

|                     |   |
|---------------------|---|
| <b>Zeitschrift:</b> | Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire<br>ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires |
| <b>Herausgeber:</b> | Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte  |
| <b>Band:</b>        | 126 (1984)  |
| <b>Artikel:</b>     | ELISA zum Nachweis von K99 Fibrienantigen enterotoxischer E.coli in Faeces  |
| <b>Autor:</b>       | Schneider, Erika / Fey, Hans / Pfister, Hedi  |
| <b>DOI:</b>         | <a href="https://doi.org/10.5169/seals-591846">https://doi.org/10.5169/seals-591846</a>   |

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 15.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 607–620, 1984

Aus dem Veterinär-Bakteriologischen Institut der Universität Bern

## ELISA zum Nachweis von K99 Fimbrienantigen enterotoxischer E.coli in Faeces

von *Erika Schneider, Hans Fey<sup>1</sup> und Hedi Pfister*

### 1. Einleitung

Mit zunehmender Massentierhaltung gewinnt die Infektion mit enterotoxischen E.coli (ETEC) bei den Jungtieren immer grössere wirtschaftliche Bedeutung (WHO 1980).

Der akute Verlauf ist gekennzeichnet durch starke Diarrhoe mit deutlicher Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Der Kot ist übelriechend, wässrig, hell, schaumig und zum Teil mit Blut durchsetzt. Die Kälber sind matt bis apathisch, haben erhöhte Temperatur, die Atem- und Pulsfrequenz sind heraufgesetzt. Durch den grossen Flüssigkeitsverlust werden sie exsiccotisch und sterben ohne Behandlung innerhalb 3–6 Tagen.

Beim subakuten Verlauf steht die Diarrhoe im Vordergrund. Das Befinden dieser Patienten ist im allgemeinen nicht stark beeinträchtigt. Als Folgekrankheiten werden Pneumonien, Otitiden und Gelenksentzündungen beobachtet.

Die Pathogenität eines ETEC-Stammes beruht auf zwei hauptsächlichen Virulenzfaktoren: Der Bildung von Enterotoxin(en) und den Haftorganellen (Fimbrien), die die Besiedelung des Darmes ermöglichen [1, 15, 26, 30].

Sobald die Bakterien am Epithel haften, können sie sich stark vermehren. Dies ist Vorbedingung für ihre enteropathogene Wirkung. Die Diarrhoe mit all ihren Folgen ist auf die Toxinwirkung zurückzuführen [8, 30]. Die Enterotoxine bewirken Permeabilitätsveränderungen in den Epithelzellen und es kommt zu einer aktiven Wassersekretion ins Darminnere.

### Nachweis von ETEC

Für den Nachweis der Enterotoxine wurden eine Reihe von Tests entwickelt; viele davon wurden ursprünglich für den Cholera-Toxin-Nachweis beschrieben und dann an Enterotoxine angepasst. Dazu gehören: der Darmschlingentest, Nachweis des Gefäß-Permeabilitäts-Faktors, Wirkung auf Y1 mouse adrenal cells und Chinese hamster ovarian cells (CHO) sowie gewisse serologische Methoden (WHO). Alle diese Tests sind aber für die tägliche Diagnostik zu aufwendig. Die Fimbrien dagegen liegen auf der Oberfläche der Bakterien und sind deshalb serologisch leicht zugänglich.

---

<sup>1</sup> Adresse: Prof. Dr. Hans Fey, Postfach 2735, CH-3001 Bern.

Wegen der deutlichen Parallelität zwischen Enterotoxin- und Fimbrienproduktion [2, 3, 12, 17, 28] ist es möglich, ETEC anhand ihrer Fimbrien nachzuweisen anstelle der aufwendigen und schwierigen Toxinbestimmung. Man muss sich aber klar sein, dass mit dem Vorhandensein noch unbekannter Haftorganellen zu rechnen ist. Die bisher gebräuchlichste Methode für den Fimbriennachweis ist die Objektträgeragglutination [2, 13, 17, 18].

Mit einem ELISA wiesen *Evans et al.* [5] und *Ellens et al.* [2] Haftantigene CFAI nach und *Ellens et al.* [2] beschrieben einen Microtiter-ELISA für den Nachweis von K 99-Fimbrien im Kot von Kälbern.

Ziel dieser Arbeit war es, einen unseren Verhältnissen angepassten ELISA zu entwickeln, der es den Diagnostikern ermöglichen würde, ETEC anhand von K 99-Fimbrien im Kälberkot schnell und einfach nachzuweisen.

### *Haftantigene*

Im Gegensatz zu den relativ unspezifischen Typ-I-Fimbrien, die hier nicht zur Diskussion stehen, steht die Gruppe der Fimbrien-Haftantigene, die eine recht starke Wirts-Spezifität aufweisen. Diese bisher bekannten Fimbrienantigene sind K 88 ab, K 88 ac und K 88 ad [27] sowie 987 P [26], die nur an Schweinedarmzellen haften [12], ferner K 99, welches beim Schwein, Rind und Schaf nachgewiesen wurde [12].

Alle ETEC, das heisst alle darmpathogenen *E. coli* bei Mensch und Tier produzieren entweder ein hitzestabiles (ST) oder ein hitzelabiles (LT) Enterotoxin, oder beides [12, 23, 30]. LT ist immunologisch dem Cholera-Toxin (Choleragen) ähnlich. Choleragen- und Coli-LT-Antikörper neutralisieren nicht nur das eigene, sondern kreuzweise auch das andere Toxin [19].

ST ist ein sehr kleines Molekül, dialysierbar und nicht immunogen.

### *K 99-Fimbrien*

*De Graaf et al.* [15] isolierten das K 99-Antigen von verschiedenen Stämmen und erhielten ein einheitliches Protein mit nur einer Untereinheit mit dem Molekulargewicht von 18400 Dalton. *Isaacson et al.* [21] bestätigten diese Angaben. Im Elektronenmikroskop erschien das Protein als Fimbrien mit einer helikalen Struktur und einem Durchmesser von 4,8 nm. Der isoelektrische Punkt lag bei pH 9,7.

*Gaastra et al.* [12] wiesen nach, dass derselbe Stamm mehrere, zum Teil noch gar nicht bekannte Haftantigene produzieren kann. Auch haben die Bedingungen, unter denen *E. coli* gezüchtet werden, bedeutende Auswirkungen auf die Expression von K 99-Antigen [8, 13, 14, 20].

## 2. Material und Methoden

Wir arbeiteten mit folgenden Stämmen: *E. coli* B 41 (0101: K 99) und K 12/K 99 von der Internat. Escherichia Zentrale, Kopenhagen (F. Orskov). Zur Prüfung der Spezifität unserer Antiseren verwendeten wir: E 68 (0141: K 88 ab : H4), Abbotstown (0149 : K 88 ac : H10), C 1208-75 (09 : K 103 : H- : 987 P) von F. und I. Orskov und H 497/77 (09 : K 37, K 99), H 852/76

(0101: K(A)28:K99) und H 1916/75 (020 : K? : K99) von P. A. M. Guinée, Bilthoven. Wir danken den genannten Damen und Herren an dieser Stelle herzlich für ihre Mithilfe.

Die Stämme wurden auf Blutplatten an- und reingezüchtet und von da auf CFA-Agar [4] sowie auf Minca-Agar mit Hefe genommen [18]. Minca-IS-Medium wurde anstelle von Glucose mit 1% Iso-Vitale-Enrichment (Becton Dickinson and Co.) angereichert [11].

Zur selektiven Züchtung von *E. coli* B41, ein Stamm, der Streptomycin-resistent ist, versetzten wir Minca + Hefe mit 250 mg/lt Streptomycin-Sulfat.

#### *Reinigung des Antigens*

Diese geschah nach *de Graaf* [15] in Kürze wie folgt: Minca + Hefe-Bouillon wurde unter Schütteln 16 Std. inkubiert, die Kultur zentrifugiert und das Bakteriensediment mit Phosphat-Urea-Puffer aufgenommen (50 mM PO<sub>4</sub>, 2 M Urea, pH 7,2). Die dichte Suspension wurde 20 Min. auf 60 °C erhitzt, was die Fimbrien von den Bakterienzellen detachiert. Nach Zentrifugation (18000 rpm, 15 Min.) wurde der Überstand gesammelt, das Sediment nochmals mit PO<sub>4</sub>-Urea-Puffer aufgeschwemmt und mit einem Sorvall-Omnimixer 30 Min. auf Stufe 4 unter Kühlung gemixt. Aus den gesammelten Überständen wurden die Fimbrien mit 60% gesättigtem Ammoniumsulfat gefällt. Das Sediment wurde gegen PO<sub>4</sub>-Urea-Puffer dialysiert. Für die Proteinmessung benützten wir die Methode von *Lowry et al.* [22].

10–20 mg Protein des Rohextraktes wurden über Sepharose C14 B (Pharmacia, Uppsala), äquilibriert mit PO<sub>4</sub>-Urea-Puffer, gelfiltriert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels ELISA auf ihren Antigengehalt geprüft (Fig. 1).

Zur Desaggregation der Fimbrien und zur weiteren Reinigung wurde die Suspension ad 0,5% Gew./Vol. mit Na-Desoxycholat (DOC, Merck, Darmstadt) versetzt und während 72 Stunden gegen 50 mM PO<sub>4</sub>, enthaltend 0,5% Gew./Vol. DOC pH = 7,5 dialysiert. Die anfänglich leicht trübe Suspension wurde durch Zugabe von DOC ganz klar, und während der Dialyse bildete sich ein leichter Niederschlag, welcher bei 18000 rpm wegzentrifugiert wurde. Anschliessend folgte eine Dialyse gegen 50 mM PO<sub>4</sub>, pH 7,2 während 48 Stunden und darauf 72 Stunden gegen H<sub>2</sub>O dest. Das fertig gereinigte Protein wurde bei –20 °C aufbewahrt.

#### *Chromatofokussieren*

Wir dialysierten Ammonsulfat-gefällt K99-Protein (= K99 roh) über Nacht gegen 0,025 M Triethylamin pH 11 (Fluka AG, CH-9470 Buchs). Das Gel wuschen wir in einer Nutsche mit demselben Puffer pH 11 und füllten damit eine Säule 1,5 × 14 cm. Die Säule wurde mit 50 mg K99 Rohextrakt beladen und mit dem Startpuffer eluiert.

#### *Präparative isoelektrische Chromatofokussierung*

4 g Ultrodex (LKB, Stockholm) wurden mit 80–90 ml aq.dest., je 2,5 ml Ampholine pH 7–9 und pH 9–11 (LKB, Stockholm) und dem Protein (PBS dialysiertes K99 roh 40–50 mg) ad 110 ml gemischt. Die Auftrennung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers mit 4–9 Watt über Nacht. Danach wurde das Gel in 24 Streifen geschnitten und jede Fraktion mit je 2 × 5 ml H<sub>2</sub>O dest. eluiert. Von jedem Eluat wurde das pH gemessen und der pH-Gradient grafisch dargestellt. Mittels ELISA und dem Ouchterlony-Test konnten wir dann das K99-Antigen lokalisieren. Mit dem isolierten Antigen immunisierten wir Kaninchen wie früher beschrieben (*Stiffler und Fey*, [29]).

Die Antiseren wurden mit K99-negativen Mutanten *E. coli* B41 m und K12<sup>–</sup> zur Beseitigung von O-Antikörpern absorbiert. Anstelle von B41 m und K12<sup>–</sup> brauchten wir auch gekochte Kulturen der K99-positiven Stämme B41 und K12/K99 zur Absorption. Um auch Antikörper gegen zellinnere Strukturen zu eliminieren, absorbierten wir die Seren noch zusätzlich mit einem K99-negativen Rohextrakt von B41 m resp. K12<sup>–</sup>. Herstellung der Konjugate.

Die Antiserum-IgG-Faktionen wurden mit dem SPDP-Verfahren von Pharmacia an alkalische Phosphatase gekoppelt (*Fey et al.*, 1984).

### *Herstellung des Kotextraktes*

Kotproben vom Rind wurden mit 20% Glycerin bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Positive oder negative Kotkontrollen kontaminierten wir gleich nach dem Auftauen mit B41, K12/K99 resp. B41 m, K12<sup>-</sup> in Minca- + Hefe-Bouillon enthaltend  $4 \times 10^8$  Keime/g Faeces. Die Kotproben wurden dann im Verhältnis 1:6 (G/V) mit Extraktionspuffer gemischt (PBS mit 0,05% Tween 20, 1% bovinem Serumalbumin und 200 ug/ml Polymyxin B (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA). In Analogie zum Reinigungsverfahren von K99 wurden die Proben dann im Wasserbad 20 Min. auf  $60^{\circ}\text{C}$  erwärmt und anschliessend mit 10000 rpm während 15 Min. zentrifugiert.

### *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Als Trägermaterial dienten Polystyrol-Röhrchen von Petra Plastik, Chur und Flat Bottom Microelisa-Platten von Dynatech. Wir entschieden uns für die Sandwich-Version des Tests (Fey *et al.*, 1984).

Das Antigen (der Kotextrakt) wurde 1:10 verdünnt mit PBS-Tween (0,1 M PO<sub>4</sub> pH 7,2 + 0,8% NaCl + 0,05% Tween 20 + 0,1% NaN<sub>3</sub>) und mit dem Immunosorbens entweder 5 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurde 2 Stunden mit dem anti-K12/K99-Phosphatase-Konjugat inkubiert.

Die Ablesung der Farbreaktion erfolgte bei 405 nm in einem Vitatron DCP-Photometer (Fey und Gottstein).

## 3. Resultate

### *Isolierung von K99-Fimbrien*

Wir arbeiteten vorerst mit *E. coli* B41, 0101: K99 zur Isolierung von K99-Fimbrien und hatten damit Interpretationsschwierigkeiten. Dieser Stamm trägt nämlich ein von *de Graaf et al.* [14] entdecktes zweites Fimbrienantigen F41. Dieses ist in seiner Aminosäurensequenz zum Teil homolog mit dem K99-Antigen, hat aber einen isoelektrischen Punkt von 4,6 und wandert deshalb zur Anode [16]. Durch dieses Antigen wurden unsere Resultate mit dem K99-Antigen ganz offensichtlich verfälscht. Die gleiche Erfahrung machten auch *Morris et al.* [24, 25]. Erst durch die Untersuchungen von *de Graaf et al.* [16] wurden diese Missverständnisse beseitigt. Wir entschieden uns schliesslich für *E. coli* K12/K99, in den das Plasmid, welches für K99 codiert, implantiert ist.

Als Nährmedium bewährte sich Minca- + Hefe-Bouillon. Wir inkubierten 1 Liter Erlenmeyer-Flaschen mit 4 Schikanen mit 300 ml Medium jeweils 16–20 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  (stationäre Phase) bis zu einer Dichte von  $10^8$  Keimen/ml.

### *Reinigungsverfahren*

#### *Reinigung nach de Graaf [15]*

Ausgehend von 4,5 l Bouillonkultur *E. coli* B41 ernteten wir durchschnittlich 30 mg, mit *E. coli* K12/K99 durchschnittlich 2 mg rohes «Fimbrien»-Protein. Im Ouchterlony-Test ergab dieses rohe Fimbrien-Material eine einzige Linie gegen anti-K99-Serum, das uns von Herrn *P. A. M. Guinée (Bilthoven)* freundlicherweise überlassen wurde.

In der Immunoelektrophorese fanden wir bei K99-Antigen von *E. coli* B41 eine starke, leicht kathodisch gewanderte Linie und zudem mehrere anodische Linien.

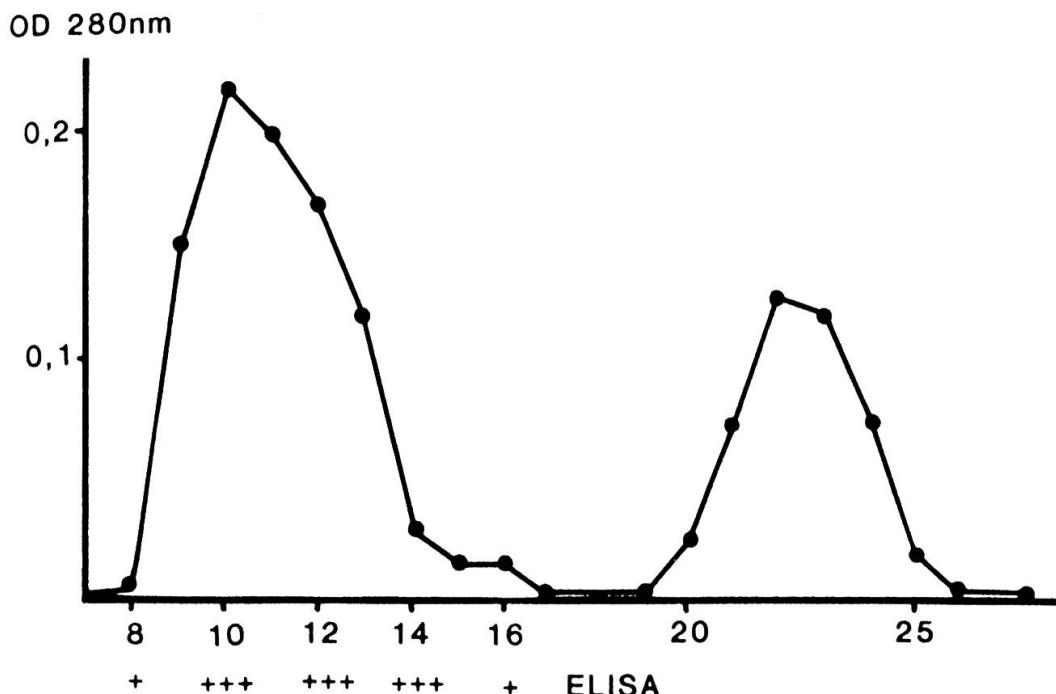


Fig. 1 Reinigung von K99-Antigen durch Gelfiltration auf Sepharose Cl 4B  
 Säule 1,5 × 90 cm. Aequilibrierungspuffer 50 mM PO<sub>4</sub> + 2M Urea, pH 7,2. Auftrag von 15 mg Protein K99 Rohantigen. Die mit + bis + + + bezeichneten Fraktionen enthalten ELISA-positives Antigen.

Beim rohen Fimbrienmaterial von *E. coli* K12/K99 erschien nur eine einzige, starke, leicht kathodische Linie. Bei der weiteren Reinigung auf der Sepharose Cl 4B-Säule trennte sich das Antigen in 2 Fraktionen.

Von 20 mg rohem Antigen, die wir auf eine Säule gaben, fanden wir ungefähr 4 mg in den Fraktionen des ersten Gipfels wieder.

Nach der anschliessenden Desaggregation und weiteren Reinigung mit Natrium-Deoxycholat blieben uns, ausgehend von 4,5 l Kulturmedium schliesslich noch 2–3 mg gereinigten K99-Antigens.

#### Chromatofokussierung

Unser Protein band nicht an das Gel, sondern erschien regelmässig im breakthrough peak. Nach Zugabe von Polypuffer-HCl pH 7 1:10 verdünnt erschien nur ein kleiner Peak von nicht fimbriehaltigem Material. Die Kontaminanten eluierten nach Zugabe von 1 M NaCl. Wir verzichteten deshalb im weiteren auf die Elution mit Polypuffer. Die Vermeidung von Polypuffer ist deshalb von Bedeutung, weil dieser die immunologischen Reaktionen empfindlich stört und nur schwer wieder zu entfernen ist. Alle Fraktionen wurden mit ELISA und dem Ouchterlony-Test auf das Vorhandensein von K99-Antigen geprüft und dann entsprechend gepoolt (Fig. 2a und 2b). Unser System beruht also nur auf einem Anionenaustausch, der eigentliche Fokussierschritt entfällt.

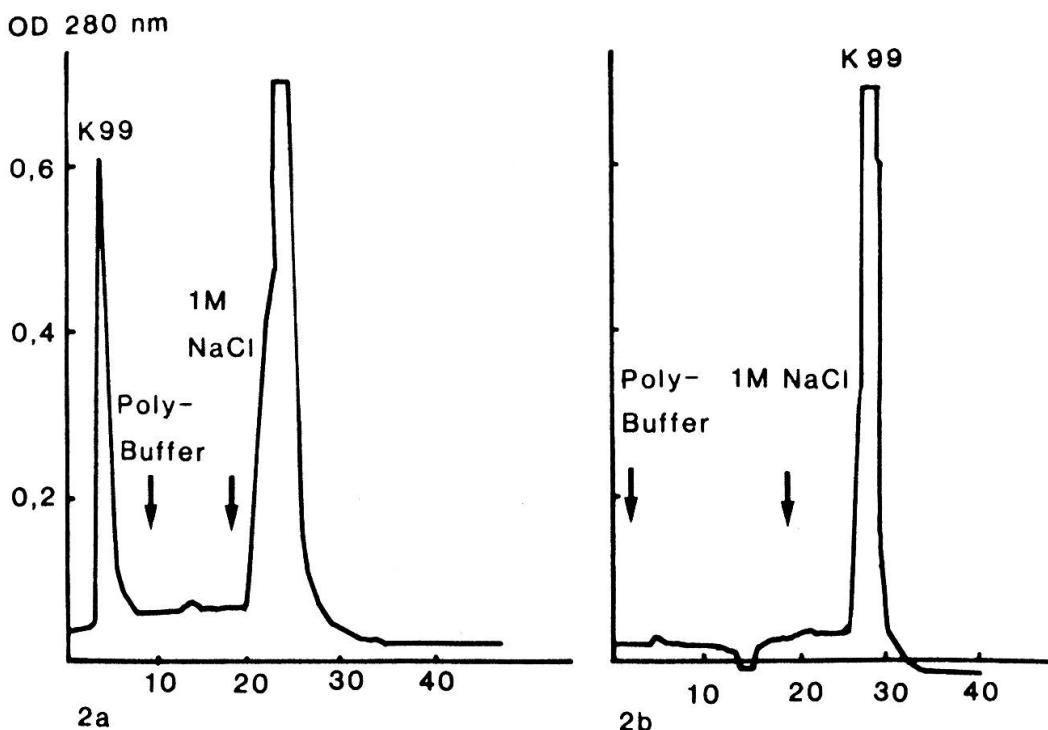


Fig. 2 Elutionsprofile von K99-Antigen nach Chromatofokussierung.

a) K99-Antigen isoliert von E.coli B41

b) K99-Antigen isoliert von E.coli K 12/K99

Säulen mit PBE94-Gel 1,5 × 18 cm. Startpuffer 0,025 M Triaethylamin pH 11. Auftrag je 10 mg Protein. Elution zuerst mit Polybuffer-HCl pH 7,0 1/10 verdünnt, danach mit 1 M NaCl.

Bei 2a erscheint K99 im breakthrough peak, bei 2b zusammen mit den Kontaminanten im hochmolaaren NaCl-Gipfel.

Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug ungefähr ein Fünftel des Ausgangsproteins. Erstaunlicherweise funktionierte diese Methode aber mit Fimbrienmaterial, das von K12/K99 stammte, nicht mehr. Das K99-Antigen aus dieser Quelle blieb nämlich wider Erwarten am Gel haften und konnte auch mit Polypuffer nicht eluiert werden. Erst bei Zugabe von 1 M NaCl erschien dann das ganze antigene Material zusammen mit allen Kontaminanten im Eluat (Fig. 2b).

#### Präparative Flachbettgel-Isoelektrofokussierung

Mit dieser Methode konnten wir präparativ den anodisch wandernden Teil unseres K99-Isolates von dem kathodisch wandernden trennen. Wir erreichten im Gel einen pH-Gradienten von 6,4 bis 9,9. Das gesamte Protein trennte sich auf in vier anodische und eine einzige, feine kathodische Bande, aber der Verlust von Antigen-Material war viel zu gross. Von insgesamt 45 mg rohen K99-Antigenen blieben am Schluss 0,7 mg.

Nach Abwägung der Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden kamen wir zum Schluss, dass sich für unsere Zwecke, nämlich die Herstellung eines guten Antiseraums und die einfache Produktion eines Referenz-Antigens für ELISA (Positiv-Kon-

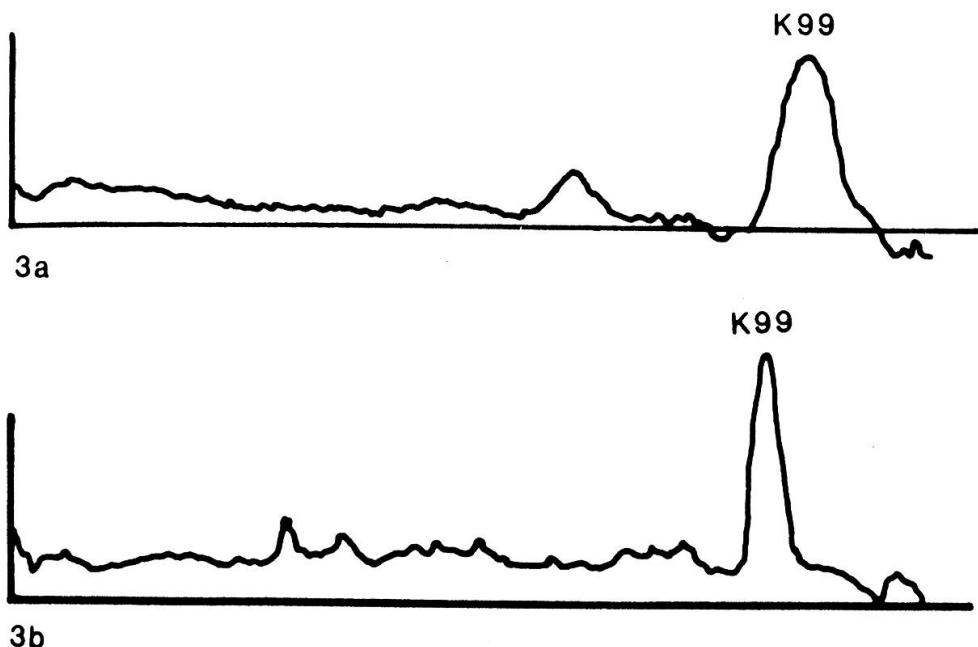


Fig. 3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von K99-Antigen.

a) Rohes K99-Antigen von *E. coli* K 12/K 99  
 b) K99-Antigen hergestellt mittels Gentechnologie (Intervetra)

trolle im Test), das rohe K 99-Antigen von *E. coli* K 12/K 99 am besten eignet. Allein durch Erhitzen in 2 M Urea-Puffer auf 60 °C und anschliessende Ausfällung mit 60% gesättigtem Ammoniumsulfat erhielten wir ein Antigen, das sowohl in der Immuno-elektrophorese als auch im SDS-Polyacrylamid-Gel eine kräftige Bande mit schwachen Nebenbändern ergab (Fig. 3).

Kurz vor Abschluss dieser Arbeit erhielten wir von *Dr. P. K. Storm* von der Intervet International B. V. in Boxmeer, Holland, freundlicherweise ein mittels Invitro-Rekombination hergestelltes K 99-Antigen. Unser rohes K 99-Antigen von *E. coli* K 12/K 99 liess sich mit diesem Antigen durchaus vergleichen, wie die Elektrophorese in Polyacrylamid ergab (Fig. 3).

#### Auswertung der Antiseren

Mit den Antigenen verschiedener Reinigungsstufen unseres K 99-Antigens stellten wir 7 Kaninchenantiseren her. Mit einer Ausnahme genügten bei allen Kaninchen 2 Injektionen mit je 50 µg Antigen zur Erzeugung starker Präzipitationslinien.

Alle Antiseren agglutinierten die Stämme *E. coli* B 41 und K 12/K 99 stark.

Ausser den beiden mit *E. coli* K 12/K 99 hergestellten Antiseren agglutinierten ausserdem alle Antiseren leicht mit der K 99-negativen Mutante B 41 m. Diese schwach-positive Reaktion verschwand nach der Absorption mit formolisierten B 41 m-Bakterien. Diese Manipulation war aber für den ELISA überflüssig.

### *Konjugate*

Als Antikörper wählten wir schlussendlich anti-K 12/K 99-Ammoniumsulfat-IgG, das wir mit Hilfe von Protein-A-Sepharose gewannen.

### *Test zum Nachweis von K99-Fimbrien aus Kot*

Wir wollten einen Test entwickeln, der es den Diagnostikern erlauben würde, das für ETEC signifikante Oberflächenantigen K 99 ohne vorherige Kultur direkt aus dem Kot nachzuweisen.

Laut *Ellens et al.* [2] darf man im Kot erkrankter Tiere  $10^9$  Keime pro Gramm Kot erwarten. Da zudem vermutlich noch grosse Mengen von zellfreiem Fimbrien-Antigen vorhanden sind, galt es nicht in erster Linie, kleinste Mengen von Antigen nachzuweisen. In unserem ELISA-System arbeiten wir meistens mit 3-ml-Polystyrolröhren. Mit diesen kann man die Test-Grösse immer individuell wählen und die Wasch- und Einfüllvorgänge sind ohne spezielle Einrichtungen (Waschgerät, Multipipetten, Ableseautomat) zu bewältigen.

Als Test-Anordnung wählten wir einen einfachen Sandwich-Elisa nach folgendem Schema:

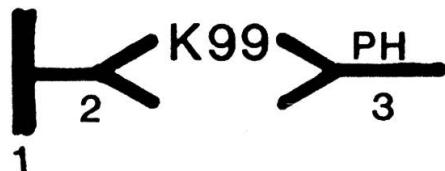


Fig. 4 1 = Polystyrol-Sorbens, 2 = Kaninchen anti-K 99-Antikörper-IgG als coat (trapping antibody), 3 = Kaninchen anti-K 99-Antikörper Phosphatase markiert (Konjugat).

Der Coat wurde jeweils über Nacht stehen gelassen und der Kotextrakt wie beschrieben vorbereitet. Am nächsten Morgen wurden die mit Antikörper beschichteten Röhrchen 3mal mit PBS-Tween gewaschen und je 1 ml Kotextrakt eingefüllt. Für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen brauchen wir neuerdings Polystyrolperlen, die nach der Beschichtung in Puffer aufbewahrt werden und so monatelang jederzeit testbereit sind. Den mit K 99-Bakterien kontaminierten Kotextrakt verdünnten wir mit PBS-Tween in Zweierschritten bis 1 : 512 mit PBS-Tween und testeten je 1 ml davon. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Röhrchen 3mal gewaschen und dann für 2 Stunden 1 ml anti-K 99-PH-Konjugat 1: 800 dazugegeben. Nach einem weiteren Waschprozess wurde 1 ml Substrat während einer Stunde inkubiert.

Bei den negativen Kontrollproben, von denen wir 5 Röhrchen ansetzten, waren die OD 405-Werte =  $< 0,1$ . Von diesen Werten berechneten wir  $\bar{x}$ , s und  $\bar{x} + 3s$ . Die Mittelwerte der einzelnen Verdünnungsstufen, die gleich oder grösser als dieser Schwellenwert waren, betrachteten wir als positiv (99% Vertrauensgrenze).

Die mit *E. coli* K 12/K 99 kontaminierten Kotproben waren bis zur Verdünnung 1 : 128 positiv. Im endgültigen Test mit natürlich infiziertem Kot, in dem neben dem

zellgebundenen K 99-Antigen zweifellos auch viel freies Antigen von abgestorbenen Zellen vorhanden ist, arbeiteten wir jeweils mit vier Verdünnungsstufen in Zehner-Schritten 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000.

### *Diagnostisches Material*

Zur Evaluation unseres Testes sammelten wir Kotproben von Kälbern, die dem Institut für Tierpathologie zur Untersuchung eingeschickt worden waren. Wir entnahmen eine Probe aus dem Bereich des Ileum und eine aus dem Rektum. Mit jeder Kotprobe wurde sofort eine Blauplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Der restliche Kot wurde mit 20% Glycerin versetzt und bei –70 °C tiefgefroren.

Von der Blauplatte wurden am nächsten Morgen 20 Kolonien mit anti-K 99-Antiserum 1:20 agglutiniert. 40 weitere Kolonien wurden auf eine Minca- + Hefe-Platte überimpft. Von diesen 40 Kulturen wurden jeweils erneut 20 Kolonien agglutiniert.

Von 24 Kälbern wiesen 18 die Anamnese Durchfall auf. Davon waren 3 Tiere mit ETEC infiziert. In einem der positiven Fälle konnte K 99-Antigen nur im Rektum-Kot nachgewiesen werden, nicht aber im Ileum-Inhalt.

In jedem Fall stimmte der Befund der Bakterien-Agglutination mit demjenigen des ELISA überein. Bei keiner Probe konnte das K 99-Antigen bereits auf der Blauplatte nachgewiesen werden, obschon jeweils wahllos 20 Kolonien agglutiniert wurden.

### *Infektion eines Kalbes*

Zur Beobachtung der K 99-Ausscheidung während und nach einer Infektion, infizierten wir ein neugeborenes Kalb 4 Stunden nach der Geburt mit *E. coli* B41.

Von einer Minca- + Hefe-Platte überimpften wir eine + + + agglutinierende Kolonie auf 100 ml Minca- + Hefe-Bouillon und inkubierten über Nacht bei 37 °C, was  $1,7 \times 10^8$  Keime pro ml ergab. Das Kalb erhielt also total  $1,7 \times 10^{10}$  Keime in 1 l erstem Kolostrum (vom Muttertier).

### *Klinische Überwachung*

In der Folge wurden dem Kalb regelmässig, d.h. während der klinischen Erkrankung, alle 2 Stunden Kotproben entnommen. Gleichzeitig wurden Puls und Atemfrequenz bestimmt und die Temperatur gemessen. Kurz vor der Infektion und danach alle 12 Stunden entnahmen wir eine Blutprobe. Der Haematokritwert wurde bestimmt und das Serum-Na, K und Gesamtprotein gemessen. (Für die Durchführung dieser Untersuchungen und die freundliche Beratung danken wir Herrn PD Dr. Peter Tschudi herzlich.) Die Gammaglobulin-Bestimmung im Colostrum (Fey *et al.*, 1976) ergab folgende Werte (mg/ml):

|              | IgA | IgG1 | IgG2 | IgM |
|--------------|-----|------|------|-----|
| 1. Colostrum | 5,6 | 12,2 | 2,4  | 4,6 |
| 2. Colostrum | 2,2 | 6,8  | 0,8  | 3,3 |

Immunoelektrophoretisch war das Kalb nach der Colostrum-Aufnahme normogammaglobulinämisch.

### *Verlauf der Infektion und klinisch-bakteriologische Befunde*

Das Kalb reagierte auf die orale Infektion mit total  $10^{10}$  Keimen E. coli B41 nach 20 Stunden mit Durchfall. Der Kot, anfangs noch dünnbreiig, wurde zunehmend wässrig und stinkend. Das Kalb zeigte dabei bald einmal Tenesmen bei der Entnahme von Kotproben sowie beim spontanen Kotabsatz. Es wurde ca. 30 Stunden post infectionem matt bis apathisch, konnte aber immer stehen und trank auch regelmässig und genügend. Vom dritten Tag an wurde der Kot wieder zunehmend dicker und das Kalb erholte sich relativ rasch und vollständig von der Infektion.

Die alle 12 Stunden vorgenommenen Haematokrit-Messungen zeigten, dass das Kalb in bezug auf seinen Wasserhaushalt nie in eine bedrohliche Lage geriet. Bei der Geburt lag der Haematokritwert bei 45 Vol.%, er sank dann in den ersten Stunden bereits auf 38 Vol.% und schwankte im Verlauf der nächsten drei Tage um 34 Vol.%. Dieser Verlauf ist für ein neugeborenes Kalb normal. Das Kalb zeigte auch sonst keinerlei Zeichen einer Exsiccose. Natrium- und Kaliumwerte im Serum sowie das Gesamtprotein blieben während der ganzen Versuchsdauer normal.

Mit sämtlichen Kotproben sowie mit den Nasentupferproben, die wir alle 12 Stunden gewannen, beimpften wir je eine Blauplatte, eine Minca- + Hefe-Platte und eine Minca- + Hefe-Platte mit 250 mg/l Streptomycin-Sulfat. E. coli B41 ist streptomycinresistent und wächst somit auf diesem Nährboden selektiv. Am nächsten Tag wurden pro Platte 10 Kolonien mit anti-K 99-Antiserum agglutiniert.

In den Nasentupfer-Proben konnten wir während der ganzen Versuchsdauer nie K99-Antigen tragende E. coli nachweisen. Im Kot erschien E. coli B41 aber bereits 17 Stunden nach oraler Infektion vereinzelt und nach 24 Stunden praktisch in Reinkultur.

Während der Zeit der effektiven klinischen Erkrankung des Kalbes waren praktisch 100% der agglutinierten Kolonien K 99-Produzenten. Im Gegensatz zu den wilden ETEC-Stämmen, bei denen K 99 meistens auf Blauplatten nicht nachzuweisen ist, produziert E. coli B41 auch auf diesen Nährböden K 99-Antigen. Es ist also wichtig, festzustellen, dass die bei uns übliche Bromthymolblau-Lactose-Platte für den agglutinatorischen Nachweis von K 99-Fimbrienantigen nicht geeignet ist.

Im ELISA war 17 Stunden post infectionem die Kotprobe zum ersten Mal positiv. Als positiv wurden alle Werte beurteilt, die grösser als  $\bar{x} + 3s$  waren. Als Negativkontrolle diente auch hier wiederum künstlich mit E. coli K12<sup>-</sup> kontaminierte, agglutinatorisch negativer Kot. Die Kotproben von 17 bis 73 Std. post inf. waren bis zu der Verdünnung 1:1000 positiv. Erst nach 96 Std. wurde die Probe negativ. Im ELISA war das K 99-Antigen also circa 30 Stunden länger nachzuweisen als mittels Objektträgeragglutination ab Platten.

Die Fieberkurve verlief ziemlich genau parallel zur Menge des nachgewiesenen K99-Antigens im Kot. Mit einer Verzögerung von 10 Stunden entwickelte das Kalb Fieber, das nach 30 Stunden post infectionem mit 40,4 °C den Höhepunkt erreichte und dann wieder parallel zur Verminderung der K99-Ausscheidung zurückging. 90 Stunden nach der oralen Infektion war das Kalb wieder auf Normaltemperatur (Fig. 5).

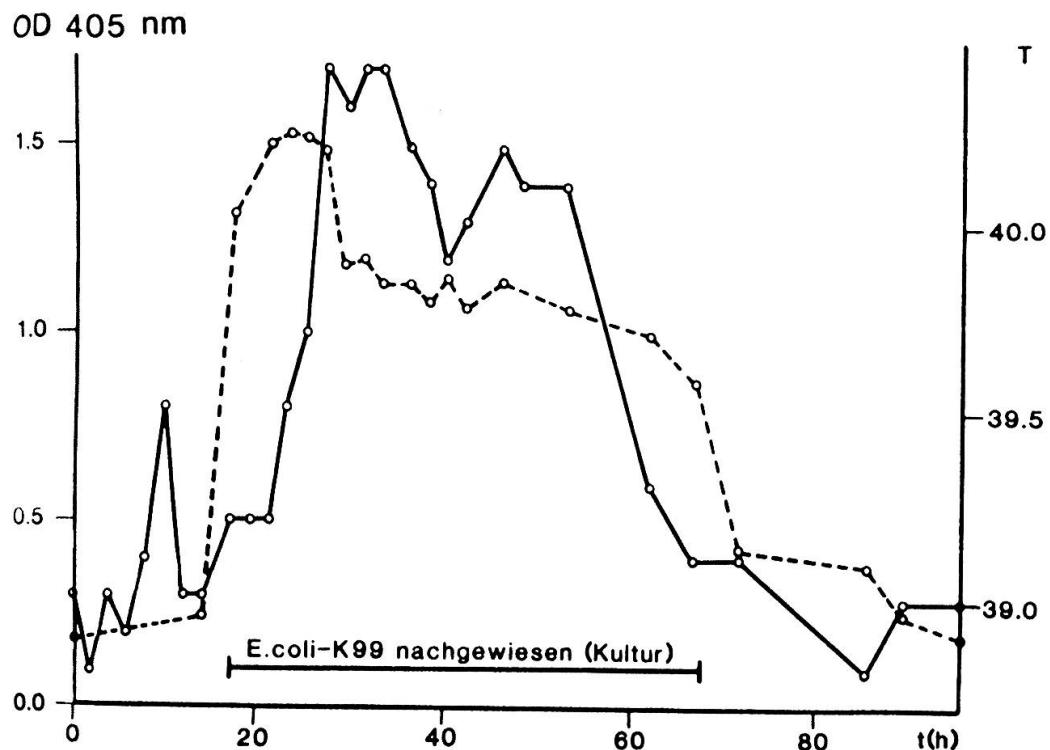


Fig. 5 Experimentelle Infektion eines neugeborenen Kalbes mit *E. coli* B41 (K99 und Enterotoxin LT-positiv).

Die Fieberkurve und die Kurve der ODs des K99 ELISA verlaufen parallel

— OD des K99 ELISA  
— Temperaturkurve

#### 4. Diskussion

Auch wenn damit gerechnet werden muss, dass weitere, noch unbekannte Haftantigene an der Darm-Pathogenität von *E. coli* mitbeteiligt sind, kann doch der Nachweis von K99-Antigen im Falle von Kälber-ETEC heute als sicheres Diagnostikum angesehen werden. Wenn der Nachweis von K99-Antigen praktisch gleichzusetzen ist mit dem Vorhandensein von enterotoxischen *E. coli*, so liegt es auf der Hand, ETEC anhand dieses Haftantigens zu diagnostizieren und auf den schwierigen biologischen Nachweis der Toxine oder aufwendige Typisierungen zu verzichten. Es geht dabei meistens um eine Diagnose am toten Tier oder um genauere Abklärungen im Falle eines Bestandes-Problems. Da ETEC oft zusammen mit anderen Krankheitserregern, wie Viren und Parasiten, oder im Zusammenhang mit Haltungsproblemen auftreten, ergibt sich dementsprechend oft ein sehr komplexes Krankheitsbild. Die Diagnose ETEC bei Durchfallproblemen ist aber sicher immer wertvoll, da man heute mit Vakzinen gezielt eingreifen kann.

Das K99-Antigen, ein relativ grosses, proteinisches Antigenmolekül, welches zudem leicht zugänglich auf der Zelloberfläche liegt, eignet sich gut für einen serologischen Nachweis. Die Hauptschwierigkeit, die der Nachweis dieses wichtigen Pathogenitätsfaktors der ETEC stellt, ist der Umstand, dass das K99-Antigen nur unter be-

stimmten Bedingungen überhaupt zur Ausprägung kommt. Mit der Wahl des geeigneten Nährbodens kann die Chance einer K 99-Antigen-Expression, sofern die genetische Information dafür vorhanden ist, stark erhöht werden. Das Minca-Nährmedium gilt als idealer Nährboden für ein zuverlässiges Auftreten des K 99-Antigens. Allerdings wachsen die Keime auf diesem Minimalnährboden nicht sehr stark, was für eine erfolgreiche Produktion und Isolierung von reinem Antigen nicht gerade günstig ist. Durch Zugabe von 1 g/l Hefe-Extrakt konnten wir die Ausbeute an Zellen im flüssigen Medium leicht erhöhen, ohne dass die Produktion und die Qualität des K 99-Antigens beeinträchtigt wurde.

Die Reinigung des Antigens bot uns beträchtlich mehr Probleme, als wir erwartet hatten. Wir erhielten jedoch mit unserem relativ grob gereinigten Antigen von *E. coli* K 12/K 99 (Ammoniumsulfat-Präzipitat) gute Resultate und auch ein sehr spezifisches Antiserum. Unser Antigen liess sich im PAGE (Polyacrylamidgel-Elektrophorese) sogar mit dem, mittels genetischer Rekombination hergestellten, K 99-Antigen von der Intervet International B. V., Holland, vergleichen. Diese Methode, die genetische Rekombination, ist sicher wegweisend für die Antigen-Herstellung der Zukunft.

Unser einfacher Sandwich-ELISA in Polystyrolrörchen scheint uns eine gute Alternative zum traditionellen Nachweis von K 99 Antigen mittels Objektträger-Agglutination. Dabei fällt vor allem ins Gewicht, dass nicht vorher kultiviert werden muss, und dass auch frei im Darminhalt vorhandenes K 99-Antigen nachgewiesen werden kann. Bei allen unseren Untersuchungen stimmten die Resultate des ELISA mit denjenigen der traditionellen Nachweismethode überein. In den Kotproben des künstlich infizierten Kalbes war K 99-Antigen im ELISA rund 30 Stunden länger nachzuweisen als durch Agglutination von isolierten *E. coli*. Das mag auf frei im Darmlumen vorhandenes K 99-Antigen zurückzuführen sein. Ganz allgemein überraschte uns die Menge des von kranken Tieren ausgeschiedenen K 99-Antigens im Kot. Während der klinischen Erkrankung waren sämtliche Kotproben in Verdünnungen von 1:1000 noch positiv ( $\bar{x} + 3s$ ).

Im Zusammenhang mit einer weiter gefassten ETEC-Diagnose ist geplant, einen Test analog dem Vier-Perlen-Test zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin (Fey and H. Pfister, 1983) zu entwickeln, in den dann auch die übrigen für ETEC spezifischen Haftantigene K 88, 987 P und zusätzlich auch das hitzelabile Enterotoxin LT. einbezogen werden sollen.

##### 5. Zusammenfassung

Mit einem Sandwich ELISA gelang es, K 99-Antigen von enterotoxischen *E. coli* im Kot von Kälbern direkt nachzuweisen, ohne vorher zu kultivieren. Damit ist eine einfache und schnelle Diagnosestellung für ETEC (enterotoxische *E. coli*) möglich. Für die Antigen-Produktion züchteten wir K 99-tragende *E. coli* (zuerst den Stamm B41, später K 12/K 99) in Minca- + Hefe-Bouillon und lösten mit Hilfe von Hitzeinwirkung in einem hochmolaren Milieu die Haftantigene von der Bakterienwand. Durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat und verschiedene weitere Reinigungsmethoden (Flachbett-Gel-Elektrophorese, Säulen-Chromatofokussierung) erreichten wir ein mehr oder weniger reines K 99-Antigen. Damit immunisierten wir Kaninchen. Antikörper IgG wurde mit der SPDP-Methode von Pharmacia an Phosphatase gekoppelt. Für die diagnostische Prüfung des Testes kontaminierten wir Kälberkot künstlich mit K 99-tragenden *E. coli*, später untersuchten wir Kotproben von Kälbern, die mit Durchfall-Anamnese dem Institut für Tierpathologie zur Untersuchung eingeliefert

wurden. Alle Proben wurden bakteriologisch (Objektträger-Agglutination) und mit ELISA auf K 99-Antigen untersucht. Blauplatten eignen sich nicht für die Agglutinationsmethode. An einem neugeborenen Kalb, das wir kurz nach der Geburt oral mit  $10^{10}$  Keimen E. coli B41 infizierten, beobachteten wir den Verlauf der Infektion und vor allem die Ausscheidung von K 99-Antigen über den Darm. Dabei zeigte es sich, dass ELISA für den Nachweis von K 99-Antigen und damit zur klinischen Diagnose der ETEC-bedingten Diarrhoe hervorragend geeignet ist.

### Résumé

Nous avons purifié l'adhésine fimbriale K 99, responsable de l'attachement des E. coli toxigènes dans l'intestin grêle du veau. Un anticorps spécifique marqué par la phosphatase selon la méthode SPDP de Pharmacia a été utilisé pour la détection de cet antigène par un ELISA dans les selles diarrhéiques et au cours d'une infection expérimentale. Il est difficile, dans le diagnostic de routine, de déceler l'antigène K 99 par les techniques habituelles. C'est pourquoi l'ELISA offre une méthode rapide et sensible pour le diagnostic des diarrhées néonatales du veau.

### Riassunto

Con il metodo ELISA fu possibile individuare l'antigene K 99 dell'E. coli enterotossica nelle feci di vitello, direttamente e senza precedente coltivazione. Con tale metodo è possibile attuare un metodo diagnostico rapido e semplice dell'ETEC (E. coli enterotossica). Per la produzione dell'antigene vennero coltivate E. coli portanti K 99 (dapprima il ceppo B41, poi K 12/K 99) in Minca più brodo-lievito. Per mezzo del calore potemmo disgiungere in un medio multiomolare gli antigeni dalla parete del batterio. Con l'aggiunta di ammoniosolfato e diversi altri metodi di raffinazione (strato-gel-elettroforesi, cromato-focatizzazione) potemmo ottenere un'abbastanza puro K 99 antigene. Con questo immunizzammo conigli. Gli anticorpi IgG vennero agganciati con il metodo SPDP di Pharmacia alla fosfatasi. Per il controllo diagnostico del test contaminammo in modo mirato le feci con E. coli portanti K 99. Più tardi esaminammo le feci dei vitelli che erano stati portati alla patologia per esame, aventi una anamnesi di diarrea. Tutte le prove vennero esaminate batteriologicamente (agglutinazione sul vetrino porta oggetto) e con il metodo ELISA, per la ricerca del K 99. Piastre azzurre non sono idonee per la agglutinazione. In un vitello neonato, da noi infettato per via orale subito dopo la nascita con  $10^{10}$  germi E. coli B41, osservammo l'evoluzione dell'infezione e specialmente la eliminazione di K 99 – antigene dall'intestino. Con tale ricerca si dimostrò che il metodo ELISA per la identificazione dell'antigene K 99 si presta molto bene e facilita la diagnosi clinica della diarrea causata da ETEC.

### Summary

We purified fimbrial antigen K 99 from E. coli toxicogenic for calves and devised a sandwich ELISA for the direct detection of this antigen in the faeces. The antibody was coupled to phosphatase using the SPDP heterobifunctional agent of Pharmacia. In clinical cases and in one case of experimental infection of a newborn calf, it turned out that masses of fimbrial antigen are present in the faeces. Since Minca medium has to be used for the demonstration of K 99 antigen on isolated E. coli bacteria, the direct ELISA with stool samples should provide more rapid and very sensitive diagnostic means.

### Literatur

- [1] Acres S. A., R. E. Isaacson, L. A. Babiuk, R. A. Kapitan: Immunization of calves against ETEC by vaccinating dams with purified K 99 antigen and whole cell bacterin. Infection and Immunity 25, 121-126 (1979). – [2] Ellens D. J., P. W. de Leeuw, H. Rozemond: The K 99 Antigen of Escherichia coli: Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of the antigen in calf faeces and for titration of specific antibody. p. 57-66. In: VIDO, Proc. 2nd. Internat. Symp. on Neonatal Diarrhea. University of Saskatchewan (1978). – [3] Evans D. G., R. P. Silver, D. J. Evans, jr., D. G.

*Chase, S. L. Gorbach:* Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *E. coli* enterotoxigenic for humans. *Infection and Immunity*. 12: 656–667 (1975). – [4] *Evans D. G., D. J. Evans, jr., W. Tjoa:* Haemagglutination of human group A erythrocytes by ETEC isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infection and Immunity*. 18, 330–337 (1977). – [5] *Evans D. G., D. J. Evans, jr., S. Clegg:* Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor antigen I in stool specimens by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 12, 738–743 (1980). – [6] *Fey H., H. Pfister, J. Messerli, N. Sturzenegger, F. Grolimund:* Methods of isolation, purification and quantitation of bovine immunoglobulins. *Zbl. Vet. Med. B*, 23, 269–300 (1976). – [7] *Fey H., B. Gottstein:* Ein preiswertes ELISA Lesegerät kombiniert mit dem programmierbaren Rechner T1 59 von Texas Instruments. *Schweiz Arch. Tierheilk.* 121, 387–394 (1979). – [8] *Fey H.:* Kompendium der allgemeinen medizinischen Bakteriologie. Parey Studentexte 19 (1978). – [9] *Fey H., H. Pfister:* A diagnostic kit for the detection of staphylococcal enterotoxins (SET) A, B, C and D. pp. 345–348. In: Avrameas S. et al. *Immunoenzymatic Techniques*. Elsevier Publ. Amsterdam 1983. – [10] *Fey H., H. Pfister, O. Rüegg:* Comparative evaluation of different ELISA systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J. Clin. Microbiol.* 19: 34–38 (1984). – [11] *Francis D. H., G. A. Remmers, P. S. de Zeeuw:* Production of K88, K99 and 987P antigens by *Escherichia coli* cultured on synthetic and complex media. *J. Clin. Microbiol.* 15, 181–183 (1982). – [12] *Gaastra W., F. K. de Graaf:* Host-Specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *E. coli* strains. *Microbiol. Reviews*, 46, 129–161 (1982). – [13] *De Graaf F. K., F. B. Wientjes, P. Klaasen-Boor:* Production of K99 antigen by ETEC strains of antigen groups 08, 09, 020 and 0101 grown at different conditions. *Infection and Immunity* 27, 216–221 (1980). – [14] *De Graaf F. K., P. Klaasen-Boor, J. E. van Hees:* Biosynthesis of the K99 surface antigens is repressed by alanine. *Infection and Immunity* 30, 125–128 (1980). – [15] *De Graaf F. K., P. Klemm, W. Gaastra:* Purification, characterization and partial covalent structure of *E. coli* adhesive antigen K99. *Infection and Immunity* 33, 877–883 (1980). – [16] *De Graaf F. K., I. Roorda:* Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41 M. *Infection and Immunity* 36, 751–758 (1982). – [17] *Guinée P. A. M., W. H. Jansen, C. M. Agterberg:* Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *E. coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infection and Immunity* 13, 1369–1377 (1976). – [18] *Guinée P. A. M., J. Feldkamp, W. H. Jansen:* Improved Minca medium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 15, 676–678 (1977). – [19] *Gyles C. L.:* Relationships among heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. inf. Dis.* 129: 277–283 (1974). – [20] *Isaacson R. E.:* Factors affecting expression of *E. coli* pilus K99. *Infection and Immunity* 28, 190–194 (1980). – [21] *Isaacson R. E., J. Colmenero, P. Richter:* *E. coli* K99 pili are composed of one subunit species. *FEMS Microbiol. Lett.* 12, 229–232 (1981). – [22] *Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall:* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. chem.* 193, 265–275 (1951). – [23] *Moon H. W.:* Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: Evidence for pili as protective antigens. *Vet. Res.* 42, 173–177 (1981). – [24] *Morris J. A., A. E. Stevens, W. J. Sojka:* Preliminary characterisation of cell-free antigen isolated from *E. coli* B41. *J. Gen. Microbiol.* 99, 353–357 (1977). – [25] *Morris J. A., A. E. Stevens, W. J. Sojka:* Isoelectric point of cellfree K99 antigen exhibiting haemagglutination properties. *Infection and Immunity* 19, 1097–1098 (1978). – [26] *Nagy B., H. W. Moon, R. E. Isaacson:* Colonization of porcine small intestine by *E. coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigens and by some acapsular mutants. *Infection and Immunity* 13, 1214–1220 (1976). – [27] *Ørskov I., F. Ørskov, W. J. Sojka, W. Wittig:* K antigens K88 ab (L) and K88 ac (L) in *E. coli*. A new O antigen: 0147 and a new K antigen: K88 (B). *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 62, 439–447 (1964). – [28] *Ørskov I., F. Ørskov, H. W. Smith, W. J. Sojka:* The establishment of K99 a thermolabile, transmissible *E. coli* K antigen, previously called «Kco» possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 83, 31–36 (1975). – [29] *Stiffler-Rosenberg G., H. Fey:* Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B and C: Modification of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 8: 473–479 (1978). – [30] *World Health Organization:* *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull. WHO* 58, 23–36 (1980).