

# 大肠杆菌肠毒素研究进展

鲍行豪 罗海波

(浙江省卫生防疫站, 杭州) (浙江医科大学, 杭州)

关于大肠杆菌在肠道内的致病性问题,早在四十年代便受到各国学者的普遍重视,并把那些引起婴儿腹泻、具有特殊血清型别的大肠杆菌称为致病性大肠杆菌(英文缩写为 EEC 或 EPEC),或称为特型大肠杆菌。其中较常见的有 O<sub>26</sub>、O<sub>55</sub>、O<sub>86</sub>、O<sub>111</sub>、O<sub>119</sub>、O<sub>125</sub>、O<sub>126</sub>、O<sub>127</sub> 和 O<sub>128</sub> 等数十型。七十年代 Du Pont 等发现,自腹泻的侵越美军中检出的大肠杆菌,与上述致病性大肠杆菌的分型血清不发生凝集。该类大肠杆菌中,有些可产生肠毒素,在临床表现方面,引起类似霍乱的急性腹泻综合症;有些能侵袭肠壁上皮细胞,引起类似痢疾的临床症状<sup>[1]</sup>。Rudoy 等将能产生肠毒素的大肠杆菌称为产肠毒素性大肠杆菌(英文缩写为 ETEC),将能侵袭肠壁上皮细胞的称为侵袭性大肠杆菌(英文缩写为 EIEC)<sup>[2]</sup>。Goldschmidt 则将肠道内致病的大肠杆菌分为无毒株、产毒株和侵袭株三类<sup>[3]</sup>。1977 年 Rowe 提出的看法<sup>[4]</sup>与 Rudoy 和 Goldschmidt 的看法基本一致。他根据致病机理,将引起腹泻的大肠杆菌分为传统的致病性大肠杆菌(如 O<sub>26</sub>、O<sub>55</sub>、O<sub>86</sub>、O<sub>111</sub> 等)、侵袭性大肠杆菌(如 O<sub>124</sub>、O<sub>136</sub>、O<sub>144</sub>、O<sub>152</sub>)和产肠毒素性大肠杆菌(如 O<sub>6</sub>、O<sub>8</sub>、O<sub>23</sub>、O<sub>27</sub>、O<sub>43</sub>、O<sub>78</sub>、O<sub>101</sub>、O<sub>138</sub>、O<sub>147</sub>、O<sub>148</sub>、O<sub>149</sub>、O<sub>157</sub>、O<sub>159</sub>)。据 Rudoy、Park 等报告,某些菌株可同时产生肠毒素和具有侵袭力,如 O<sub>14</sub>:B<sub>20</sub><sup>[5]</sup>。

本文着重讨论对人类危害较大的产肠毒素性大肠杆菌。

## 大肠杆菌肠毒素的种类

大肠杆菌肠毒素是某些大肠杆菌在生长繁殖过程中释放出来的外毒素。它们存在于培养物上清液或无菌体的滤液中,根据对热的稳定情况,可分为以下几类:

### 一、耐热肠毒素(简称 ST)

100℃加热 20 分钟不被破坏,可透析,易分离,无抗原性。它能降低肠粘膜细胞的吸收作用,作用迅速而短暂,可立即引起家兔肠内容物的积蓄,约在 4—6 小时到达高峰。但这种毒素从肠管中被清除后,其毒性作用也随之消失,肠管功能恢复正常。它和霍乱弧菌

肠毒素无共同抗原关系<sup>[6]</sup>。

### 二、不耐热肠毒素(简称 LT)

85℃加热 30 分钟,或 100℃加热 20 分钟即被破坏,不能透析,也不易分离,有抗原性。此毒素可被酸、蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶和胰脂酶灭活,能被硫酸铵沉淀。它主要刺激肠腺以增强其分泌能力,作用缓慢而持久,可导致肠管中液体缓慢积蓄,一般在毒素作用 3 小时后开始积蓄,7—12 小时达高峰,至少可持续 18 小时,然后逐渐下降,但到 24 小时仍可保持一定水平。它与霍乱弧菌肠毒素有共同抗原关系<sup>[6-7]</sup>。

### 三、Vero 细胞毒素(简称 VT)

Konowalchuk 等报告,自某些大肠杆菌培养物滤液中,分离出与 ST 和 LT 不同的细胞毒素。该毒素对 Vero 细胞(非洲青猴肾细胞)有毒性作用,故称为 Vero 细胞毒素。它不耐热,98℃处理 15 分钟即被破坏,有抗原性,但其作用与 LT 有明显区别<sup>[8]</sup>。

### 四、血管渗透因子(简称 PF)

Evans 等报告,ETEC 尚可产生一种血管渗透因子。该因子不耐热,56℃处理 30 分钟即被破坏,不耐酸,有抗原性。主要增高家兔皮肤血管渗透性。它具有肠毒素的作用,可被相应的抗血清中和,并与霍乱弧菌肠毒素有共同的抗原关系<sup>[9]</sup>。

近几年大量资料证明,由 ETEC 引起的人和动物霍乱样腹泻,主要是 LT 的作用。Echeverria 等<sup>[10]</sup>报道,在美国,从非特异性腹泻儿童中分离 ETEC 的比率最高可达 83%;而在印度和越南由其引起的霍乱样腹泻病人更为严重。该作者系统研究了从世界各地收集的 13 株产肠毒素菌株,发现不同地区得到的菌株产肠毒素活性有差别。他认为菌株产肠毒素活性的变异,是引起腹泻严重程度的主要因素,需要进一步研究肠毒素产生的量与腹泻严重性之间的关系。

## 大肠杆菌肠毒素的分离、纯化及理化特性

### 一、大肠杆菌肠毒素的分离

Nalin 等将产肠毒素的大肠杆菌培养于含酪蛋白

氨基酸的液体培养基中, 35℃ 培养 48 小时后取离心上清液用 0.45 微米的微孔滤膜过滤, 再以硫酸铵沉淀, 再悬浮沉淀在相当原培养物 1/200 体积的生理盐水中, 经冷透析(4℃)除盐, 浓缩 100 倍即制成 LT<sup>[13]</sup>。Anderete 等报道了一种适宜于产生 ST 的合成培养基, 较用酪蛋白氨基酸为好, 仅培养 8 小时即可使毒素产量达最高峰<sup>[14]</sup>。

## 二、大肠杆菌肠毒素的纯化

一般与霍乱弧菌肠毒素纯化方法基本相同。可应用硫酸铵沉淀、超滤、浓缩、凝胶层析、亲和层析、离子交换、分子筛及高速离心等<sup>[12, 13]</sup>。Dafni 等采用与霍乱抗毒素亲和层析的方法纯化 LT, 所得产品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中出现单一沉淀线, 对家兔肠攀和 YI 肾上腺细胞有很高的肠毒素活性<sup>[14]</sup>。

表 1 大肠杆菌肠毒素与霍乱弧菌肠毒素的理化特性及生物学特性比较

特性	肠毒素种类	大肠杆菌肠毒素	霍乱弧菌肠毒素
分子量(沉降法)		102 000	82 000
沉降系数(S <sub>20,w</sub> ·10 <sup>13</sup> 秒)		5.4	5.54
分子量(SDS 电泳法)		102 000	56 000
等电点		6.9	6.6
脂类		<1%	<1%
己糖		<1%	<1%
耐热性		65℃处理 30 分钟失活	同左
耐酸性		pH 4.0 失活	pH 6.0 失活
抗原性		有	有
免疫原性		有	有
家兔肠攀液体积蓄最小毒量(微克)		4.75	0.2
家兔皮内试验活性(微克)		0.1	0.00006—0.001
猫心肌细胞试验活性(微克)		0.65	—
大白鼠副睾脂肪细胞法活性(微克)		—	0.014
小白鼠 YI 肾上腺细胞法活性(微克)		10	0.005
增加血管渗透的活性		无	有
乳鼠肠管膨胀活性		有	无

## 三、大肠杆菌肠毒素的理化特性和生物学特性

Finkelstein 等<sup>[15]</sup>用纯化的 LT 测定其理化性质及生物学特性, 发现圆盘电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳单一的多肽链分子量为 35 000—100 000, 用它进行豚鼠皮肤试验、中国地鼠卵巢细胞试验和家兔肠攀试验。均呈阳性反应。Dorner 等证实, 纯化的 LT, 其分子量为 102 000, 等电点为 6.9, 并能引起家兔和小猪的实验性腹泻, 小剂量(0.65 微克)能使猫心组织培养

破碎细胞中腺苷酸环化酶活性增高。纯化 LT 在 65℃ 处理 30 分钟可被灭活<sup>[14]</sup>。Gill 等发现, 多粘菌素 B 能激活鸽红细胞膜上的腺苷酸环化酶, 从而使混合培养中的大肠杆菌释放 LT。该活性部分的分子量约为 23 000—24 000, 并可被霍乱抗毒素抑制, 如再用 SDS 处理, 则可使其发生不可逆变性<sup>[16]</sup>, 因此, LT 的活性部分, 与霍乱弧菌肠毒素多肽 A<sub>1</sub> 相似。Rappaport 等发现, ETEC 的无菌体滤液经胰酶处理后, 其中 PF 活性可提高 4 倍, 而对小白鼠粘膜细胞刺激分泌能力可提高 10 倍以上, 但对家兔肠攀试验中液体积蓄反应无作用。该作者认为宿主的酶系统亦可激活 LT 的活性, 这对整个致病性的发展起到一定的作用<sup>[17]</sup>。另外, Wackmuth 等发现, 产生 ST 的大肠杆菌的复合抗药性可通过质粒传递, 抗药性的传递与肠毒素的产生有关, 且传递抗药因子的菌株中有 36% 能产生肠毒素<sup>[18]</sup>。

LT 与霍乱弧菌肠毒素的理化性质及生物学特性比较见表 1<sup>[19]</sup>。

## 大肠杆菌肠毒素和霍乱弧菌肠毒素的相互关系

大肠杆菌肠毒素与霍乱弧菌肠毒素有许多相似之处。Gyles 曾用免疫扩散试验进行过研究<sup>[20]</sup>。据 Evans 等报道, 毒素与抗毒素反应主要是 LT 成分所致, 不同血清型大肠杆菌的 LT 有共同的抗原决定簇<sup>[21]</sup>。Smith 等证实, 用已知生物学活性的 LT 制剂免疫动物, 通过用不同肠毒素进行中和试验测定免疫动物血清中的抗毒素, 发现一种血清型抗毒素与不同血清型大肠杆菌 LT 出现交叉反应。同时, 与霍乱弧菌肠毒素亦有免疫学上的关联, 即用 LT 免疫保护的动物可抵抗 LT 及霍乱弧菌肠毒素的攻击。但用后者免疫动物, 仅对同种肠毒素有保护作用<sup>[21]</sup>。Sack 等发现, 带有 LT 的 8 例病人中, 有 6 例可检出同型抗毒素, 而 6 例霍乱病人中亦有 5 例有大肠杆菌抗毒素, 证明这两种肠毒素之间有广泛的免疫学上的交叉反应<sup>[22]</sup>。同年, Gyles 指出 LT 可用霍乱弧菌抗毒素吸收除去, 而大肠杆菌抗毒素则对后者无中和作用; LT 抗毒素亦不被 ST 中和<sup>[20]</sup>。据 Singh 等报告, 在家兔肠攀试验中, LT 引起液体积蓄所需的最小量要比用霍乱弧菌肠毒素为高(见表 1)。在增加血管渗透及引起乳鼠肠管膨胀方面, 二者也不相同<sup>[23]</sup>(见表 1)。Finkelstein 等的研究表明, LT 的活性至少比霍乱弧菌肠毒素的低 100 倍<sup>[16]</sup>。Donta 报告这二种肠毒素可引起组织培养中肾上腺肿瘤细胞变形及产生类固醇<sup>[24]</sup>。Singh 等发现, 大肠杆菌 334 菌株的 LT 与不同型的大肠杆菌和霍乱弧菌的抗毒素可产生沉淀反应, 而霍乱弧菌 569B 菌株抗毒素亦能与大肠杆菌 334 菌株、10407 菌株的肠毒素起中和反应, 表明这二种肠毒素有共同的抗原决定簇。然而, 大肠杆菌

408-3 菌株与霍乱弧菌 569B 菌株的肠毒素与抗毒素之间不发生中和反应,可能二者缺乏共同的抗原决定簇。作者还进一步研究了这二种肠毒素对血浆葡萄糖和碱性磷酸酶的关系,发现把肠毒素注入家兔肠管中,并不使血浆葡萄糖和碱性磷酸酶活性增高,而静脉注射却可使后二者明显增高。这说明在小肠内不吸收肠毒素<sup>[23]</sup>。

## 大肠杆菌肠毒素的致病机理

Du Pont 等指出,引起腹泻的大肠杆菌中,能产生肠毒素者,其致病机理类似霍乱肠毒素;能侵袭肠壁上皮细胞者,则其致病机理如同痢疾杆菌<sup>[1]</sup>。Rowe 认为引起腹泻的三类大肠杆菌,它们的致病机理不同:传统的致病性大肠杆菌一般不产生肠毒素,亦无侵袭力,仅引起婴儿肠炎,其致病机理尚不清楚(Cautey 等根据家兔试验结果认为,可能是由于大肠杆菌粘附在肠壁细胞上,从而导致腹泻);侵袭性大肠杆菌侵害成人及婴儿,不产生肠毒素,其致病机理同痢疾杆菌;产肠毒素性大肠杆菌引起成人及婴儿腹泻,产生肠毒素(成人中可检出 LT 及 ST, 婴儿主要为 ST),其致病机理同霍乱弧菌,临床表现亦类似霍乱<sup>[3,24]</sup>。

Gorbach 等、Sheer 等、Evans 等先后证实, ETEC 借纤毛样表面抗原(为人类中产肠毒素性大肠杆菌的主要毒力因子,亦称固定因子抗原)固定于小肠上部,释放肠毒素、刺激肠腺上皮细胞与细胞膜上 GM<sub>1</sub> 受体结合,使细胞中腺苷酸环化酶活性增高,从而导致环状 AMP 水平增高,引起肠腺上皮细胞分泌机能亢进,造成大量水份及电解质在肠腔中积蓄,超过肠管再吸收能力而发生腹泻。恢复期 ETEC 在小肠中消失,定位于大肠,而大肠粘膜不受肠毒素作用,因此病人成为无症状带菌者<sup>[27-30]</sup>。Sheer 等指出,当大肠杆菌导致大量分泌时,小肠粘膜的分泌机能仍然完好,毒素并未增加肠粘膜对血浆蛋白的通透性,小肠仍保持血浆和肠腔液体之间电解质浓度差别的能力。组织学检查发现,除小肠腺体的杯状细胞分泌衰竭外,未见其它任何形态学改变。而且家兔肠攀试验证实,当受大肠杆菌肠毒素作用后,肠道对葡萄糖和甘氨酸的主动吸收作用降低,而在霍乱弧菌肠毒素作用后,该二种物质在肠道中的主动吸收作用不受影响。因此 Sheer 等认为,治疗霍乱患者可用口服葡萄糖和甘氨酸的电解质溶液来补充失水,而治疗大肠杆菌引起的腹泻患者,口服葡萄糖和电解质会导致肠腔渗透压增加、反而会加重腹泻<sup>[28]</sup>。

## 大肠杆菌肠毒素与大肠杆菌血清型别的关系

过去,根据流行病学与病原学调查,认为婴儿腹泻系由特殊血清型的大肠杆菌所引起。Gorbach 等发现,

29 例腹泻儿童中,仅从 9 例中分离到传统的致病性大肠杆菌(O<sub>15</sub>, O<sub>33</sub>, O<sub>86</sub> 2 株, O<sub>111</sub>, O<sub>119</sub>, O<sub>125</sub> 2 株),但有 24 株菌的无菌体滤液在家兔肠攀试验中能引起小肠积蓄液体及膨胀,证明为 ETEC。而 ETEC 与传统的致病性大肠杆菌抗血清发生凝集者仅占 27%<sup>[27]</sup>。Rudoy 等报道,在传统的致病性大肠杆菌中,除一株产肠毒素(O<sub>116</sub>:B<sub>16</sub>)外,其余的 ETEC 和 EIEC 均与传统致病性大肠杆菌的抗血清不发生凝集<sup>[2]</sup>。Goldschmidt 等自腹泻儿童体内分离出 48 株大肠杆菌,分别属于传统的致病性大肠杆菌的 9 个血清型,检查其产肠毒素性及侵袭力,发现仅 3 株菌产生 LT<sup>[27]</sup>。

Bettelheim 等指出,由动物体内分离的大肠杆菌,约有一半无法用传统的致病性大肠杆菌全套分型血清定型<sup>[21]</sup>。Rowe 研究表明,引起婴儿腹泻的 ETEC,不同于传统的致病性大肠杆菌的血清型<sup>[3]</sup>。Sack 等自食品中分离的 240 株大肠杆菌中,有 80% 能产生肠毒素,而不包括在传统的致病性大肠杆菌中。大桥成等综合各国资料发现,在 53 株产肠毒素的菌株中(大多产 LT,少数产 ST),大部分不属于传统的致病性大肠杆菌,而后者仅少数菌株产生肠毒素<sup>[11]</sup>。

综上所述,不难看出传统的血清型别与产肠毒素能力无关。因此,用传统的分型血清对引起腹泻的大肠杆菌进行分型以决定是否传统的致病性大肠杆菌,常造成误诊。必须进行动物试验及组织培养检查,以决定它们是否为 ETEC 或 EIEC。

## 大肠杆菌肠毒素的测定方法

七十年代以来,各国学者介绍了不少测定大肠杆菌肠毒素的方法,现简介如下:

### 一、LT 的测定方法

#### (一) 家兔肠攀试验<sup>[29]</sup>

用体重 2 公斤的家兔局部麻醉剖腹,在邻近肠攀间用外科丝线简单结扎肠段,每段注射大肠杆菌滤液(500 毫克/毫升)1 毫升,并用二个肠攀注射 PBS 作对照,然后关闭腹腔。6 小时后静脉注入苯巴比妥处死,打开腹腔测量每个肠攀内液体容量,并测量排空肠段的长度。以每厘米肠攀内液体的毫升数表示肠毒素作用的强度。

#### (二) YI 鼠肾上腺细胞组织培养法<sup>[33-35]</sup>

Donta 等和 Sack 等先后指出,LT 可引起小白鼠肾上腺细胞由扁形变成圆形,并可使其形成类固醇。这些变化与霍乱弧菌肠毒素引起的相似,而其它细菌的肠毒素或肠道致病菌不引起此变化。本试验与肠攀试验结果一致。Sack 认为这是一种快速、特异性高、临床实用的测定方法,且可测定微量(0.2 微克/毫升)的 LT。

### (三) 中国地鼠卵巢巢细胞试验<sup>[36]</sup>

中国地鼠卵巢巢细胞内环状 AMP 的浓度与其形态学变化有关, LT 和霍乱弧菌毒素一样,能刺激腺苷酸环化酶活力,故导致该种细胞变形。此法简单易行,并较肠攀试验敏感。在 37℃ 24 小时后观察结果,检测伸长、呈纺锤形及结节样突起的细胞,根据变形细胞与正常细胞的比率表示毒力大小。

### (四) 大白鼠空肠灌注法<sup>[37]</sup>

本法较敏感,即使肠毒素量少至毫微克/毫升水平,亦可测出。

### (五) Vero 细胞测定法<sup>[38]</sup>

LT 作用于 Vero 细胞,可提高腺苷酸环化酶活性,增加环化 AMP 含量,从而促进  $\Delta$ -4-3-酮类固醇的合成。上述变化均伴有细胞形态改变,因此本法可作为简单的诊断手段。此法较(二)、(三)两法简便,且较经济。

### (六) 被动免疫溶血试验<sup>[39]</sup>

由 LT 致敏的绵羊红细胞中,在加入特异性抗毒素及补体后,可出现被动免疫溶血。此法可作为体外检测 LT 的血清学方法。方法有足够的灵敏性和特异性。

### (七) 皮肤试验<sup>[7]</sup>

Evans 等将大肠杆菌 H-10407 菌株的无菌滤液 0.1 毫升注入家兔皮内,次日静脉注入 6 毫升的 Evans 蓝染料(溶于 0.85% 的 NaCl 溶液中),1—2 小时后将兔处死,测定局部硬结及蓝区大小。如局部皮肤小血管对染料的增加,则证明检测材料中含有 PF。Evans 认为本试验与家兔肠攀试验有同样的敏感性。

## 二、ST 的测定方法

乳鼠可广泛应用于检查 ST。方法是:取粗制培养滤液 0.1 毫升经口喂饲 1—3 日龄的瑞士 albino 乳鼠,4 小时后取出全部肠管称重,计算肠重与剩余尸体重量之比率。比率大于 0.09 者为阳性,小于 0.07 为阴性<sup>[40]</sup>。此法简便快速、且易重复。最近 Ceska<sup>[41]</sup> 推荐固体放射免疫电泳法来检测大肠杆菌肠毒素,可迅速检测低至每毫升 1 毫微克的肠毒素。

至于侵袭性大肠杆菌的侵袭力,可采用 Rudoy 等介绍的 HEP-2 细胞法及 Sereny 试验法。

## 大肠杆菌 K<sub>99</sub> 抗原与产肠毒素的关系

大肠杆菌 K<sub>99</sub> 抗原普遍存在于从腹泻牛、羊体内分离的产肠毒素的大肠杆菌中。该种大肠杆菌常定位

于该类动物的小肠,粘附于肠壁绒毛上皮细胞而引起严重腹泻。Ørskov 等指出,自牛、羊中检出此种具有传染性的抗原,称为 K<sub>99</sub> 抗原(原称 K<sub>co</sub> 抗原)<sup>[42]</sup>。Guinee 等用玻片凝集试验及免疫电泳法检出了 K<sub>99</sub> 抗原,但 K<sub>99</sub> 抗原及产肠毒素的特性受不同质粒控制<sup>[43]</sup>。K<sub>99</sub> 抗原已用硫酸铵沉淀法及柱层析法提纯,为一种蛋白质,不耐热,大小均匀,为 13—15S,其中含两种亚单位,大部分分子量为 22 500,小部分为 29 500。在电镜下该抗原呈杆状,直径 8.4 毫微米,平均长度 130 毫微米,呈纤毛或纤毛样结构(纤毛样表面抗原),等电点大于 10,与豚鼠红细胞不发生凝集<sup>[44]</sup>。Moon 等报告,自腹泻小牛中分离的 345 株大肠杆菌中,有 46 株产生 ST; 并指出:从腹泻病人分离的 ETEC 均无 K<sub>99</sub> 抗原<sup>[45]</sup>。Echeverria 等自腹泻小牛分离的 124 株产 LT 的大肠杆菌中有 28 株含 K<sub>99</sub> 抗原,因而认为用乳鼠测定大肠杆菌的 ST,结合检测 K<sub>99</sub> 抗原,对诊断小牛的产肠毒素大肠杆菌感染是有用的<sup>[35]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Du Pont, H. L., S. B. Formal and R. S. Hornick: *N. Eng. J. Med.*, 285(1): 1—9, 1971.
- [2] Rudoy, R. C. and J. D. Nelson: *Am. J. Dis. Child.*, 129(5): 668—672, 1975.
- [3] Goldschmidt, M. C. and H. L. Du Pont: *J. Infect. Dis.*, 133(2): 153—156, 1976.
- [4] Rowe, B.: *Lancet*, 1:90—95, 1977.
- [5] Nalin, D. R., A. K. Bhattachujee and L. E. Richardson: *J. Infect. Dis.*, 130(6): 595—601, 1974.
- [6] Lariviere, S., C. L. Gyles and D. A. Barnum: *ibid.*, 128(3): 312—321, 1973.
- [7] Evans, D. J., D. C. Evans and N. F. Pierce: *Infect. Immunity*, 7(6): 873—880, 1973.
- [8] Konowalehuk, J., J. I. Speirs and S. Starrie: *ibid.*, 18(3): 775—779, 1977.
- [9] Evans, D. G., D. J. Evans and S. L. Gorbach: *ibid.*, 8(5): 731—735, 1973.
- [10] Echeverria, P., C. J. Louria and A. L. Smith et al.: *J. Infect. Dis.*, 135(2): 195—200, 1977.
- [11] Anderete, J. F. and D. C. Robertson: *Infect. Immunity*, 15(3): 781—788, 1977.
- [12] Evans, D. J., D. G. Evans and S. H. Richardson: *J. Infect. Dis.*, 133 (supp): s97—102, 1976.
- [13] Dörner, F., H. Jaksche and W. Stocki: *ibid.*, 133 (supp): s142—156, 1976.
- [14] Dafni, F., H. Jaksche and W. Stocki: *ibid.*, 133 (supp): s142—156, 1976.
- [15] Finkelstein, R. A., M. K. Larne and D. W. Johnston et al.: *ibid.*, 133(supp): s120—137, 1976.
- [16] Gill, D. M., D. J. Evans and D. G. Evans: *ibid.*, 133(supp): s103—107, 1976.
- [17] Rappaport, R. S., J. F. Sagin and W. A. Pier-

- zehala et al.: *ibid*, **133**(supp): s41—54, 1976.
- [18] Wackmuth, I. K.: *Infect. Immunity*, **24**(2): 403—408, 1976.
- [19] 大桥 成, 善良寺浩: 日本细菌学杂志, **132**(3): 455—468, 1977.
- [20] Gyles, C. L.: *J. Infect. Dis.*, **129**(3): 277—283, 1974.
- [21] Smith, N. W. and R. B. Sack: *ibid*, **127**(2): 164—170, 1973.
- [22] Sack, R. B., B. Jacobs and R. Mitra: *ibid*, **129**(3): 330—335, 1974.
- [23] Singh, A., R. K. Guind and S. K. Sethi: *Indian J. Med. Res.*, **64**(3): 410—417, 1976.
- [24] Donta, S. T.: *J. Infect. Dis.*, **133**(supp): s115—119, 1976.
- [25] Singh, A., K. S. Mohan and S. K. Sethi: *Indian J. Med. Res.*, **65**(6): 777—781, 1977.
- [26] Cautey, J. R. and R. K. Blake: *J. Infect. Dis.*, **135**(3): 454—462, 1977.
- [27] Gorbach, S. L. and C. M. Khuraea: *N. Eng. J. Med.*, **287**(16): 791—795, 1972.
- [28] Sheer, H. P., J. G. Banwell and A. Rothefeld et al.: *Gastroenterology*, **65**(5): 895—902, 1973.
- [29] Pierce, N. F. and K. Wallace: *ibid*, **63**: 439—448, 1972.
- [30] Evans, D. G., D. J. Evans and W. S. Tjor et al.: *Infect. Immunity*, **19**(2): 727—736, 1977.
- [31] Bettelheim, K. L., N. Ismal and R. Shinebaum: *J. Hyg.*, **73**(3): 403—406, 1976.
- [32] Sack, R. B., D. A. Sack and I. J. Mehlman et al.: *J. Infect. Dis.*, **135**(2): 313—319, 1977.
- [33] Sack, D. A. and R. B. Sack: *Infect. Immunity*, **2**(2): 334—336, 1975.
- [34] Donta, S. T., H. W. Moon and S. C. Whipp: *Science*, **183**(4122): 334—336, 1974.
- [35] Echeverria, P., V. Lucia and V. Y. Caesar: *Infect. Immunity*, **19**(1): 343—344, 1978.
- [36] Guerrant, R. I., L. L. Brunton and T. C. Schnaitman et al.: *ibid*, **10**: 320—327, 1974.
- [37] Klipstein, F. A., C. S. Lee and R. F. Engert: *ibid*, **14**(4): 1004—1010, 1976.
- [38] Speirs, J. I., S. Stavric and J. Konowalchuk: *ibid*, **16**(2): 617—622, 1977.
- [39] Evans, D. J. and D. G. Evans: *ibid*, **16**(2): 604—609, 1977.
- [40] Giannella, R. A.: *ibid*, **14**(1): 95—99, 1976.
- [41] Ceska, M., F. Grossmuller and F. Effenberger: *ibid*, **19**(2): 347—352, 1978.
- [42] Ørskov, I., F. Ørskov and H. W. Smith: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect. **B**, **85**: 31—36, 1975.
- [43] Guinee, P. A. M., W. H. Jansen and C. M. Agterberg: *Infect. Immunity*, **13**(5): 1369—1377, 1976.
- [44] Isaason, R. E. *ibid*, **15**(1): 272—279, 1977.
- [45] Moon, H. W., B. Nagy and R. E. Isaason et al.: *ibid*, **15**(2): 614—620, 1977.