 Somatic pili in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. (1983) 39:889.
  27. Meyers, L.L. and Guinee, P.A.M.: Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. Infect. Immun. (1976) 13:1117.
  28. Moon, H.W., Isaacson, R.E. and Pohlenz, J.: Mechanism of association of enterotoxigenic *Escherichia coli* with intestinal epithelium. Amer. J. Clin. Nutr. (1979) 32:1119.
  29. Moon, H.W., Nagy, B., Isaacson, R.E. and Ørskov, I.: Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99 enterotoxigenic *Escherichia coli* from calves and pigs. Infect. Immun. (1977) 15:614.
  30. Moon, H.W., Whipps, S.C. and Skartvedt, S.M.: Etiologic diagnosis of diarrhea diseases of calves; frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen production by *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res. (1976) 37:1025.
  31. Morris, J.A.: *Escherichia coli* fimbrial adhesins. Pig News and Information(1983) 4:19.
  32. Morris, J.A., Thorns, C.J., Scott, A.C., Sojka, W.J. and Wells, G.A.H.: Adhesion *in vitro* and *in vivo* associated with an adhesive antigen(F41) produced by a K99<sup>-</sup> mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. Infect. Immun. (1982) 36:1146.
  33. Morris, J.A., Ihorns, C.J. and Sojka, W.J.: Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. J. Gen. Microbiol (1980) 118:107.
  34. Ofek, I. and Beachery, E.H.: Bacterial adherence. Adv. Intern. Med. (1980) 25:503.
  35. Ørskov, I. and Ørskov, F.: Serology of *Escherichia coli* fimbriae. Prog. Allergy(1983) 33:80.
  36. Ørskov, I., Ørskov, E., Smith, H.W. and Sojka, W.J.: The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, Previously called "Kco" possessed by calf and lamb enterotoxigenic strains. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. (1975) 88:31.
  37. Smith, H.W. and Linggood, M.A.: Observations on the pathogenic properties of the K88 hly and ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. J. Med. Microbiol. (1971) 4:467.
-