

Mannose-resistant Hemagglutination(MRHA) 및 Colonization Factor Antigen I(CFA I)을 표현하는 대장균의 장관내 존재와 설사증 발현과의 관계

한양대학교 의과대학 미생물학교실

노승현 · 김경희 · 조양자 · 서인수

= Abstract =

Gastrointestinal Carriage of *Escherichia coli* with Hemagglutination Activity and Colonization Factor Antigen I and its Relation to Diarrhea

Sung-Hyun Ro, Kyung-Hee Kim, Yang-Ja Cho and Inn-Soo Suh

Department of Microbiology, College of Medicine, Hanyang University

Colonization factor antigen I(CFA I) has been shown to be one of several virulence factors that promote attachment of enterotoxigenic *E. coli*(ETEC) to small intestinal epithelial cells of humans. The ability of ETEC to produce mannose-resistant hemagglutination(MRHA) of human blood group A has been used to detect CFA I. To determine gastrointestinal carriage in Korean children of *E. coli* with MRHA and CFA I, 116 strains of *E. coli* from diarrheal children admitted to Hanyang University Hospital were examined for MRHA of human erythrocytes and the presence of CFA I. Of 45 ETEC strains, 18(40%) gave a positive MRHA(MRHA⁺) and eight(18%) were positive for CFA I(CFA I⁺). ETEC with CFA I were all heat-stable enterotoxin(ST) producers and two of these strains were of serogroups O₁₅. Of 17 classic enteropathogenic *E. coli*(EPEC), 7(41%) were MRHA⁺ but all were negative for CFA I(CFA I⁻). Of 30 enteroadherent *E. coli*(EAEC) strains, 11(37%) were MRHA⁺ and one was CFA I⁺. Of 24 nonpathogenic *E. coli*, 4(17%) were MRHA⁺ but all were CFA I⁻. It was shown that MRHA was common in all strains of *E. coli*, CFA I was limited only to ST producing ETEC and EAEC; although MRHA is a useful screening procedure, serologic tests seem to be necessary to confirm CFA I production. CFA I was associated with a lower proportion of ETEC isolates in Korea than has been reported for other locations.

Key Words: Mannose-resistant hemagglutination(MRHA), Colonization factor antigen I(CFA I).

서 론

장독성 대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)이 장점막에 부착되어 집락울 형성할 수 있는 능력은 세균세포 표면에 있는 단백질 편모(fimbriae)와 관계가 깊으며¹⁾, 이 편모는 D-mannose가 존재할 때 여러 종의 적혈구를 응집시킨다.

ETEC의 특징으로 알려진 이러한 세균성 표면 편모(surface fimbriae)는 동물분리주에서 처음으로 보고 되었으며, 세균이 소장에 집락울 형성케 하여 발병을 돕는 역할을 하므로 독력인자에 해당된다²⁾.

이 편모가 사람에게서 분리되는 ETEC에서도 확인 되었으며, 이를 colonization factor antigen(CFA) I 및 II라고 한다^{10, 15)}. CFA I은 사람 및 소의 적혈구를 응집시키는 mannose-resistant hemagglutination(MRHA)을 일으키므로¹¹⁾ 쉽게 관찰될 수 있으며, 내열성 장독소(heat-stable enterotoxin, ST) 산생 유전자와 함께 같은 plasmid 안에 존재한다^{11, 25, 26)} 고 한다. CFA II는 소 적혈구에 대하여 MRHA를 일으키지만 사람 적혈구에서는 반응을 나타내지 않으며¹⁰⁾, 이 인자 역시 plasmid에 의해 조절된다고 알려져 있다¹⁰⁾.

현재 우리나라에서도 MRHA 양성 및 CFA I을

보유하는 대장균에 의하여 유발되는 소아설사의 빈도가 높으리라 추정되고 있으나, 이에 대한 보고가 아직 없으므로 저자는 우리나라 소아설사증에서 분리된 병원성 대장균의 MRHA 및 CFA I의 표현 pattern 그리고 이들과 혈청형과의 관계를 살펴봄으로서 CFA I의 분포 및 그의 병원적 역할을 규명하고자 실험하였다.

재료 및 방법

1. 대 상

환자균은 1984년 3월부터 12개월간 한양대학병원에 입원한 만 2세미만의 소아설사증 환자 100명으로부터 입원 당일 세균검사를 위해 의뢰된 대변 검체물을 검사직전까지 -70°C 에 보관하여 검사물로 사용하였으며, 설사증 이외의 질환을 동반한 검사물은 제외하였다. 같은 방법으로 나이 및 성별의 분포가 유사한 건강대조군 44명으로 부터도 대변검체물을 채취하여 사용하였다.

2. 균분리

대변검체물 1g(또는 대변액 1ml)을 MacConkey agar(MAC)에 도말하여 일주야 배양한 뒤 대장균으로 추정되는 균집락을 MAC에 순수배양 하여, Analytic Profile Index 20 Enterobacteriaceae(API Systems, S.A., LaBalme les Grottes, France) kit로 동정하였다.

3. 대장균 장독소 검사

장독소 산생능 시험은 내열성 장독소(heat-stable enterotoxin, ST)는 젓먹이 mouse의 위내 투여법⁷⁾, 이열성 장독소(heat-labile enterotoxin, LT)는 Y₁ adrenal cell 검사법¹⁰⁾으로 관찰하였다.

4. Colonization Factor Antigen I(CFA I)검사

대장균으로 동정된 균주는 모두 5 집락씩을 CFA agar(pH 7.4, 1% Casamino acids, 0.15% yeast extracts, 0.005% MgSO₄, 0.0005% MnCl₂, 2% agar)에 배양하여 Evans 등의 방법¹¹⁾에 따라 실시하였다.

1) Mannose-resistant hemagglutination(MRHA)

A형 사람 혈액 9ml을 3.8% citric acid 1ml가 담긴 멸균용기에 넣어 4°C 에서 1일 방치한 뒤 phosphate buffer solution(PBS, pH 7.2)으로 3회 세척하였다. 그후 PBS로 1:4 희석한 뒤 다시 1% D-mannose 용액으로 1:4 더 희석하여 앞서 준비한 균과 slide 상에서 응집반응을 시행하였다.

2) CFA I 항혈청 제작

(1) CFA I 표준균주의 면역: CFA I 양성 표준균주인 H10407(CFAI⁺, ST⁺, LT⁺)을 peptone agar plate에 접종하여 37°C 에서 18시간 배양한 뒤 PBS로 균을 수집한 후, 3회 세척하여 균수가 $10^8/\text{ml}$ 정도 되게 희석하였다. 그뒤 0.5% 되도록 formalin(Tedia Company, Inc. Ohio, U.S.A.)을 첨가한 다음 4°C 에서 48시간 방치하였다. 그후 New Zealand 흰토끼(체중 3kg)에 앞서 준비한 균액 0.1ml(균수 약 $10^8/\text{ml}$)을 정맥주사했다. 3일 후부터는 균수가 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 되는 양을 3일 간격으로 5회 더 정맥주사한 다음 마지막주사 14일 후에 토끼의 경동맥으로부터 전채혈하여 혈액을 분리하였다^{11, 15)}.

(2) CFA I 음성 표준균주로 흡수: CFA I 음성 표준균주인 H10407 P(CFA I⁻, ST⁻, LT⁻)를 CFA agar에 접종하여 37°C 에서 18시간 배양시킨 뒤 균액을 모아 121°C , 15lb에서 1시간 동안 고압멸균한 후 3,000rpm으로 20분 원심하여 균을 농축하였다. 그뒤 이 농축액 1ml를 anti-H10407 serum 10ml에 첨가하여 혼합한 뒤 56°C 에서 30분 방치한 후 10,000rpm으로 20분 원심하여 항혈청을 다시 회수하였다. 이와 같은 방법을 3회 시행한 뒤 생균 H10407P로 다시 3번 흡수하였다^{11, 15)}.

위와 같이 제작된 항혈청으로 앞서 언급한 CFA agar에 배양시킨 균주와 slide 상에서 응집반응을 실시하였다.

5. 항혈청별 검사

CFA I 양성 균주와 혈청형과의 상관관계를 알아보기 위해 Difco 회사의 진단용 면역혈청인 O₆, O₆, O₁₅, O_{18a}, O_{18c}:K₇₇(B₂₁), O_{20a}, O_{20b}:K₄₄(B), O₂₅, O₂₆:K₄₆(B₄), O₂₈:K₇₃(B₁₃), O₄₄:K₇₄, O₆₅:K₅₉(B₁), O₇₆, O_{86a}:K₆₁(B₇), O₁₁₁:K₅₄(B₁), O_{112a}, O_{122c}:K₄₆(B₁₄), O₁₂₄:K₇₂(B₁₇), O₁₂₅:K₇₀(B₁₅), O₁₂₆:K₇₁(B₁₆), O_{127a}:K₆₃(B₁), O_{128a}, O_{128a.c}, O₁₂₈:K₆₇(B₁₂)를 사용하여 O:K형별은 슬라이드 응집반응으로, O형별은 시험관내 응집반응으로 실시하였다¹⁶⁾.

성 적

Mannose-resistant hemagglutination(MRHA) 양성 대장균주가 검출된 경우는 설사환자군 100명중 34명(34%)이었고, 건강대조군에서는 44명중 7명(16%)이었으며($P < 0.05$), colonization factor antigen I(CFA I)이 표현되는 대장균주가 검출된 경우는 설사환자군 100명중 9명(9%)이었으나, 대조군에서는 44명 중에서 전혀 없었던 바($P < 0.05$) MRHA 및 CFA I 양성 대장균의 검출은 각각 환자군

Table 1. Prevalence of mannose-resistant hemagglutination(MRHA)-and colonization factor antigen I(CFA I)-positive *E. coli* in Korean children with and without diarrhea

Population	No. of patients with <i>E. coli</i> positive/total examined(%)	
	MRHA for human erythrocytes	CFA I
Patients with diarrhea	34/100(34)*	9/100(9)**
Well controls	7/ 44(16)*	0/ 44(0)**

* χ^2 analysis: 4.864, $P < 0.05$, **Fisher's exact test: 4.224, $P < 0.05$

Table 2. MRHA and CFA I in pathogenic and nonpathogenic *E. coli* strains isolated from Korean children with diarrhea

<i>E. coli</i> strains*(No. tested)	MRHA for human erythrocytes(%)	CFA I (%)
ETEC(45)	18(40.0)	8(17.8)
ST(41)	17(41.5)	8(19.5)
LT(3)	0(0.0)	0(0.0)
ST/LT(1)	0(0.0)	0(0.0)
Classic EPEC(17)	7(41.2)	0(0.0)
EAEC(30)	11(36.7)	1(3.3)
Nonpathogenic EC(24)	4(16.7)	0(0.0)

*ETEC=enterotoxigenic *E. coli*; EPEC=enteropathogenic *E. coli*; and EAEC=enteroadherent *E. coli*.

Table 3. Correlation of serogroups with MRHA or CFA I

Serogroup	No. of strains	MRHA*	CFA I
O _{1a} O _{1b}	2	1	—
O ₆	1	—	—
O ₇	2	—	—
O ₈	1	1	—
O ₁₁	3	—	—
O _{11a} O _{11c} :K ₇₇	3	1	—
O _{11a} O _{11b}	1	—	—
O _{20a} O ₂₁₀ :K ₉₄	2	—	—
O ₂₅	8	1	2
O ₂₆ :K ₆₀	2	—	—
O ₂₈ :K ₇₃	1	—	—
O ₄₄ :K ₇₄	1	—	—
O _{66a} :K ₆₁	3	1	—
O ₁₁₄ :K ₉₀	1	—	—
O ₁₁₉ :K ₆₉	3	—	—
O ₁₂₄ :K ₇₂	2	1	—
O ₁₂₅ :K ₇₀	3	2	—
O ₁₂₆ :K ₇₁	2	1	—
O _{127a} :K ₆₃	1	—	—
O _{128a} O _{128ac}	1	1	—
O ₁₃₁ :K ₇₈	7	—	—

*Positive for type A human erythrocytes.

에서 전장군보다 통계적으로 유의하게 높았다(표 1).

병원기전별 대장균의 MRHA 및 CFA I pattern 은 ETEC 45균주⁹⁾, classic EPEC 17균주⁹⁾, EAEC 30균주¹¹⁾ 및 비병원성 대장균 24주를 대상으로 하여 ETEC 40%, ETEC 41.2%, EAEC 36.2%에서 각각 MRHA 양성율 나타냈으나, 비병원성 대장균에서는 16.7%를 나타내어 병원성 대장균에서 MRHA 양성율이 높았다. 그리고 ETEC에서는 ST 산생균주에서만 MRHA 및 CFA I 양성 그리고 EAEC 1균주가 CFA I 양성이었다(표 2).

혈청형별 대장균 37균주의 MRHA 및 CFA I 과의 관계(표 3)는 O₁₂₅:K₇₀ 형군 2주, 그리고 O_{1a}O_{1b}, O₆, O_{11a}O_{11c}:K₇₇, O₂₅, O_{66a}:K₆₁, O₁₂₄:K₇₂, O₁₂₆:K₇₁, O_{128a}O_{128ac} 형군 각 1주가 MRHA 양성을 나타냈으며, O₂₅형군 2주가 CFA I 을 표현하였다.

고 찰

장독성 대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)이 영아 및 소아설사의 주요 원인균으로 보고^{14, 16)}되면서, 소장에서의 집락형성과 부착에 대한 숙주 특이성이 설사발현에 중요한 역할을 할 것으로 제시되었다^{15, 19)}. 대장균의 장내 부착에 관여하는 섬모(fimbriae, pili)들²⁰⁾로는 somatic 또는 common fimbriae로 알려진 type 1 fimbriae⁹⁾, 사람의 요로 감염에 관계되는 Fimbriae²⁰⁾, 새끼돼지에서 발견된 K₈₈ Antigen²³⁾, 소, 돼지 및 양등의 가축설사와 관련된 K₉₉ Antigen²¹⁾, F₄₁ antigen⁸⁾, 성인돼지 및

신생패지와 관련되는 987P antigen²², 그리고 사람에서 분리되는 대장균에 특이적인 colonization factor antigen(CFA) I¹⁶ 및 II¹⁰ 등이 알려지고 있다. 이 중 CFA I은 1975년 Evan 등¹⁵에 의해 사람의 상부 소장관내 brush border에 대장균이 부착하는데 관여하는 fimbriae로 보고되었고, 그 후 CFA I과는 면역학적으로 다르며, 응집반응 형태도 다른 CFA II가 역시 Evans 등¹⁰에 의해 발견되었다. 1982년 Smith¹⁷는 CS₁, CS₂, CS₃라는 3개의 coli surface antigen이 CFA II를 구성하고 있음을 보고하였다.

대장균의 장관세포 부착능을 검사하는 시험관내 방법으로는 mannose-resistant hemagglutination(MRHA)¹¹이 있는데 이때 사용되는 혈구는 부착능에 관여하는 인자에 따라 다르다. 즉, K₈₈ antigen을 갖고 있는 대장균은 기니아-펩 적혈구에 대해 MRHA를 나타내며¹⁰, K₈₈ antigen을 갖고 있는 대장균은 면양 적혈구⁴에, 그리고 CFA I을 보유한 대장균은 사람의 A형 적혈구에 대해¹¹ MRHA를 나타낸다고 하였다. 그러나 MRHA가 screening 검사법으로 유용하다 할지라도 뇌척수액, 혈액등의 장관 이외에서 분리되는 대장균은 CFA I이 없을 때에도 MRHA를 나타내기도 하므로 CFA 발현을 확인하려면 anti-CFA I을 사용한 혈청학적 검사가 필요하다^{6, 8, 13}. 본 연구에서는 환자군 100명과 건강군 44명중 각각 34명과 4명 분리주에서 MRHA 양성을 나타냈으나, CFA I은 환자군 7명에서의 분리주에서만 관찰되었을 뿐 건강군 분리주에서는 전혀 관찰되지 않음으로서 실사증에서의 CFA I의 병원적 역할을 제시하였다. 그리고 MRHA시험은 CFA I을 관찰하는 예비적 방법으로서 그 특이성이 낮은 것으로 생각된다. 따라서 위의 성적등으로 미루어 MRHA를 일으킬 수 있는 능력이 곧 CFA I의 존재를 의미하는 것이 아니며, 또는 MRHA를 나타나게 하는 인자는 ETEC에만 제한되어 존재하는 것 아닌 것으로 생각된다.

CFA I을 보유하고 있는 ETEC는 전세계적으로 분포하고 있다고 알려져 있다²⁰. 1978년 Mexico에서 성인을 대상으로 한 연구¹²에 의하며 ETEC의 86%가 CFA I을 표현하고 있다고 밝히고 있으나 14개국에 걸쳐 조사된 보고¹⁷에 따르면 단지 7%에서만 CFA J을 표현하고 있다. 본 연구에서 ETEL가 CFA I을 표현하는율은 17.8%로 나타나 세계적인 평균치 이상을 나타내고 있으나 비율면에선 그리 높은 편이 아니었다.

CFA I과 장독소와의 유전학적 상관관계를 살펴보면 CFA I 양성표준균주인 H10407에는 60Md,

42Md 및 3.7Md의 3개 plasmid가 있으나 CFA I 음성표준균주인 H10407 P에는 60Md plasmid가 없는 것으로 보고¹⁵되었고, 그 후 여러 균주의 O₇₈형 ETEC균주를 조사한 결과 CFA I 및 ST 동시산생과 56~61Md plasmid 존재와는 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다²⁰. 또한 Smith 등²⁰은 plasmid 상에서 넓게 떨어져 있는 6K_{6p} 및 2.1K_{6p}의 2개 지역이 CFA I 발현에 관계하며, ST 산생에 관여하는 유전자는 이들 지역중의 어느 하나와 밀접하게 위치해 있는 것으로 보고하였다.

본 연구에서 CFA I은 ST 산생균주의 14.6%에서 관찰되었으며, LT 산생균주에서는 전혀 나타나지 않았다. 이렇게 ST 산생과 CFA I과의 일치율이 그리 높지 않은 이유는 첫째로 시험균주의 계대배양에 따른 plasmid의 소실, 둘째로 지역 차이에 따른 균주의 성질때문인 아닌가 추측되며, 한편으로는 ETEC의 부착에 있어서 CFA I이 아닌 다른 어떤 기전이 관여할지도 모른다는 가정을 낳게 한다. 실지로 이번 실험에 사용된 ETEC균주중 CFA I 및 HE_p-2 cell 부착을 비롯한 한종류 이상의 부착능을 표현한 균주는 전체 ETEC균주의 60%(unpublished data)이었다. 따라서 한국 소아설사에서 분리된 ELEC를 대상으로 부착능에 대한 유전자 레벨에서의 연구가 계속 필요하리라고 본다.

대장균의 O혈청형중 O₁₅, O₂₅, O₃₃, O₇₈, O₁₇₈ 등이 CFA I과 관련이 된다고 알려져 있으나²⁰. 본 연구에서는 이 중 O₇₈만이 CFA I과 관련됨을 확인할 수 있었다. 그러나 혈청형 및 CFA와의 관계는 사용혈청형의 종류를 더욱 확대하여 검토되어야 할 것으로 생각된다. MRHA를 나타냈던 ETEC O₁균주, O_{122a2}O_{122ac} 1균주, 그리고 O_{16a}O_{16c}:K₇₇ 1균주에서는 각각 CFA 항혈청에 반응을 나타내지 않고 있어서 이들 균주의 부착에도 앞서 지적한 바 있는 CFA I이 아닌 다른 인자²¹가 개입하고 있을 가능성을 시사해 주고 있다.

지금까지 CFA screening 검사로 사용되고 있는 MRHA법은 본 연구에서 나타났듯이 CFA I과 관련성이 미약하고, 실험자의 주관이 개입되는 관계로 CFA I을 위한 예비 검사법으로는 그 유용성이 작은 것으로 판단된다. 따라서 병원성 대장균의 장관내 부착 및 증식기전을 확인할 수 있는 보다 손쉬운 방법이 개발되어야 할 것으로 생각된다.

끝으로 ETEC의 부착능에 대한 유전자 연구는 CFA 등의 부착기전에 대한 해석을 가능케해 줄 뿐만 아니라 한국소아설사에 있어서 ETEC등의 병원적 역할에 대해서도 더욱 확실케 규명해 줄 것으로 보이며, 나아가 백신개발까지 가능케 해주리라 사

료된다.

결 론

1984년 3월부터 12개월간 한양대학 병원에 설사 증으로 입원한 만 2세미만의 소아설사환자 100명과 같은 연령층의 건강소아 44명으로부터 분리된 대장균을 대상으로 mannose-resistant hemagglutination(MRHA) 및 colonization factor antigen I (CFA I) 검사를 시행하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 설사환자 및 건강소아의 MRHA 양성 대장균의 검출율은 설사환자군에서는 34%, 건강군에서는 16%로서 환자군에서 통계적으로 유의하게 높았다 ($P < 0.05$).

2. CFA I을 보유하는 대장균의 검출율은 설사환자군에서만 7%를 나타내어 통계적으로 환자군에서 유의하게 높았다 ($P < 0.05$).

3. 환자군분리 대장균의 MRHA 양성율은 ETEC 40%, EPEC 41.2%, EAEC 36.7%, 그리고 비병원성 대장균은 16.7%로서 병원성 대장균에서 높았으며, ETEC의 MRHA 양성반응은 ST 산생주에서만 관찰되었다.

4. 환자군분리 대장균의 CFA I 분포율은 ETEC와 EAEC에서 각각 17.8%와 3.3%이었으나 EPEC, 및 비병원성 대장균에서는 분포하지 않았으며, ETEC의 CFA I 분포는 ST 산생주에서만 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 한국소아 설사증에 있어서 CFA I과 ETEC의 연관율은 다른 지역에서 보고된 성적에 비하여 낮은 일치율을 나타내고 있으나, CFA I과 ST 산생 대장균주와의 상관관계는 매우 높은 특이도를 나타내어 CFA I의 ST 산생 균주에서의 병원적 역할을 제시하여 주었다.

참 고 문 헌

- 1) 김정목, 김경희, 조양자, 서인수: 우리나라 소아 설사에 있어서의 enteroadherent *Escherichia coli*의 병원적역할. 대한미생물학회지, **22**: 1987.
- 2) 안병수, 김경희, 한왕수, 서인수: 소아 설사증에서 분리한 대장균 장독소의 병원적역할. 대한미생물학회지, **22**: 1987.
- 3) 양안승, 김경희, 한왕수, 서인수: 장병원성 대장균(enteropathogenic *Escherichia coli*)의 소아설사 원인균으로서의 재평가. 대한미생물학

회지, **22**: 1987.

- 4) Burrows MR, Sellwood R and Gibbons RA: Hemagglutinating and adhesive properties associated with the K_{86} antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **96**: 269-275, 1976.
- 5) Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM and Rowe B: Mannose resistant hemagglutination of human erythrocytes by strains of *Escherichia coli* from extraintestinal sources: lack of correlation with colonization factor antigen(CFA /I). *FEMS. Microbiol. Lett.* **6**: 41-44, 1979.
- 6) Cravioto A, Scotland SM and Rowe B: Hemagglutination activity and colonization factor antigen I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.* **36**: 189-197, 1982.
- 7) Dean AG, Ching Y-C, Williams RG and Harden LB: Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using infant mice; application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* **125** 4: 407-411, 1972.
- 8) de Graaf FK and Roorda I: Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F 41 isolated from the calf and enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.* **36**: 751-758, 1982.
- 9) Dugid JP, Clegg S and Wilson MI: The fimbrial and nonfimbrial hemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **12**: 213-227, 1979.
- 10) Evans DG and Evans DJ: New surface-associated heat-labile colonization factor-antigen (CFA II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O_4 and O_6 . *Infect. Immun.* **21**: 638-647, 1978.
- 11) Evans DG, Evans DJ and Tjoa W: Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.* **18**: 330-337, 1977.
- 12) Evans DG, Evans DJ Jr., Tjoa WS and Dupont HL: Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults diarrhea. *In-*

- fect. Immun.* **19**:727-736, 1978.
- 13) Evans DJ, Evans DG, Young LS and Pitt J: Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven hemagglutination types. *J. Clin. Microbiol.* **12**:235-242, 1980.
 - 14) Evans DG, Olarte J, Dupont HL, Evans DJ Jr, Galindo E, Portnoy BL and Conklin RH: Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico city. *J. Pediatr.* **91**:65-68, 1977.
 - 15) Evans DG, Silver RP, Evans DJ Jr, Chase DG and Gorbach SL: Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* **12**:656-667, 1975.
 - 16) Ewing WH and Martin WJ: Enterobacteriaceae. In Lennette EH, Spaulding EH and Truant JP(ed.), Manual of clinical bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1974.
 - 17) Gross RJ, Cravioto A, Scotland SM, Cheasty T and Rowe B: The occurrence of colonization factor(CF) in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **3**:231-233, 1978.
 - 18) Guerrant RL, Moore RA, Kirchenfeld and Sande MA: Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *N. Engl. J. Med.* **293**:567-573, 1975.
 - 19) Jones GW and Rutter JM: Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.* **6**:918-927, 1972.
 - 20) Klemm P: Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* **7**:321-340, 1985.
 - 21) McConnell MM, Smith HR, Willshaw GA, Field AM and Rowe B: Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison of their properties. *Infect. Immun.* **32**:927-936, 1981.
 - 22) Nagy B, Moon HW and Isaacson RE: Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K₈₈ antigen and by some capsular mutants. *Infect. Immun.* **13**:1214-1220, 1976.
 - 23) Ørskov I, Ørskov F, Sojka WT and Leach JM: Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and L antigens in strains from diseased swine. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica.* **53**:404-422, 1961.
 - 24) Penaranda ME, Mann MB, Evans DG and Evans DJ: Transfer of an ST: LT: CFA/II plasmid in to *Escherichia coli* K-12 strain RR, by cotransformation with PSC 301 plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**:251-254, 1980.
 - 25) Reis MH, Affonso MHT, Trabulsi LR, Mazaitis AJ and Mass WK: Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O_{111ac}H₁₂. *Infect. Immun.* **290**:140-143, 1980.
 - 26) Sack DA and Sack RB: Test enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y, adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.* **11**:334-336, 1975.
 - 27) Smith CJ: Two mannose-resistant hemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O₄:K₁₁:H₁₁ or H-isolated from travellers, and infantile diarrhea. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2081-2096, 1982.
 - 28) Smith HR, Cravioto A, Willshaw GA, McConnell MM, Scotland SM, Gross RJ and Rowe B: A plasmid coding for production of colonization factor antigen I and heat stable enterotoxin in strains of *Escherichia coli* of serogroup O₇. *FEMS Microbiol. Lett.* **6**:255-260, 1979.
 - 29) Smith HR, Willshaw GA and Rowe B: Mapping of plasmid, coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **149**:264-275, 1982.
 - 30) Smith HW and Linggood MA: Observation on the pathogenic properties of the K₈₈, Hly and ENT plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. *J. Med. Microbiol.* **4**:467-485, 1971.
 - 31) Smith HW and Linggood MA: Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by

atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.* **5** : 240-243, 1972.

32) Thomas LV, Cravioto, A, Scotland SM and Rowe B: New fimbrial antigenic type(E8775) which may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect. Immun.* **35** :1119-1124, 1982.