

MIKROBIOLOGIESE ASPEKTE VAN SPORADIESE
AKUTE GASTROËNTERITIS VAN
SUIGELINGE

deur

A S Greeff, Honns. B.Sc., M.Sc.

Proefskrif voorgelê ter voldoening
aan die vereistes vir die graad
DOCTOR SCIENTIAE
aan die Potchefstroomse Universiteit
vir Christelike Hoër Onderwys

Promotor : Prof D van Eeden

Januarie 1978

UITTREKSEL

'n Verskeidenheid potensiële enteropatogene mikroorganismes kon by 97,4% van sporadiese gevalle van akute suigelingsgastroënteritis geïnkrimineer word. Alhoewel veelvuldige infeksies dikwels voorkom het kon enterotoksigene *Enterobacteriaceae* (46,2%), rotavirus (43,6%), enteropatogene serotipes van *Escherichia coli* (38,5%), *Staphylococcus aureus* (15,4%), *Salmonella* spesies (5,1%), *Shigella* spesies (5,1%), *Candida albicans* (2,6%), *Candida krusei* (2,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (2,6%), *Bacillus cereus* (2,6%) en hemolitiese *E. coli* (2,6%) as potensiële oorsake aangedui word. Enterotoksigene *Enterobacteriaceae* het meer dikwels ongeassosieerd as ander groepe voorgekom.

Cholera-geenagtige labiele toksiene (LT), stabiele toksiene (ST) of 'n kombinasie van beide (ST + LT) is deur lede van laasgenoemde groep geproduseer. Die verskillende toksiene kon by 5 *E. coli* (LT), 4 *E. coli* (ST), 2 *E. coli* (ST + LT), 5 *Klebsiella pneumoniae* (LT), 2 *Enterobacter cloacae* (LT), 1 *Enterobacter aerogenes* (LT) en 1 *Proteus vulgaris* (LT) gedemonstreer word. Die labiele toksiene van die verskillende genera is instaat om, onderling varieerende, maar hoëvlak toenames van intrasellulêre sikliese adenosien-3',5'-monofosfaat (cAMP) by "Chinese hamster ovary" (CHO-K1) selle te induseer. Die induksie van cAMP kan teen hoë titer deur antiserum teen cholera-geen geneutraliseer word. Vooraf behandeling van die verskillende labiele toksiene met GM₁ gangliosied of versperring van reseptore op CHO-K1 selle met die B subeenheid van cholera-geen voorkom induksie van verhoogde cAMP. Hierdie verwantskap van labiele toksiene met cholera-geen dui op 'n meganisme vir die induksie van diarree soortgelyk aan dié van cholera-geen.

Die plasmied (Ent) gemedieerde aard van enterotoksiensintese kon by ST sowel as ST + LT produserende *E. coli* stamme aangedui word. Hierdie eienskappe kon deur konjugasie na nie-enteropatogene *E. coli* K12 stamme oorgedra word. Soortgelyk kon die gesamentlike oordrag van Ent (ST + LT), en bepalers wat bestandheid teen sulfafurasool, ampicilien, karbenisilien en tetrasiklien verleen, van 'n enteropatogene serotipe van *E. coli*, 0128:K67:H27, na 'n nie-enteropatogene *E. coli* K12 be-

werkstellig word. Hierdie bevindinge impliseer diagnostiese en terapeutiese komplikasies by die diagnose en behandeling van gastroënteritis.

Sommige toksienproduseerders, waar onder *E. coli* (ST), *K. pneumoniae* (LT), *Enterobacter* (LT) spesies en *P. vulgaris* (LT), reageer nie soos tipiese fekale coliformorganismes volgens die toetse wat vir die kwaliteitskontrole van water gebruik word nie. Dit, tesame met die bevinding dat enterotoksigene *E. coli* (LT) en *K. pneumoniae* (LT) in betekenisvolle getalle uit water en riool geïsoleer kan word, dui op 'n moontlike bron van enterotoksigene infeksies. Hierdie bevindinge bepleit 'n herevaluering van die status van indikatororganismes en gesondheid standarde vir water vir menslike gebruik.

ABSTRACT

A variety of potential enteropathogenic micro-organisms could be incriminated in 97,4% of acute cases of sporadic infantile gastroenteritis. Although multiple infections occurred frequently, enterotoxigenic *Enterobacteriaceae* (46,2%), rotavirus (43,6%), enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes (38,5%), *Staphylococcus aureus* (15,4%), *Salmonella* species (5,1%), *Shigella* species (5,1%), *Candida albicans* (2,6%), *Candida krusei* (2,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (2,6%), *Bacillus cereus* (2,6%) and hemolytic *E. coli* were implicated as causative agents. Unassociated enterotoxigenic *Enterobacteriaceae* were more frequently isolated than others.

Cholera-like labile toxins (LT), stable toxin (ST) or a combination of both (ST + LT) were shown to be produced by various members of *Enterobacteriaceae*. The various toxins could be demonstrated in 5 *E. coli* (LT), 4 *E. coli* (ST), 2 *E. coli* (ST + LT), 5 *Klebsiella pneumoniae* (LT), 2 *Enterobacter cloacae* (LT), 1 *Enterobacter aerogenes* (LT) and 1 *Proteus vulgaris* (LT). Labile toxins from the various genera induce mutually variable but high level accumulation of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) of Chinese hamster ovary K1 (CHO-K1) cells. Induction of cAMP is neutralised to high titre by antiserum to cholera. Pretreatment of the various labile toxins with GM₁ ganglioside or blocking of receptors on CHO-K1 cells by the B subunit of cholera similarly prevent the accumulation of cAMP. This relationship with cholera suggests a similar mechanism of diarrhoea induction.

The plasmid (Ent) mediated nature of enterotoxin synthesis was demonstrated for ST and ST + LT producing *E. coli* strains. These determinants were transferred to non-enteropathogenic *E. coli* K12 strains by conjugation. Similarly co-transfer of Ent (ST + LT) and resistance determinants coding for sulphafurazole, ampicillin, carbenicillin and tetracycline from enteropathogenic *E. coli* serotype, 0128:K67:H27, to non-enteropathogenic *E. coli* K12 were accomplished. These findings imply diagnostic and therapeutic complications in the diagnosis and treatment of gastroenteritis.

Some toxin producers such as *E. coli* (ST), *K. pneumoniae* (LT), *Enterobacter* (LT) species and *P. vulgaris* (LT) do not behave as typical faecal coliforms as judged by tests used for water quality control. This, as well as the isolation in significant quantities of enterotoxigenic *E. coli* (LT) and *K. pneumoniae* (LT) from water and sewage, may indicate a possible source of enterotoxigenic infections. These findings call for a review of the status of indicator organisms and of health standards for water for human consumption.

INHOUDSOPGAWE

Bladsy

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1	Omskrywing van gastroënteritis	1
1.2	Geografiese verspreiding en voorkoms van die siekte	1
1.3	Klassieke enteropatogene organismes in die etiologie van gastroënteritis	2
1.4	Die invloed van die sewende cholera pandemie	5
1.4.1	Die molekulêre struktuur van choleraagen	6
1.4.2	Antigeniteit van <i>V. cholerae</i> enterotoksien	8
1.4.3	Genetiese aspekte van choleraagensintese	10
1.4.4	Die werking van <i>V. cholerae</i> enterotoksien	10
1.5	Enterotoksiene van <i>E. coli</i>	14
1.6	Enterotoksiene by ander bakterieë	17
1.7	Die genetiese meganisme van enterotoksienproduksie by <i>E. coli</i>	19
1.8	Ekstrachromosomale elemente wat bydra tot bakteriese enteropatogeniteit	19
1.9	Virusse in die etiologie van gastroënteritis	22
1.10	Bronne van enteropatogene organismes	24
1.11	Doelstellings	26

HOOFSTUK 2

MIKROËRGANISMES AS POTENSIEËLE OORSAKE VAN SPORADIESE SUIGELINGSGASTROËNTERITIS

INLEIDING

2.1	Vroeë ondersoeke in Suid-Afrika	27
2.2	Doelstelling	28

WERKWYSE

2.3	Die keuse van pasiënte en kontroles	28
2.4	Monsterneming	31
2.5	Metodes vir die isolering van enteropatogene bakterieë	31
2.5.1	Identifikasie van isolate	34

2.5.2	Serotipering van <i>E. coli</i>	40
2.5.3	Bereiding van enterotoksiene	41
2.5.4	Demonstrasie van enterotoksiene	42
2.5.4.1	Die bepaling van stabiele toksien	43
2.5.4.2	Die bepaling van labiele toksien	45
2.5.5	Demonstrasie van indringingsvermoë	47
2.5.5.1	Die marmot keratokonjunktivitis-toets (Serény toets)	47
2.5.5.2	Die Hela-seltoets	47
2.5.6	Demonstrasie van hemolisienproduksie	48
2.6	Demonstrasie van parasiete	48
2.7	Die bepaling van rotavirus in stoelgange	48
2.7.1	Elektronmikroskopie	48
2.7.2	Die komplementbindingstegniek	49

RESULTATE

2.8	Voorkoms en verspreiding van potensiële enteropatogene organismes	50
2.8.1	Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	53
2.8.2	Enteropatogene serotipes van <i>E. coli</i>	60
2.8.3	<i>Salmonella</i> en <i>Shigella</i> spesies	63
2.8.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	63
2.8.5	Eenmalige patogene isolate	63
2.8.6	Parasiete	67
2.8.7	Rotavirus	67
2.9	Omvattende bevindings	68

BESPREKING

2.10	Enterotoksigene <i>Enterobacteriaceae</i>	70
2.11	Ander toksienproduseerders en eenmalige isolate	75
2.12	Enteropatogene serotipes van <i>E. coli</i>	78
2.13	Rotavirus	83
2.14	Gevolgtrekkings	85

HOOFSTUK 3

DIE AARD EN MEGANISME VAN DIARREE-INDUKSIE DEUR ENTEROTOKSIENE VAN VERSKILLENDE GENERA

INLEIDING

3.1	Die werking van choleraagen en <i>E. coli</i> LT	86
-----	--	----

	Bladsy
3.2 Doelstellings	87
WERKWYSE	
3.3 Organismes ondersoek	88
3.4 Toksienbereiding	88
3.5 Neutralisering van morfologiese veranderinge by CHO-K1 selle	88
3.6 Stimulering en neutralisering van verhoogde intrasellulêre cAMP	90
3.7 Behandeling van toksienreseptore met B subeenheid	90
3.8 Behandeling van enterotoksiene met GM ₁ gangliosied	91
3.9 CHO-K1 selkweking en behandeling	91
3.10 Die bepaling van intrasellulêre cAMP	92
RESULTATE	
3.11 Neutralisering van cAMP-afhanklike morfologiese veranderinge	95
3.12 Induksie en neutralisering van verhoogde intrasellulêre cAMP	97
3.13 Inhibering van verhoogde cAMP deur B subeenheid	99
3.14 Inaktivering van enterotoksiene deur GM ₁ gangliosied	99
BESPREKING	
3.15 Die choleraagenagtige aard van enterotoksiene van verskillende genera	102
3.16 Die aktiwiteit van enterotoksiene van verskillende genera	103
3.17 Die meganisme van diarree-induksie deur enterotoksiene van verskillende genera	105
3.18 Gevolgtrekkings	106
HOOFSTUK 4	
DIE GENETIESE AARD VAN ENTEROTOKSIGENE BAKTERIEË UIT GASTROËNTERITIS PASIËNTE	
INLEIDING	
4.1 Plasmiede as bepalers van enteropatogeniteit	108
4.2 Doelstellings	109
WERKWYSE	
4.3 Organismes ondersoek	109
4.4 Konjugasietegnieke	110
4.4.1 Die bepaling van antibiotiese bestandheid	112

4.4.2 Seltellings en verdunnings	112
4.4.3 Demonstrasie van Ent by transkonjugante	113
4.5 Isolasië van plasmied DNA	113
4.5.1 Elektronmikroskopie van plasmied DNA	115

RESULTATE

4.6 Oordragsfaktore en Ent by Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	115
4.7 Ekstrachromosomale DNA by Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	120

BESPREKING

4.8 Die aard en implikasies van konjugeerbare Ent by Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	126
4.9 Die voorkoms en betekenis van ekstrachromosomale DNA by Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	130
4.10 Gevolgtrekkings	133

HOOFSTUK 5

ENTEROTOKSIGENE BAKTERIEË IN RIOOL EN WATER EN HUL ROL AS KWALITEITINDIKATORE VAN WATER

INLEIDING

5.1 Die voorkoms van Tox ⁺ bakterieë in die natuur	135
5.2 Indikatororganismes en die kwaliteit van water	135
5.3 Doelstellings	136

WERKWYSE

5.4 Die bepaling van die coliformgedrag van Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	136
5.5 Die bepaling van enterotoksigene fekale coliformorganismes in riool en water	139
5.6 Die bepaling en neutralisering van verhoogde intrasellulêre cAMP	141

RESULTATE

5.7 Coliformgedrag van Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	141
5.8 Die voorkoms van Tox ⁺ <i>E. coli</i> en <i>K. pneumoniae</i> in riool en water	143
5.9 Cholera-geenagtige aard van <i>E. coli</i> 2W6 labiele toksien	146

BESPREKING

5.10	Die voorkoms en belang van Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i> in riool en water	146
5.11	Die status en belang van indikatororganismes as kwaliteitstandaarde van water	149
5.12	Gevolgtrekkings	152
6.	OPSOMMING	153
7.	DANKBETUIGING	154
8.	AANHANGSEL	156
9.	LITERATUURVERWYSINGS	160

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1 Omskrywing van gastroënteritis

Gastroënteritis kan beskou word as 'n versameling van akute diarree=siektes wat gewoonweg ook bekend staan as die diarree en disenterieë. Dit moet noodwendig as 'n sindroom beskou word vanweë die uiteenlopende oorsake daarvan. In Sommige gevalle is die oorsake van die siekte bepaalbaar en spesifiek. In die meeste gevalle kan egter geen bepaalbare oorsake hetsy infektief, deur voedingsgebreke of andersins gevind word nie (Gordon, 1971).

Klinies gesproke vertoon die siekte 'n biologiese gradiënt wat wissel van onopsigtelike infeksies tot ernstige manifestasies daarvan met 'n hoë sterftesyfer. Gordon, Chitkara en Wyon (1963) en Gordon, Béhar en Scrimshaw (1964) voer aan dat die meeste akute diarreesiektes aansteeklik van aard is. Oor die algemeen kan daar egter nie op kliniese gronde onderskeid getref word met betrekking tot die spesifieke oorsaak nie. Los tot waterige stoelgange wat meer dikwels as normaal voorkom is 'n uitstaande gemeenskaplike simptoom (Gordon *et al.*, 1963).

Alhoewel akute gastroënteritis onder alle ouderdomsgroepe aangetref word is die voorkomssyfer daarvan die hoogste onder kinders jonger as vyf jaar. Volgens Gordon (1971) is die voorkomssyfer by verre die hoogste onder kinders in hulle eerste twee lewensjare en kom die meeste gevalle sporadies voor.

1.2 Geografiese verspreiding en voorkoms van die siekte

Verskeie navorsers waaronder Gordon (1971), Déan, Ching, Williams en Harden (1972), Gorbach en Khurana (1972), Echeverria, Blacklow en Smith (1975), Guerrant, Moore, Kirschenfeld en Sande (1975), Nalin, McLaughlin, Rahaman, Yunus en Curlin (1975), Ryder, Sack,

Kapikian, McLaughlin, Chakraborty, Rahman, Merson en Wells (1976), Greeff, Schoub, Lecatsas en Prozesky (1977) en Schoub, Greeff, Lecatsas, Prozesky, Hay, Prinsloo en Ballard, (1977), het aange=toon dat gastroënteritis 'n wêreldwye verspreiding geniet. Nietemin kom dit minder dikwels in industriële lande voor en is die sterftesyfer daar laag (Gordon 1971). In die ontwikkelende lande lyk die prentjie anders. Volgens Gordon *et al.* (1963; 1964) en Gordon (1971) is die siektesyfer sowel as die sterftesyfer hoog. Gordon (1971) dui aan dat sterftes aan diarreesiektes vir jong kinders in Guatamala op 17 per 1000 gevalle te staan kom. Dit is 25 keer hoër as in die V S A. Die sterftesyfer in Indië is selfs hoër. Dáár sterf sowat 1,4 miljoen kinders per jaar aan gastroënteritis en hierdie syfer sluit cholera gevalle uit (Editorial, 1975b).

Die Redakteur van die Lancet (Editorial, 1975b.) wys daarop dat die sterftesyfer vir gastroënteritis in Afrika ook besonder hoog is. In Suid-Afrika is dit die hoof oorsaak van sterftes onder suigeling van die Swart, Kleurling en Asiatiese gemeenskappe. By die Blanke gemeenskap neem dit die tweede plek in naas pneumonie (Spencer en Coster, 1969; Departement van Statistiek, Pretoria, 1974).

Alhoewel die siekte dus duidelik 'n globale verspreiding vertoon (Editorial, 1975b) bestaan daar geografiese verskille met betrekking tot die siektesyfer sowel as die sterftesyfer. Hierdie verskille is volgens Gordon (1971) nie te wyte aan klimatologiese faktore nie maar word bepaal deur verskille in die sosiaal-kulturele omgewing. Hierby speel geassosieerde biologiese faktore soos voedsel- en watervoorsiening 'n belangrike rol.

1.3 Klassieke enteropatogene organismes in die etiologie van gastroënteritis

Nieteenstaande die belangrikheid van hierdie siekte, kon erkende enteropatogene organismes tot onlangs net in sowat 20-40 persent van gevalle geïsoleer word (Guerrant *et al.*, 1975; Sack, 1975; Robins-Browne en Koornhof, 1977).

Die klassieke enteropatogene organismes wat wel gevind word is die bekende *Salmonella* en *Shigella* spesies. Hierby word die sogenaamde enteropatogene serotipe van *E. coli* ook alreeds die afgelope 30 jaar, veral op epidemiologiese gronde, geïmpliseer. *Vibrio cholerae* is belangrik in dié streke waar cholera endemies voorkom. Soms word ander organismes waaronder sekere virusse, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* en *Staphylococcus aureus*, ook as oorsake betrek. Patogene Protozoa soos *Entamoeba histolytica* en *Giardia lamblia* en parasitiese wurms is ook al as oorsake by gastroënteritis geïmpliseer (Gordon et al., 1963).

Die enteropatogene rol van *Salmonella* en *Shigella* spesies is reeds goed bekend. Volgens Jawetz, Melnick en Adelberg (1972) en Cruickshank, Duguïd, Marmion en Swain (1973) kan salmonellae drie hoof klasse siektes, of kombinasies daarvan, veroorsaak.

Ingewandskoors betrek gewoonlik *S. typhi*, *S. paratyphi* en *S. schottmülleri*. Die organismes word deur voedsel of drank ingeneem en beland in die dunderm. Hier dring hulle die dermwand binne en bereik die limfbuise. Deur middel van die ductus thoracicus kan hulle die bloedstroom binneval en vandaar ander organe bereik. 'n Verskeidenheid letsels van onder andere die limfwefsel, lewer, galblaas en longe mag ontstaan.

Septisemie, veral deur *S. choleraesuis*, kan plaasvind wanneer die organismes op 'n vroeë stadium in die siekte die bloedstroom binneval. Verspreiding van die organismes vind plaas en dit kan onder andere verettering, absesvorming, meningitis, osteomiëlitis, pneumonie of endokarditis tot gevolg hê.

Gastroënteritis word hoofsaaklik deur *S. typhimurium*, *S. enteritidis* of *S. derby* veroorsaak. 'n Geweldige irritasie van die dermwand lei tot 'n elektroliet- en vloeistofverlies. Die bloedstroom word egter nie binnegeval nie en verspreiding na ander organe vind ook nie plaas nie.

Shigellae word deur ingestie ingeneem. Hulle heg vas aan die epiteel= selle van villi van die dikderm mukosa. Hier induseer die basille die epiteelselle om hulle te ingesteer waar hulle dan vermeningvuldig en lateraal na ander epiteelselle versprei. Soms dring hulle so ver as die lamina propria in. Shigellae val egter selde ander weefsel binne en bakteremie is seldsaam.

Die graad van die siekte word min of meer deur die betrokke spesie bepaal. *Shigella dysenteriae* veroorsaak die hewigste siekte. Afgesien van die indringingsvermoë skei hierdie spesie ook 'n soort enterotoksien uit. Laasgenoemde veroorsaak vloeistofakkumulasie in die dermkanaal maar dit het ook 'n neurologiese werking. Geen soortgelyke toksien is normaalweg by ander *Shigella* spesies teenwoordig nie.

In teenstelling met *S. dysenteriae* veroorsaak *S. sonnei* 'n baie matige aandoening. Enkele los stoelgange en 'n bietjie abdominale ongerief is die reël. *Shigella flexneri* en *S. boydii* kan siekte so erg as *S. dysenteriae* veroorsaak maar is gewoonlik matiger as laasgenoemde.

E. coli word nie as 'n patogene organisme beskou wanneer dit tot sy normale ekologiese nis, die distale gedeelte van die dermkanaal van die mens, beperk word nie (Gorbach, 1971; Sack, 1976a). 'n Enkele erkende uitsondering bestaan egter by kinders onder twee jaar met diarree. In sulke gevalle is eers deur Bray (1945) en later deur Giles, Sangster en Smith (1949), Taylor, Powell en Wright (1949) en Kirby, Hall en Coackley (1950) aangetoon dat uitbreke van diarree in kleuterskole geassosieer word met sekere serotipes van *E. coli*. Volgens Giles *et al.* (1949) was die sterftesyfer in sulke gevalle dikwels so hoog as 50 persent.

Een van die eerste serotipes van *E. coli* wat met diarree-uitbreke by jong kinders geassosieer is (Taylor, *et al.*, 1949), is die bekende serotipe O 111. Tans word daar sowat 33 enteropatogene serotipes van *E. coli* uit verskillende geografiese areas van die wêreld erken (Sakazaki, Tamura en Saito, 1967; Ørskov, Ørskov, Jann en Jann, 1971; Sakazaki, Tamura en Nakamura, 1974; Sakazaki, Tamura, Nakamura,

Kurata, Gohda en Takeuchi, 1974). Hiervan kom sowat 16 algemeen voor. Bewyse vir die enteropatogeniteit van hierdie serotipes van *E. coli* het aanvanklik uitsluitlik berus op epidemiologiese omstandighedsgetuienis. Deur groot hoeveelhede van serotipes O55 B5 van *E. coli* aan 'n vrywillige kind (Neter en Shumway, 1950) en O111 B4 aan vrywillige volwassenes (Kirby *et al.*, 1950; Ferguson en June, 1952; June, Ferguson en Worfel, 1953) te voer, kon aangetoon word dat hierdie organismes diarree veroorsaak. Die meganismes waarvolgens hierdie enteropatogene serotipes van *E. coli* diarree verwek, sou, later uiteenlopend van aard blyk te wees (sien hieronder). Sakazaki *et al.* (1967) kon aantoon dat 'n klein klompie van hierdie serotipes die vermoë tot indringing, soortgelyk aan dié van *Shigella* spesies, besit. Die belangrikste bydraes tot 'n beter begrip van die patogenese van gastroënteritis is egter gemaak kort voor en sedert die aanvang van die sewende cholera pandemie in 1960-1961 (Craig en Pierce, 1976).

1.4 Die invloed van die sewende cholera pandemie

Reeds in 1884 het Robert Koch voorgestel dat cholera 'n toksinose is (aangehaal deur Craig en Pierce, 1976). Die sentrale rol wat die enterotoksien van *Vibrio cholerae* in die patogenese van die siekte speel is egter eers tydens die huidige cholera pandemie vasgestel. Gedurende die afgelope 16 jaar kon belangrike vrae in verband met die epidemiologie, immunologie, patogenese en behandeling van cholera, sowel as gastroënteritis veroorsaak deur *E. coli*, beantwoord word.

Die kennis wat ingewin is uit die studies aangaande die patogenese van *V. cholerae*, vorm 'n basis vir die ontplooiing van die rol wat *E. coli* en ander enterotoksigene bakterieë in die patogenese van akute gastroënteritis speel.

Die aanvoorwerk vir die bestudering van die enterotoksien van *V. cholerae*, met behulp van die konyn-ileumtus, kan grootliks aan De en sy medewerkers toegeskryf word (De en Chatterje, 1953; De, Bhattacharya en Sarkar, 1956). Dit het gelei tot die suiwering

en biochemiese karakterisering van die enterotoksien of choleraageen van *V. cholerae* deur Finkelstein en Lo Spalluto (1969, 1970) en tot die opheldering van sleutelbegrippe in verband met die patogenese van cholera. Die huidige begrip van die eienskappe van choleraageen en die werking daarvan verseker dat cholera nou as die moedermodel van die bakteriese ingewandsiektes beskou kan word.

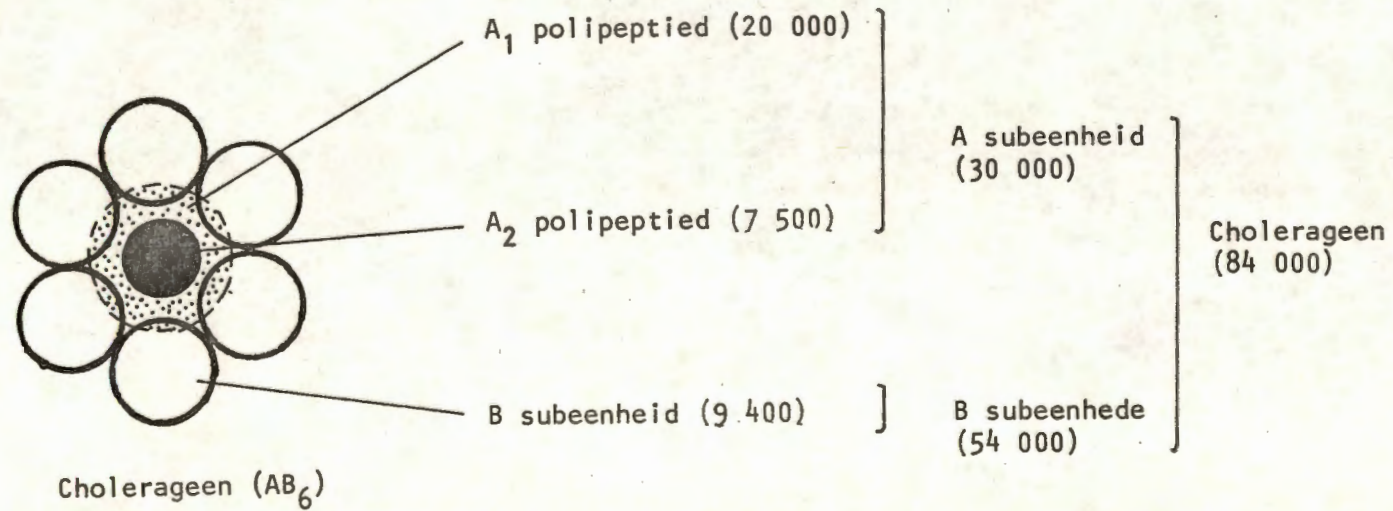
1.4.1 Die molekulêre struktuur van choleraageen

Die beskikbaarstelling van hoogs gesuiwerde choleraageen deur Finkelstein en sy medewerkers, was grootliks daarvoor verantwoordelik dat die struktuur en die werking daarvan, sowel as dié van ander verwante enterotoksiene, vandag tot 'n groot mate verstaan word.

Hoofsaaklik deur die werk van Finkelstein en LoSpalluto (1969, 1970), LoSpalluto en Finkelstein (1972), Lönnroth en Holmgren (1973) en Holmgren en Lönnroth (1975) bestaan daar tans konsensus dat choleraageen 'n toksiese proteien is wat deur *V. cholerae* in die lumen van die dermkanaal uitgeskei word.

Choleraageen het 'n molekulêre massa van 84 000 daltons (Finkelstein en LoSpalluto, 1969, 1970; Lai, Mendez en Chang, 1976) wat uit twee subeenhede A en B bestaan (sien figuur 1-1). Volgens Kurosky, Markel, Touchstone en Petersen (1976), Lai *et al.* (1976), Ohtomo, Muraoka, Tashiro, Zinnaka en Amako (1976) en Van Heyningen (1976) bestaan die A subeenheid uit twee polipeptiedkettings A_1 en A_2 . Hierdie twee kettings is deur 'n enkele disulfiedband aanmekaar gebind. Lai *et al.* (1976) bereken die molekulêre massa van A_1 op 20 000 en A_2 op 7 500 daltons (sien figuur 1-1).

Die B subeenheid van die choleraageenmolekule is 'n polipeptied met 'n molekulêre massa van 9 400 daltons en bevat twee sisteïenreste. Lai *et al.* (1976) voer aan dat hierdie sisteïenreste 'n disulfiedbrug met ander B subeenhede vorm sodat 'n kettingring van ses B subeenhede om een A subeenheid van die natuurlike choleraageenmolekule gevorm word. Dit gee dan 'n formule van AB_6 aan choleraageen (sien figuur 1-1).



Figuur 1-1. Die molekulêre struktuur van choleraagen.

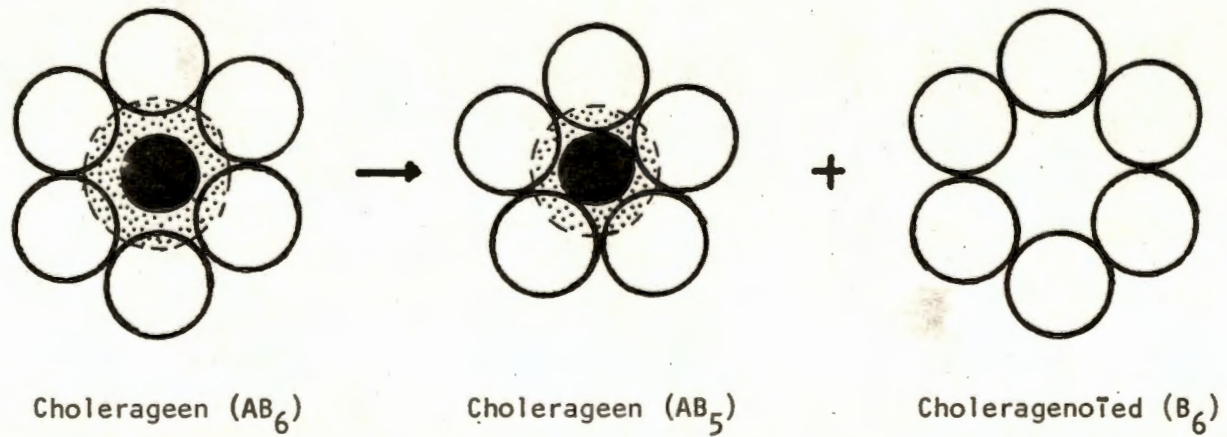
Choleratoksien word deur *V. cholerae* gesintetiseer en uitgeskei in die vorm AB_6 wat uit een A subeenheid en ses polipeptied B subeenhede bestaan. Die ring wat deur die B subeenhede gevorm word omsluit die A_1 peptied gedeeltelik en die A_2 peptied geheel en al (figuur 1-1).

'n Sekere hoeveelheid choleragenoïed word ook natuurlikerwys deur die organisme gesintetiseer en in die medium uitgeskei (Ohtomo *et al.*, 1976). Hierdie choleragenoïed bestaan net uit B subeenhede en is nie toksies nie (sien hieronder).

Tydens die suiweringsproses ondergaan die subeenhede van cholera=toksien 'n herrangskikking (Finkelstein en LoSpalluto, 1970; Lai *et al.*, 1976). Gevolglik word 'n aantal molekules wat die A subeenheid en net vyf B subeenhede bevat (AB_5), gevorm. Choleragenoïed, wat slegs uit B subeenhede (B_6) bestaan, kan ook tydens die suiwerings=proses gevorm word (sien figuur 1-2). Presiese gegewens oor die molekulêre massas van die komponente van die cholera=geenmolekule (AB_6) word deur die biochemiese en biofisiese metodes wat tydens die suiweringsproses toegepas word, beïnvloed. Om hierdie redes bestaan daar kleiner verskille in die waardes wat deur verskillende werkers gepubliseer is (Van Heyningen, 1976; Kurosky, *et al.*, Ohtomo *et al.*, 1976). Nietemin is daar bevestiging van die model vir die vorm van die cholera=geenmolekule soos voorgestel deur Lai *et al.* (1976). Elektron mikro=foto's, gepubliseer deur Ohtomo *et al.* (1976), toon duidelik dat die A subeenheid omring is deur B subeenhede. Choleragenoïed toon slegs die ringvorm van die B subeenheid met die A subeenheid afwesig.

1.4.2 Antigeniteit van *V. cholerae* enterotoksien

Antitoksien teen cholera=geen en teenliggame teen die B subeenheid kan maklik in proefdiere soos konyne en muise berei word. Deur middel van immunodiffusie en dergelike eksperimente kon Holmgren (1973b), Ohtomo *et al.* (1976) en Van Heyningen (1976) aantoon dat die holotoksien en choleragenoïed 'n hoof antigeniese bepaler deel maar dat eersgenoemde 'n bykomende bepaler besit. Ohtomo *et al.* (1976) en Van Heyningen (1976) kon later aantoon dat hierdie bykomende bepaler te wyte is aan die A subeenheid wat by die holotoksien teenwoordig is. Antitoksien teen cholera=geen reageer goed met 6f subeenheid A



Figuur 1-2. Die vorming van cholera toxin B₆.

of subeenheid B. Antiserum teen subeenheid A reageer egter glad nie met B nie. Die omgekeerde is ook waar (Van Heyningen, 1976). Hierdie eksperimente dui dus daarop dat daar geen antigeniese ooreenkomste tussen die A en B peptiede van cholerae bestaan nie.

1.4.3 Genetiese aspekte van cholerae sintese

Die gene verantwoordelik vir die sintese van cholerae is geleë op die chromosoom van die organisme (Gerdes en Romig, 1975). Van Heyningen (1976) postuleer dat subeenhede A en B waarskynlik die produkte van verskillende chromosomale gene van *V. cholerae* is omdat A en B in baie opsigte twee totaal verskillende proteïene is. Verdere bevestiging vir sy argument word deur Ohtomo *et al.* (1976) verstrekk. Hulle het bevind dat wanneer individuele B subeenhede gepolimeriseer word 'n produk gevorm word wat identies is aan natuurlike cholerae (B₆). Die subeenhede A en B word waarskynlik gelyktydig deur *V. cholerae* geproduseer en aanmekaar gesit. Wanneer die B subeenheid in oormaat geproduseer word polimeriseer dit spontaan en word as cholerae, die nie toksiese produk, deur die organisme vrygestel.

1.4.4 Die werking van *V. cholerae* enterotoksien

Reeds in 1855 skryf Dr John Snow: "It would seem that the cholera poison, when reproduced in sufficient quantity, acts as an irritant on the surface of the stomach and intestine, or, what is more probable, it withdraws fluid from the blood circulating in the capillaries, by a power analogous to that by which the epithelial cells of the various organs abstract the different secretion in the healthy body". Aangehaal deur Sharp en Hynie, (1971).

Die meganisme waarvolgens cholerae vir die massiewe verlies aan water en elektroliete by pasiënte verantwoordelik is word egter nou eers beter verstaan. Banwell, Pierce, Mitra, Caranasos, Keimowitz, Mondal en Manji (1968) en Carpenter en Greenough (1968) het aangetoon dat 'n toename in die sekresie van isotoniese vloeistof

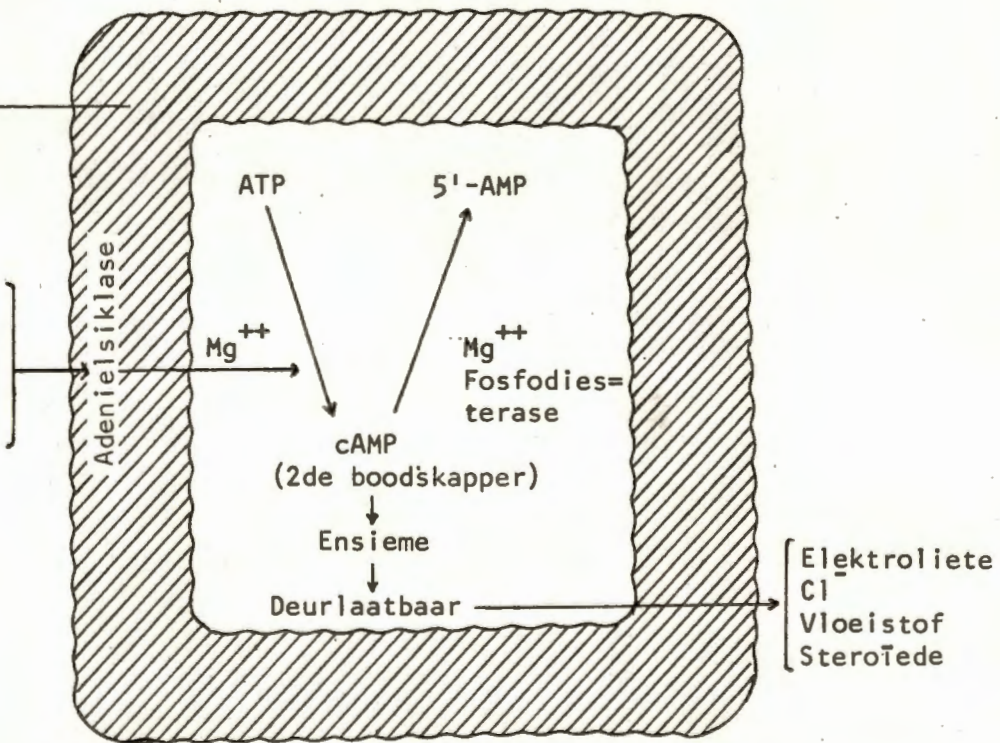
as gevolg van die werking van cholera-gen oor die hele lengte van die dunderm kan plaasvind. Verskeie eksperimente met proefdiere soos konyne en honde (Field, Plotkin en Silen 1968a en b; Pierce, Carpenter, Elliot en Greenough, 1971) het aangetoon dat die toksien die mukosa van die ileum tot so 'n mate stimuleer dat 'n aktiewe sekresie van chloried (Cl^-) en 'n inhibisie van Na^+ opname plaasvind. Volgens Sharp en Hynie (1971) vind hierdie sekretoriese proses tot so 'n mate plaas dat die herabsorpsievermoë oorskry word. Die water word dan osmoties in die lumen van die dermkanaal gehou en hewige diarree volg. Die gevolge hiervan kan fataal wees.

Die eerste aanduidings vir die spesifieke werking van cholera-gen het na vore gekom uit die werk van Field *et al.* (1968a en b), Schafer, Lust, Sircar en Goldberg (1970), Chen, Rohde en Sharp (1971), Field (1971), Kimberg, Field, Johnson, Henderson en Gershon (1971) en Sharp en Hynie (1971). Die belangrike bevinding deur hierdie werkers was dat *V. cholerae* enterotoksien 'n membraangebonde ensiem van soogdierselle, adenielsiklase, aktiveer (sien figuur 1-3). Adenielsiklase speel onder andere 'n belangrike rol in die elektrolietbeheermeganisme van soogdierselle. Stowwe soos hormone, cholera-gen en *E. coli* enterotoksien tree as eerste boodskappers op deur adenielsiklase te aktiveer. Sodanige aktivering lei tot 'n verhoging in die konsentrasie intrasellulêre adenosien - 3',5'-monofosfaat (sikliese AMP) van die soogdiersel. Die effek van so 'n toename in die konsentrasie sikliese AMP (cAMP) op die sel is velerlei van aard. Wat wel van belang is vir hierdiestudie is die feit dat die deurlaatbaarheid van die sel onder andere vergroot en dat elektroliettransportmeganismes van die sel verander (sien figuur 1-3). Hierdie veranderinge in elektroliettransport lei tot oormatige vloeistofakkumulasie in die dermkanaal.

Onder eksperimentele toestande aktiveer cholera-gen die adenielsiklase - cAMP-sisteem van baie soorte selle waaronder epiteelselle van die mukosa, lewerselle, vet selle, bloedplaatjies en duif eritrosiete (Field *et al.*, 1968a en b; Vaughan, Pierce en Greenough, 1970; Kimberg *et al.*, 1971; Gill en King (1975). Twee sellyne naamlik, "Chinese hamster ovary" K1 selle (Hsie, Jones en Puck, 1971; Hsie

SOOGDIERTEIKENSEL

- Membraan
- 1ste Boodsappers
- 1) Cholerageen
 - 2) *E. coli* LT
 - 3) Hormone



Figuur 1-3. Meganisme van diarree-induksie deur middel van stimulering van die adenielsiklase-cAMP-sisteen van die soogdiersel.

en Puck, 1971; Puck, Waldren en Hsie, 1972; Guerrant, Brunton, Schnaitman, Rebhun en Gilman, 1974) en muis Y1 bynierselle (Donta, King en Sloper, 1973; Donta en Smith, 1974; Sack en Sack, 1975; Donta, 1976), reageer met kenmerkende morfologiese veranderinge op stimulering deur choleraeën en verwante enterotoksiene. Gevolglik word hierdie twee sellyne tans wyd gebruik om die teenwoordigheid van choleraeënagtige enterotoksiene aan te dui (sien hieronder). In 'n siektetoestand is die toksien se werking egter beperk tot daardie selle van die dermkanaal waarmee dit in kontak kom (Gill en King, 1975).

'n Belangrike aspek van die werking van choleraeën het voortgespruit uit die werk van Cuatrecasas (1973*b* en *c*), Holmgren (1973*a* en *b*), Holmgren, Lönnroth en Svennerholm (1973*a*), King en Van Heyningen (1973), Pierce (1973), Van Heyningen, S (1974) en Van Heyningen, W (1974). Hulle kon aantoon dat daar 'n reseptorsetel vir die spesifieke binding van choleraeën aan selmembrane bestaan. Hierdie reseptorsetel is gekenmerk as 'n komplekse glikolipied; galaktosiel-N-asetielgalatosa= miniel (sialosiel) laktosielseramied of kortweg GM₁ gangliosied. Die GM₁ gangliosied is 'n normale komponent van die selmembrane van soogdierselle. Choleraeën het 'n hoë affiniteit vir die GM₁ gangliosied, bind daaraan en word sodoende op die seloppervlakte gekonsentreer. Choleraenoëd, die biologiese onaktiewe toksien derivaat, bind net so goed as choleraeën aan die reseptor maar is nie in staat om die adenielsiklase - cAMP-sisteem van die sel te aktiveer nie (Cuatrecasas, 1973*d*; Holmgren, 1973*a* en *b*; Holmgren *et al.*, 1973*a*). Wanneer selle eers met choleraenoëd behandel word bind dit aan al die beskikbare reseptore en blokkeer dan die werking van choleraeën wanneer laasgenoemde agterna by die behandelde selle gevoeg word (Cuatrecasas, 1973*d*; Pierce, 1973). Ons weet nou dat die B-sub= eenheid van die choleraeënmolekule (sien figuur 1-1) verantwoordelik is vir die spesifieke binding van die toksien aan GM₁ gangliosiedsetels op selmembraanoppervlakte (Van Heyningen, Carpenter, Pierce en Greenough, 1971; Cuatrecasas, 1973*b*, *c* en *d*; Holmgren *et al.*, 1973*a*; King en Van Heyningen, 1973; Lönnroth en Holmgren, 1973; Van Heyningen, 1974, 1976).

Op grond van hulle eksperimentele bevindings stel Bennett en Cuatrecasas (1975) voor dat die toksienmolekule, of 'n gedeelte daarvan, die fosfolipied dubbellaag van selle indring en as 'n integrale membraanproteïen 'n kompleks met die membraangebonde adenielsiklase vorm. Verskeie werkers kon hierna aantoon dat die A₁ peptied die onontbeerlike aktiewe deel van die choleraagenmolekule is (Gill en King, 1975; Berkenbile en Delaney, 1976; Gill, 1976; Holmgren en Lönnroth, 1976; Ohtomo *et al.*, 1976; Van Heyningen, 1976). Hierdie A₁ peptied is dus daarvoor verantwoordelik dat die adenielsiklase-cAMP-sisteem van die sel geaktiveer word. Die rol van die A₂ peptied is nog nie duidelik nie maar dit mag behulpsaam wees by die indringingsproses van die A peptied tot binne in die sitosol van die sel (Berkenbile en Delaney, 1976).

1.5 Enterotoksiene van *E. coli*

In 1956 isoleer De en sy medewerkers (De *et al.*, 1956) *E. coli* stamme uit pasiënte met kliniese cholera maar hulle kon geen *V. cholerae* vind nie. Sommige van hierdie *E. coli* stamme kon vloei-stofakkumulاسie, identies aan dié van *V. cholerae*, in die konyn-ileumlus veroorsaak. Hulle bevind ook dat identiese serotipes van *E. coli* toksigeen of nie-toksigeen mag wees. Die vermoede ontstaan dus dat serotipering nie bewys van die enteropatogeniteit van *E. coli* kan lewer nie (Goldschmidt en Du Pont, 1976; Sack, 1976b). De *et al.* (1956) wend egter geen verdere pogings aan om na 'n enterotoksien by *E. coli* te soek nie. Tien jaar later rapporteer Taylor en Bettelheim (1966) die teenwoordigheid van 'n enterotoksienagtige bestanddeel in kulture van *E. coli* wat met chloroform gedood is. Behalwe die bevinding dat die stof hoogs labiel is en dat dit vloei-stofsekresie in die konyn-ileumlus verwek, karakteriseer hulle dit nie verder nie.

Die momentum vir die ontrafeling van die rol wat *E. coli* in gastroënteritis speel het egter voortgespruit uit die werk van Smith en Halls (1967a en b). Hulle kon aantoon dat 'n enterotoksien,

teenwoordig in selvrye filtrate van *E. coli*, verantwoordelik was vir diarree by pasgebore en pasgespeende varkies. Die eienskappe van hierdie enterotoksien was egter in baie opsigte verskillend van dié van choleraegeen. 'n Uitstaande kenmerk is die hitte stabiliteit. In teenstelling met choleraegeen kan verhitting tot 100°C vir 30 minute nie die aktiwiteit van stabiele toksien (ST) vernietig nie (Smith en Halls, 1967b; Kohler, 1968; Smith en Gyles, 1970; Bywater, 1972).

Verdere eienskappe van *E. coli* ST kon vasgestel word deur met selvrye ru-preparate van die toksien te werk. Vergeleke met choleraegeen verwek ST vloeistofakkumulاسie binne 'n kort tyd (+ 4 ure in proefdiere), maar die werkingsduurte is ook kort (Evans, Evans en Pierce, 1973). Die toksien is 'n glikoproteïen, bestand teen suur (pH 1), dialiseerbaar en met 'n molekulêre massa van 1000-10000 daltons (Smith en Gyles, 1970; Gyles, 1971; Bywater, 1972; Jacks en Wu, 1974; Sack, 1975). Stabiele toksien is nie in staat om vorming van neutraliserende teenliggame te stimuleer nie (Smith en Gyles 1970).

Tot op datum is daar nog geen duidelikheid oor die wyse waarop die stabiele toksien van *E. coli* diarree verwek nie. Enkele studies dui daarop dat ST moontlik die adenielsiklase-cAMP-sisteem in die konyn-ileumlus (Al-Awqati, Wallace en Greenough, 1972) en die hond-lus (Guerrant, Ganguly, Casper, Moore, Pierce en Carpenter, 1973) stimuleer. Indirekte getuïenis vir 'n gemeenskaplike adenielsiklase aktiveringsisteem vir ST en *E. coli* labiele toksien (sien hieronder) bestaan, gegrond op die feit dat die werking van die twee toksiene nie aanvullend is nie (Pierce en Wallace, 1972; Donta en Smith, 1974; Kwan en Wishnow, 1974; Zenser en Metzger, 1974). Baie min is ook bekend omtrent die bindingsetel van ST. Daar is getuïenis dat dit nie aan gangliosied bind nie (Pierce, 1973).

Kort na die ontdekking van *E. coli* ST beskryf Gyles en Barnum (1969) 'n choleraegeenagtige hitte labiele toksien (LT) by *E. coli*. Hierdie stamme was almal afkomstig van varke met diarree. In 'n voortsetting van hulle werk toon Smith en Gyles (1970) aan dat alle toksienproduserende *E. coli* stamme ST vorm maar dat net sommige ST sowel as LT kan produseer.

Na die werk op varke het die rol wat enterotoksigene *E. coli* by gastroënteritis van die mens speel duidelik begin word. Patiënte in Calcutta, met die simptome van cholera (ryswater stoelgange, ernstige ontwatering en skok), is ondersoek. Geen *V. cholerae* kon geïsoleer word nie maar groot getalle *E. coli* (10^7 - 10^9 ml⁻¹) was teenwoordig in die proksimale dunderm (Gorbach, Banwell, Chatterjee, Jacobs en Sack, 1971; Sack, Gorbach, Banwell, Jacobs, Chatterjee en Mitra, 1971). Hierdie *E. coli* stamme het gewoonlik net tot een of twee serotipes behoort. Die organismes het ook tydens die herstellende fase uit die dunderm verdwyn, Sack *et al.* (1971) het bevind dat hierdie *E. coli* stamme 'n hitte labiele toksien produseer. Die hitte labiele toksien van menslike *E. coli* stamme is identies aan dié afkomstig van diere en is verwant aan choleraagen (sien hieronder).

'n Aansienlike mate van verwarring omtrent die ST eienskap by menslike *E. coli* stamme het tot omtrent 1973 bestaan (Sack, 1975). Gevolglik is dit moeilik om die vroeër gegewens in dié verband te interpreteer. Dit is egter nou duidelik dat daar by menslike toksigene *E. coli* stamme ook twee soorte enterotoksiene voorkom; 'n hitte labiele toksien (LT) en 'n hitte stabiele toksien (ST). Feitlik al die menslike stamme wat tot dusver ondersoek is produseer beide LT en ST gesamentlik (Sack, 1975). Onlangs het Sack (1975) stamme wat slegs ST of LT produseer geïsoleer. Die relatiewe belangrikheid van hierdie stamme in die etiologie van gastroënteritis is onbekend (Sack, 1975).

Die eienskappe van *E. coli* LT van menslike en dierlike oorsprong kom baie met dié van choleraagen ooreen. Klinies is die werkingsduur en simptome wat deur choleraagen en *E. coli* LT veroorsaak word feitlik identies (Evans *et al.*, 1973c; So, Crandall, Crosa en Falkow, 1974; Sack, 1975). *E. coli* LT is immunogenies (Gyles en Barnum, 1969). Daar is ook 'n groot mate van serologiese ooreenkoms tussen *E. coli* LT en choleraagen. Teenliggame teen die een neutraliseer die ander tot 'n mindere of meerdere mate (Evans, Evans en Gorbach, 1973; Holmgren, Söderlind en Wadström, 1973;

Smith en Sack, 1973; Guerrant *et al.*, 1974; Gyles, 1974a en b; Dorner, Jaksche en Stockl, 1976). *E. coli* LT, soos geproduseer deur verskillende serotipes van menslike en dierlike oorsprong, is immunologies verwant en waarskynlik identies aan mekaar (Evans *et al.*, 1973b; Holmgren *et al.*, 1973b; Smith en Sack, 1973; Gyles, 1974a en b; Sack en Froehlich, 1977).

E. coli LT is 'n relatief groot proteïenmolekule van $\pm 100\ 000$ daltons (Jacks en Wu, 1973; Larivière, Gyles en Barnum, 1973; Dorner *et al.*, 1976). Dit is hitte labiel deurdat inaktivering plaasvind by 60°C vir 30 minute (Gyles en Barnum, 1969). Dit is ook nie bestand teen suur nie (So *et al.*, 1974; Mundell, Anselmo en Wishnow, 1976). Verskeie werkers het aangetoon dat LT net soos choleraegeen die adenielsiklasie-cAMP-sisteem van 'n verskeidenheid soogdierselle stimuleer (Evans, Chen, Curlin en Evans, 1972; Guerrant *et al.*, 1974; Hewlett, Guerrant, Evans en Greenough, 1974; Kantor, Tao en Corbach, 1974; Kwan en Wishnow, 1974; Gill, Evans en Evans, 1976). Die LT van *E. coli* word net soos choleraegeen deur GM_1 gangliosied gebind (Holmgren, 1973a en b; Zenser en Metzger, 1974; Donta, 1976). By gebrek aan hoogs gesuiwerde LT preparate kon nog nie daarin geslaag word om dié toksien tot dieselfde mate as choleraegeen te karakteriseer nie. Om dieselfde rede bestaan daar dan ook groter verskille in gerapporteerde waardes vir die molekulêre struktuur van die *E. coli* LT molekule (Dafni en Robbins, 1976; Dorner *et al.*, 1976; Finkelstein, LaRue, Johnston, Vasil, Cho en Jones, 1976).

1.6 Enterotoksiene by ander bakterieë

Afgesien van die enterotoksien van *Shigella dysenteriae* 1, wat ook 'n neurologiese werking het, was enterotoksiene by *Shigella* en *Salmonella* spesies tot onlangs onbekend. 'n Enterotoksien, soortgelyk aan dié van *S. dysenteriae*, is nou ook by *S. flexneri* 2a beskryf (O'Brian, Thompson, Gemski, Doctor en Formal, 1977). Volgens Koupal en Deibel (1975) kon hulle aantoon dat *S. enteritidis*, wat uit

kliniese materiaal geïsoleer is, ook 'n enterotoksien produseer wat met *E. coli* ST en LT ooreenkom, 'n Cholerageenagtige toksien is verder by *S. typhimurium* aangetoon (Sandefur en Peterson, 1977).

Verskeie ander genera kan ook enterotoksiene soos die ST en LT van *E. coli* produseer. By *Klebsiella pneumoniae* en *Enterobacter cloacae*, wat uit pasiënte met tropiese spru geïsoleer is, kon die teenwoordigheid van ST aangetoon word (Klipstein, Holdeman, Corcino en Moore, 1973; Klipstein en Engert, 1975, 1976a en b). Labiele toksiene is ook gevind by sommige isolate van spesies van *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* en *Pseudomonas* afkomstig uit suigeling en jong kinders met akute gastroënteritis (Kubota en Liu, 1971; Guerrant *et al.*, 1975; Sanyal, Singh en Sen, 1975; Wadström, Aust-Kettis, Habte, Holmgren, Meeuwisse, Möllby en Söderlind, 1976a en b; Wadström, Ljungh en Wretlind, 1976; Greeff *et al.*, 1977; Schoub *et al.*, 1977). Hierbenewens is enterotoksigene *Yersinia* spesies ook by gastroënteritis geïmpliseer (aangehaal deur Wadström *et al.*, 1976a).

Staphylococcus aureus is bekend vir die patologiese effekte wat dit in die dermkanaal teweeg kan bring. Voedselvergiftiging as gevolg van die enterotoksien van hierdie organisme veroorsaak egter simptome wat klinies onderskei kan word van dié van gastroënteritis (Craig, 1972). Volgens O'Brian en Kapral (1976, 1977) sintetiseer sommige *S. aureus* stamme ook 'n deltatoksien wat adenielsiklase van die mukosa aktiveer en vloeistofakkumulاسie teweegbring.

Clostridium perfringens tipe A veroorsaak voedselvergiftiging by die mens wat gekenmerk word deur diarree en abdominale krampe (Nygren, 1962; Duncan en Strong, 1969). Sommige tipe A stamme skei 'n enterotoksien uit wat vir hierdie toestand verantwoordelik is (Stark en Duncan, 1971, 1972).

Bacillus cereus word reeds die afgelope 25 jaar as 'n oorsaak van voedselvergiftiging by mense en diere geïnkrimineer (Nygren, 1962). Dié organisme kan vloeistofakkumulاسie soortgelyk aan *Vibrio cholerae* in die konyn-ileumlus veroorsaak (Spira en Goepfert, 1972). By mense is waterige stoelgange 'n tipiese simptome (Nygren, 1962).

1.7 Die genetiese meganisme van enterotoksienproduksie by *E. coli*

Kort nadat Smith en Halls (1967a en b) die rol van enterotoksigene *E. coli* by gastroënteritis van varke beskryf het, maak hulle 'n verdere ontdekking. By 'n klein persentasie toksienproduserende (Tox^+) *E. coli*, afkomstig van vark gastroënteritis, kon Smith en Halls (1968) aantoon dat die genetiese faktor wat vir die produksie van toksien verantwoordelik is, deur middel van konjugasie na nie-toksienproduserende (Tox^-) *E. coli* en *Salmonella* spesies oorgedra kan word. Die genetiese faktor, ook genoem Ent, wat vir enterotoksienproduksie verantwoordelik is, is 'n ekstrachromosomale element of plasmied (Smith en Halls, 1968; Smith en Linggood, 1971; 1972; Skerman, Formal en Falkow, 1972; Gyles, So en Falkow, 1974; Santos, Palchaudhuri en Maas, 1975).

Twee klasse Ent plasmiede kan onderskei word: 'n homogene klas wat die produksie van LT + ST beheer en 'n heterogene klas verantwoordelik vir die produksie van ST alleen (Gyles *et al.*, 1974). Die molekulêre struktuur van een Ent (ST + LT) plasmied, P307, is tot dusver bestudeer. Sowat die helfte van die plasmied P307 is homolog aan die seksfaktor F (Santos *et al.*, 1975). Groot gebiede van die genetiese materiaal van hierdie Ent plasmied is onbekend en mag moontlik onbekende patogene eienskappe aan die organisme verleen. Die teenwoordigheid van Ent plasmiede is ook by toksigene *E. coli*, afkomstig van mense, aangetoon (Smith en Linggood, 1971; Skerman *et al.*, 1972; Gyles *et al.*, 1974). In hierdie verband is daar egter nog feitlik geen gegewens beskikbaar oor stamme van menslike oorsprong wat slegs ST of LT produseer nie (Sack, 1975).

1.8 Ekstrachromosomale elemente wat bydra tot bakteriële enteropatogeniteit

Oordraagbare sowel as nie-oordraagbare ekstrachromosomale genetiese elemente (plasmiede) kom algemeen onder *Enterobacteriaceae* voor. Dikwels word soveel as ses of meer verskillende plasmiede per sel aangetref (Hayes, 1968; Meynell, 1972; So *et al.*, 1974). Plasmiede besit 'n wye verskeidenheid genetiese bepalers. Gevolglik

verskaf die teenwoordigheid van 'n plasmied in 'n organisme addisionele genetiese potensiaal ten opsigte van oorlewing in 'n ongunstige omgewing. R plasmiede waarvan die bepalers bestandheid teen antibiotika verleen, bied byvoorbeeld beter kanse aan die organisme om in 'n antibiotika-verbruikende gemeenskap te oorleef.

Die totale plasmied inhoud van 'n organisme dra waarskynlik by tot patogene vermoëns, sommige waarvan tot dusver nog onbekend mag wees. So *et al.* (1974) het bevind dat 85% van enteropatogene *E. coli* isolate minstens een konjugeerbare plasmied bevat. Daarenteen huisves slegs 38% van nie-patogene *E. coli* isolate 'n plasmied van een of ander soort. In werklikheid kom veral sekere soorte plasmiede soos Ent, Hly, K88, K99, R en Col by enteropatogene isolate voor. Dit is selde by nie-patogene *E. coli* aanwesig. In 'n siektetoestand is dit noodsaaklik dat Tox^+ *E. coli* die dunderm koloniseer en in nou kontak met teikenselle bly (Smith en Halls, 1967a; Hohmann en Wilson, 1975). By varke is die K88 antigeen van *E. coli* verantwoordelik vir die vermoë van die bakterieë om aan sulke selle vas te heg (Duguid en Gillies, 1957; Smith en Halls, 1968; Staley, Jones en Corley, 1969; Arbuckle, 1970; Drees en Waxler, 1970a en b; Smith en Linggood, 1971; Bertschinger, Moon en Whipp, 1972; Jones en Rutter, 1972). Tox^+ K88⁻ *E. coli* stamme is nie in staat om in die varkdunderm vas te heg nie en veroorsaak gevolglik nie diarree nie (Smith en Linggood, 1971; Jones en Rutter, 1972). Normale peristaltiese beweging van die dunderm verwyder sulke K88⁻ bakterieë vinnig uit die dunderm, weg van toksien sensitiewe selle (Davidson en Hirsh, 1976). 'n Soortgelyke oppervlakte antigeen, K99, verleen aan Tox^+ *E. coli* stamme van kalwers en lammers die vermoë tot vashegting (Smith en Linggood, 1972; Isaacson, 1977). Die vermoë om die K88 en K99 antigene te produseer word bepaal deur die teenwoordigheid van 'n oordraagbare plasmied (Ørskov en Ørskov, 1966; Smith en Linggood, 1972).

By gastroënteritis van pasgebore vakies speel 'n gasheer faktor 'n baie belangrike rol. Twee vark fenotipes word aangetref: dié wat bestand is teen aanhegting van $Tox^+ K88^+$ *E. coli* en dié wat vatbaar is vir aanhegting (Rutter, Burrows, Sellwood en Gibbons, 1975; Sellwood, Gibbons, Jones en Rutter, 1975). Hierdie twee vark fenotipes is die produkte van twee allele op 'n enkele lokus met die produk van die vatbare allel dominant oor die bestande allel. Fenotipes ontstaan as gevolg van eenvoudige Mendeliaanse oorerwing. Deur seleksie kan varke geteel word wat bestand is teen toksigene *E. coli*.

Daar bestaan voorlopige aanduidings dat die vermoë tot aanhegting wel 'n belangrike eienskap by menslike enteropatogene *E. coli* kan wees (Punyashthiti en Finkelstein, 1971; Evans, Silver, Evans, Chase en Gorbach, 1975; McNeish, Turner, Fleming en Evans, 1975).

Volgens Williams, Evans, Turner, George en McNeish (1977) is 'n $50-60 \times 10^6$ dalton oordraagbare plasmied verantwoordelik vir die sintese van 'n oppervlakte antigeen by 'n menslike enteropatogene serotipe, O26:K60:H11, van *E. coli*. Dié organisme heg spesifiek aan jejunale selle van die mensfetus vas. Hierdié vermoë kan na nie-enteropatogene *E. coli* K12 stamme deur konjugasie oorgedra word.

Sommige *E. coli* stamme besit ook die vermoë om 'n α -hemolisien te produseer (Smith, 1963; Smith en Halls, 1967c; Smith en Linggood, 1970). Inderdaad is daar bevind dat die meeste Tox^+ *E. coli* stamme van varke hierdie eienskap besit. Daarenteen skei slegs 'n klein persentasie van nie-patogene *E. coli* stamme, afkomstig van mens en dier, die α -hemolisien uit (Smith en Linggood, 1970). By sommige α -hemolisienproduserende *E. coli* stamme word die eienskap bepaal deur 'n oordraagbare plasmied, genoem Hly (Smith en Halls, 1967c).

1.9 Virusse in die etiologie van gastroënteritis

In teenstelling met die meeste algemene virussiektes is virusse eers onlangs by akute suigelingsgastroënteritis betrek. Weliswaar is dit so dat verskeie werkers enterovirusse en adenovirusse by geleentheid by gelokaliseerde uitbreke van gastroënteritis by kinders wou impliseer (Kjellen, Zetterberg en Svedmyr, 1957; Eichenwald, Ababio, Arky en Hartman, 1958; Ramos-Alvarez en Olarte, 1964). Tog kon ander werkers aantoon dat hierdie virusse net so volop by gesonde kontrolegroepe as by pasiënte voorkom (Yow, Melnick, Blattner en Rasmussen, 1963; Parkes, Melnick, Queiroga en Khan, 1966; Stott, Bell, Eadie, Ross en Grist, 1967).

In 1973 rapporteer Bishop en haar medewerkers (Bishop, Davidson, Holmes en Ruck, 1973a en b) die teenwoordigheid van reovirus-agtige deeltjies in epiteelselle van menslike duodenale mukosa. Hierdie biopsie materiaal was afkomstig van babas met akute nie-bakteriese gastroënteritis. Die teenwoordigheid van die virusdeeltjies het gepaard gegaan met histologiese abnormaliteite. Flewett, Davies, Bryden en Robertson (1974) kon soortgelyke virusdeeltjies by kinders met gastroënteritis aantoon. Morfologies identiese virusdeeltjies is hierna deur verskeie werkers in die stoelgange van kinders met gastroënteritis aangetoon (Bishop, Barnes en Townley, 1974; Holmes, Mathan, Bhat, Albert, Swaminathan, Maiya, Pereira en Baker, 1974; Kapikian, Kim, Wyatt, Rodriguez, Ross, Cline, Parrott en Chanock, 1974; Orstavik, Figenschau en Ulstrup, 1974; Sexton, Davidson, Bishop, Townley, Holmes en Ruck, 1974; Tan, Townley, Davidson, Bishop, Holmes en Ruck, 1974; White, Ashton, Roberts en Parry, 1974; Cruickshank, Zilberg en Axton, 1975; Schoub, Nel, Lecatsas, Greeff, Prozesky, Hay en Prinsloo, 1976; Schoub *et al.*, 1977). Davidson, Bishop, Townley, Holmes en Ruck (1975) het bevind dat 48 persent van kinders met gastroënteritis hierdie virusse huisves. Daarenteen kon die virus net by sowat 7 persent van asimptomatiesse kontroles aangetoon word. Dit is nou ook duidelik dat die virus selde by kinders ouer as 6 jaar voorkom (Flewett *et al.*, 1974b; Davidson *et al.*, 1975).

As gevolg van sy dubbelstring RNA genoom en dubbele kapsied-struktuur word die virus voorlopig in die familie *Reoviridae* geplaas (Welsh, 1971; Rodger, Schnagl en Holmes, 1975). Morfologies openbaar die virus 'n pitgedeelte met 'n deursnee van ± 38 nm. Die pit is omring deur 'n binnelaag van kapsomere wat uitwaarts straal soos die speke van 'n wiel. 'n Buitelaag kapsomere lyk asof dit aan die punte van die binnelaag kapsomere vas is. Die totale deursnee van die virusdeeltjie is 60-65 nm. Hierdie struktuur gee aan die virus sy kenmerkende voorkoms van 'n wiel met 'n skerp omlinde rand (Flewett, Bryden, Davis, Woode, Bridger en Derrick, 1974).

Vanweë die kenmerkende morfologie stel Flewett *et al.* (1974a) die naam rotavirus vir hierdie groep voor. Sommige navorsers verkies egter die naam duovirus (Davidson *et al.*, 1975). Die taksonomie en nomenklatuur van menslike rotavirus word verder bemoeilik deurdat dit feitlik ononderskeibaar van verskeie diervirusse is. Menslike rotavirus kan moeilik onderskei word van die virus wat vir epidemiese diarree van suigelingmuise verantwoordelik is (Much en Zajac, 1972). So is ook die virusse wat pasgebore kalfdiarree en varkdiarree veroorsaak (Woode, Bridger, Hall en Dennis, 1974; Woode, Bridger, Hall, Jones en Jackson, 1976) sowel as die aapvirus SA11 en die '0' organisme van skape en beeste (Els en Lecatsas, 1972) ononderskeibaar van die mensvirus. Nietemin wil dit voorkom asof die meerderheid werkers in die studiegebied die naam rotavirus vir die mensvirus verkies.

Die patogenese van virusgastroënteritis by die mens is feitlik onbekend. Dit is bekend dat babas met gastroënteritis teenliggame teen rotavirus vorm. Menslike serum geneem tydens die herstellende fase van gastroënteritis reageer met beide mens en kalfdiarreevirusse (Flewett *et al.*, 1974a). Daar bestaan egter klein kapsiedantigeniese verskille tussen hierdie twee virusse. Menslike rotavirus kan ook nie kalwers infekteer nie (Flewett *et al.*, 1974a). Rotavirus word selde uit kinders wat voorheen gastroënteritis gehad het geïsoleer (Sexton *et al.*, 1974;

Davidson *et al.*, 1975). 'n Aanduiding dus dat rotavirus 'n rol in die siekte gespeel het. Die siekte het 'n inkubasieperiode van sowat 48 uur. Daarna word die virus in die stoelgang uitgeskei. Virusekskresie is die grootste gedurende die derde en vierde dag van siekte en is selde waarneembaar na die agtste dag (Davidson *et al.*, 1975; Flewett, Bryden, Davies en Morris, 1975).

Soos reeds hierbo vermeld is ander virusse soos enterovirusse en adenovirusse deur vroeëre werkers by geleentheid geïmpliseer. Stortz en Bates (1973) het klein 22 nm DNA virusse (parvovirusse) gevind wat moontlik enteritis by beeste veroorsaak. Soortgelyke virusse is ook in menslike stoelgange gevind (Paver, Caul, Ashley en Clarke, 1973). Die rol van hierdie virusse in menslike siekte bly egter onseker. Afgesien van rotavirus is coronavirus 'n belangrike oorsaak van oordraagbare gastroënteritis by jong varkies (Woode, 1969) en by kalwers (Stair, Rhodes, White en Mebus, 1972). Dit is moontlik dat coronavirus ook by mense 'n rol mag speel. Tydens 'n uitbraak van gastroënteritis onder kinders in Norwalk, Ohio is 27 nm picornavirus-agtige deeltjies in hul stoelgange gevind. Infeksie met dié deeltjies kon na vrywilligers oorgedra word en hulle kon teenliggame teen die virus vorm (Kapikian, Wyatt, Dolin, Thornhill, Kalica en Chanock, 1972).

Die Redakteur van die Lancet (Editorial 1975*b*) beskou rotavirusse as een van die belangrikste oorsake van suigelingsgastroënteritis. Dit het 'n wêreldwye verspreiding maar baie min gegewens is beskikbaar oor tropiese en ontwikkelende streke waar die sterftesyfer aan hierdie siekte besonder hoog is.

1.10 Bronne van enteropatogene organismes

Dit is welbekend dat die meeste enteropatogene organismes waaronder *V. cholerae*, *Salmonella* en *Shigella* spesies, enteropatogene serotipes van *E. coli*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *B. cereus* en enterovirusse deur water en/of voedsel na die mens oorgedra kan word (Nygren, 1962; Schroeder, Caldwell, Vernon, White, Granger en Bennett, 1968; Vernon, 1969; Marier, Wells, Swanson, Callahan en Mehlman, 1973; American Public Health Association, American Water Works Association en Water Pollution Control Federation, 1976). Nietemin bestaan daar dikwels 'n swak korrelasie tussen uitbreke van gastroënteritis en die isolering van

enteropatogene organismes uit epidemiologies geïnkrimineerde voedsel- (Drion en Mossel, 1977) en waterbronne (Merson, Barker, Craun en McCabe, 1974; Hughes, Merson, Craun en McCabe, 1975; Horwitz, Hughes en Craun, 1976). In feitlik alle gepubliseerde ondersoeke tot dusver is daar egter nie getoets vir die enteropatogene vermoëns, soos bv. enterotoksienvorming, by sogenaamd onskadelike lede van die *Enterobacteriaceae* nie.

Sanyal, Singh en Sen (1975) kon *Aeromonas hydrophila*, wat 'n cholera-geenagtige toksien produseer, uit drinkwater en die Ganges-rivier isoleer. Hierdie organisme is van besliste belang in die etiologie van suigelingsgastroënteritis in die Ooste (Sakazaki, Tamura, Prescott, Bencic, Sanyal en Sinha, 1971; Chatterjee en Neogy, 1972; Sanyal, Gaur, Shrivastava, Sen, Marwah en Singh, 1972) en waarskynlik ook in Afrika (Wadström *et al.*, 1976a, b en c).

Tydens 'n ondersoek na die etiologie van akute suigelingsgastroënteritis by Apache kinders het Sack, Hirschhorn, Brownlee, Cash, Woodward en Sack (1975) ook die waterbronne ondersoek. Hulle kon aantoon dat 3 van 47 *E. coli* isolate, afkomstig van 18 waterbronne in die Whiteriver omgewing, enterotoksien (LT) produseer. Soortgelyk kon Ryder *et al.* (1976) in 'n ondersoek na sporadiese gevalle van gastroënteritis, by kinders in landelike Bangladesh, enterotoksigene *E. coli* uit 1 van 39 waterbronne isoleer.

Die belangrikste gerapporteerde uitbraak van watergedraagde gastroënteritis wat definitief aan enterotoksigene *E. coli* toegeskryf kon word is onlangs beskryf (Rosenberg, Koplan, Wachsmuth, Wells, Gangarosa, Guerrant en Sack, 1977). Meer as 200 personeel en 2000 besoekers aan 'n Amerikaanse nasionale park het siek geword met simptome van diarree, krampe, naarheid en vomering nadat van die park se riool-besmette drinkwater gebruik is. 'n Serotipe van *E. coli*, 06:K15:H16 wat beide ST en LT produseer, is by 'n groot aantal van hierdie pasiënte sowel as uit die drinkwater geïsoleer. 'n Fout in die chlóreringstelsel het bygedra tot besmetting van die water.

Die onlangse bevinding deur Sack, Sack, Mehlman, Ørskov en Ørskov (1977), dat enterotoksigene *E. coli* by 8% van isolate uit voedsel van dierlike oorsprong in die VSA voorkom, dui verder op 'n wye verspreiding van hierdie enteropatogene organismes in die natuur. Dit hou belangrike volksgesondheidsimplikasies in.

1.11 Doelstellings

Dit is duidelik uit die voorafgaande bespreking dat die kliniese sindroom van gastroënteritis 'n ingewikkelde etiologie openbaar. Weens 'n gebrek aan omvattende ondersoeke word dit dan hier ten doel gestel om die mikrobiologiese aspekte, wat 'n rol in die etiologie van gastroënteritis van suigeling speel, na te gaan. Die probleem is uit verskeie oogpunte benader :

- (i) 'n Onderzoek na die voorkoms en belang van potensiële enteropatogene organismes by sporadiese gevalle van akute gastroënteritis van kinders onder twee jaar oud (suigeling), en hul teenwoordigheid by 'n vergelykbare asimptomatiesse kontrolegroep, is onderneem.
- (ii) Die meganismes waarvolgens verskillende genera van enterotoksienproduserende bakterieë diarree induseer, en die verwantskap daarvan met cholera, is bepaal.
- (iii) Die genetiese aard en enteropatogene belang van verskillende genera van enterotoksigene bakterieë, afkomstig uit suigeling met gastroënteritis, is ondersoek.
- (iv) As waarskynlike bronne van besmetting is riool en enkele natuurlike waterbronne kwantitatief vir die teenwoordigheid en belang van enterotoksigene bakterieë ondersoek. Toksienproduserende *Enterobacteriaceae*, geïsoleer uit gevalle met suigelingsgastroënteritis, is ook vir hul coliformgedrag en status as kwaliteitindikatore van water ondersoek.

HOOFSTUK 2

MIKROËRGANISMES AS POTENSIËLE OORSAKE VAN SPORADIESE
SUIGELINGSGASTROËNTERITIS

INLEIDING

2.1 Vroeë ondersoeke in Suid-Afrika

Vanweë die belangrikheid van suigelingsgastroënteritis in Suid-Afrika is daar in die verlede verskeie ondersoeke na die rol van mikroörganismes in die etiologie van die siekte aangepak. Tog blyk dit uit die meeste van hierdie ondersoeke dat mikroörganismes net by 'n klein persentasie van pasiënte betrek kon word.

In een van die vroegste studies in Suid-Afrika postuleer Langer (1937) dat dispepsia by suigelinge, die gevolg van 'n toksiese invloed op die dermkanaal as gevolg van kolonisasie van die maag en proksimale dunderm deur "*B. coli*" kan wees. Mitchell, Van den Ende, Gant, Rabkin, Selzer en Parker (1948) kon tydens 'n diarree epidemie onder pasgeborenes in Kaapstad egter geen bekende patogene organismes isoleer nie. So ook kon Kahn en Robertson (1952) nie enteropatogene serotipes van *E. coli* by Swart suigelinge met somerdiarree inkrimineer nie.

Salmonella en *Shigella* spesies kon by 16% van Swart en Wit suigelinge met akute gastroënteritis deur Coetzee en Pretorius (1955) geïnkrimineer word. Hulle betwyfel egter die rol van enteropatogene serotipes van *E. coli* wat ook gedurende hulle studie by 41% van die pasiënte en 20% kontroles aangetref is. 'n Hoë voorkomssyfer van *Salmonella* en *Shigella* spesies kon deur Kahn (1957) by 37,5% van Swart suigelinge aangetoon word. In 'n studie van sporadiese gastroënteritis onder vroeggebore babas kon Kahn, Malherbe, Cassel, Roux en Schrire (1963) weer geen *Salmonella* of *Shigella* spesies of enige virusse isoleer nie. Hulle vind ook geen betekenisvolle verskille in die voorkoms van enteropatogene serotipes van *E. coli* by hul pasiënte en kontroles nie. Roux, Kahn, Malherbe en Cassel (1963) vind dit ook moeilik om

die rol van seropositiewe *E. coli* by hul pasiënte te evalueer. Teselfder=tyd is die rol van enterovirusse nagegaan. Malherbe, Roux en Kahn (1963) rapporteer 'n effens hoër voorkoms van coxackie A en echovirusse in die somer maar vind geen werklik betekenisvolle verskille in voorkoms by pasiënte en kontroles nie. Kort hierna bevind Koornhof, Richardson, Politzer, Utian en Malherbe (1964) in 'n studie oor somerdiarree onder Blanke kinders in Johannesburg dat enterovirusse waarskynlik nie 'n betekenisvolle rol speel nie. Terwyl *Salmonella* en *Shigella* spesies by 20,4% van hul pasiënte geïsoleer word, bevind hulle ook dat seropositiewe *E. coli* waarskynlik 'n etiologiese rol in diarree by suigeling onder een jaar oud speel. In groot kontras tot baie van die bogenoemde studies bevind Spencer en Coster (1969), in 'n uitgebreide studie oor die epidemiologie van suigelingsgastroënteritis onder Swartes, dat nie 'n enkele virus of bakterie geïsoleer kon word waaraan 'n etiologiese rol toegewys kon word nie.

2.2 Doelstelling

Sedert die aanvang van die sewende cholera pandemie is belangrike bydraes tot ons kennis van die etiologie van suigelingsgastroënteritis gemaak. 'n Ondersoek na die voorkoms en belang van potensiële aansteeklike oorsake, met gebruikmaking van die bes beskikbare metodes, word in hierdie hoofstuk uiteengesit.

WERKWYSE

2.3 Die keuse van pasiënte en kontroles

Die studiegroep is saamgestel uit 39 Swart pasiënte onder twee jaar oud met simptome van akute gastroënteritis wat tot die pediatriese afdeling van Kalafong Hospitaal, Pretoria, toegelaat is. Daar is sover moontlik sorg gedra dat die gekose pasiënte sporadiese gevalle verteenwoordig. Op hierdie wyse is gepoog om epidemiese uitbreke te vermy. Gegewens met betrekking tot die pasiëntegroep word in tabel 2-1 uiteengesit.

TABEL 2-1. Geskiedenis van die pasiënte studiegroep

Pasiënt nommer	Geslag ¹	Ouderdom ²	Massa (Kg)	Dag van siekte vir monsterneming	Persent dehidrasie	Voedingswyse ³	Aard van stoelgang ⁴
1	M	7 m	5,5	2	10	Ma	G W
2	V	17 d	1,9	3	10	B	G W M
3	M	7 m	6,1	3	10	B	G W
4	V	3 m	3,8	4	10	B	G W
5	V	11 m	9,5	4	10	Ma B	G W
6	M	3 m	5,4	2	5	Ma B	G W
7	V	3 m	4,9	2	10	Ma B	G W
8	V	2 m	5,9	3	10	Ma B	G W
9	M	7 m	6,2	4	10	Ma B	G W
10	M	4 m	6,0	5	10	Ma B	G W
11	V	2 m	3,3	5	10	B	G W
12	M	23 m	8,7	3	10	B	G W
13	M	16 m	9,6	2	5	B	G W
14	V	1 m	3,6	3	10	B	G W
15	V	12 m	6,2	4	10	B	G W
16	V	5 m	2,3	3	10	B	G W
17	V	3 w	3,2	3	10	B	G W
18	M	22 m	8,3	3	10	B	G W
19	M	8 m	7,3	3	10	B	G W
20	V	6 m	4,5	3	5	B	G W
21	V	3 m	3,3	3	10	B	G W
22	V	6 w	2,5	3	10	B	G W
23	V	13 m	12,2	4	10	Ma B	G W
24	M	14 m	13,4	4	10	B	G W

TABEL 2-1 (Vervolg)

Pasiënt nommer	Geslag	Ouderdom	Massa (Kg)	Dag van siekte vir monsterneming	Persent dehidrasie	Voedingswyse	Aard van stoelgang
25	M	4 m	4,3	2	10	Ma B	G W
26	M	11 m	6,6	3	10	B	G W
27	M	9 m	6,4	6	5	B	G W
28	M	13 m	8,7	5	10	B	G W M
29	M	2 m	3,9	4	10	Ma B	G W
30	M	10 m	6,6	4	5	B	G W
31	M	1 m	3,7	3	10	Ma B	G W
32	M	9 m	5,4	3	10	B	G W
33	V	6 m	6,8	4	5	B	G W
34	M	13 m	6,6	4	10	Ma B	W
35	V	13 m	6,5	5	5	B	G W
36	V	9 m	5,4	8	10	B	G W M
37	V	19 m	7,9	4	10	B	G W
38	V	24 m	9,9	5	5	B	G W
39	M	3 m	3,2	5	10	B	G W

1 M = Manlik; V = vroulik

2 d = dae; w = weke; m = maande

3 Ma = borsvoeding; B = voeding met behulp van 'n bottel;
Ma B = borsvoeding en aanvullende voeding met behulp van
'n bottel

4 G = groen kleur; W = waterig; M = mukus teenwoordig

'n Kontrolegroep met 'n vergelykbare ouderdoms- en gaslagsverspreiding is ook bestudeer. Dit het bestaan uit 18 Swart pasiënte wat vir ander redes as gastro-intestinale aandoenings tot Kalafong Hospitaal toegelaat is. Verdere gegewens in verband met hierdie groep word in tabel 2-2 uiteengesit.

Volgens Kahn (1957) en Spencer en Coster (1969) kom die meeste gevalle van akute gastroënteritis in Suid-Afrika gedurende die somermaande voor. Gevolglik is al die pasiënte en kontroles tydens die somermaande van 1975-1976 en 1976-1977 ondersoek.

2.4 Monsterneming

By pasiënte met gastroënteritis is die stoelgangmonsters versamel met behulp van 'n 20 ml steriele wegdoenbare onderhuidse spuit toegerus met 'n no. 8 nasogastriese voedingsbuis. Vanweë die uitsluitlik waterige stoelgange van hierdie pasiënte is 'n rektale aspiraatspiet deur die voedingsbuis deur die anus tot in die rektum op te stoot. Meer as 10 ml aspiraatspiet is deurgaans op hierdie wyse verkry. In elke geval is die monster in die spuit gelaat vir direkte versending na die laboratorium nadat die voedingsbuis met 'n omgebuigde onderhuidse naald vervang is.

Stoelgangmonsters van die kontrolegroep is na ontlasing versamel in 20 ml steriele wegdoenbare botteltjies met skroefproppe wat van 'n spatel voorsien is. Alle monsters is binne twee uur na versameling by die laboratorium ontvang en onmiddellik verwerk.

2.5 Metodes vir die isolering van enteropatogene bakterieë

By ontvangs is stoelgange dadelik in twee volumes verdeel. In die geval van waterige stoelgange is sowat 5 ml daarvan in klein skroefproppe Bijou-botteltjies geplaas en by -70°C geberg vir moontlike latere terugverwysing. In die geval van vaste stoelgange is die materiaal eers in 'n gelyke volume fosfaatgebufferde soutoplossings (FBS) gesuspendeer en dan verder soos die waterige stoelgange behandel. Die res van die materiaal is vir die teenwoordigheid van bakterieë, rotavirus en parasiete ondersoek.

TABEL 2-2. Kliniese geskiedenis van die kontrolegroep

Kontrolegroep nommer	Kliniese diagnose	Geslag ¹	Ouderdom	Aard van stoelgang
K 1	Bronchoneumonie	M	24 m	Geel, vas
K 2	Kwasjiorkor	V	11 m	Geel, vas
K 3	Pulmonale tuberkulose	M	12 m	Geel, vas
K 4	Kwasjiorkor	V	6 m	Geel, vas
K 5	Bronchopneumonie	V	2 m	Geel, vas
K 6	<i>Haemophilus influenzae</i> meningitis	M	5 m	Bruin, vas
K 7	Bronchopneumonie	V	11 m	Bruin, vas
K 8	Bronchitis	V	1 m	Geel, vas
K 9	Bronchopneumonie	M	21 m	Grys, vas
K10	Bronchopneumonie - kolaps van regterlong	M	5 m	Geel, vas
K11	Aspirasie pneumonie	M	18 m	Romig, vas
K12	Bronchopneumonie	M	24 m	Romig, vas
K13	Marasmus	M	24 m	Bruin, vas
K14	Bronchopneumonie	M	10 d	Geel, vas
K15	Hidrocephalus	M	4 m	Geel, vas
K16	Meningitis	V	6 m	Romig, vas
K17	Kroniese longinfeksie	V	6 m	Romig, vas
K18	Bronchopneumonie	M	24 m	Romig, vas

1 M = manlik; V = vroulik

2 d = dae ; m = maande

Om die isolasie van klassieke enteropatogene sowel as enterotoksigene en ander moontlike enteropatogene organismes te verseker, is 'n verskeidenheid voedingsmedia vir primêre isolasie gebruik. Behalwe waar anders vermeld word besonderhede in verband met materiaal, voedingsmedia, reagense en oplossings in die aanhangsel aangedui. Steriliteit en aseptiese tegnieke is volgens standaard bakteriologiese en virologiese voorskrifte gehandhaaf en uitgevoer.

Elke stoelgang is met behulp van 'n 4 mm inokuleerlus op die volgende media uitgestryk : twee MacConkeyagarplate, een bloedagarplaat (BA-plaat), een bloedagar plus kanamisienplaat (BAK-plaat), een xilose-lisien²-desoksicholaatagarplaat (XLD-plaat) of 'n helder-groenagarplaat (HG-plaat) en een *Salmonella-Shigella*-agar (SS-agar)-plaat. 'n Buis selenietsop is ook in elke geval getinkuleer.

Een MacConkeyagarplaat is vir 3 dae by kamertemperatuur gelaat en daagliks vir die teenwoordigheid van *Yersinia enterocolitica* ondersoek (Carter, 1975). Die BAK-plaat is vir 48 uur onder anaërobe toestande (Gaspak) by 37°C getinkubeer met die doel om anaërobe enteropatogene organismes soos *C. perfringens* te isoleer (Sutter, Vargo en Finegold, 1975). Alle ander plate is vir 48 uur by 37°C getinkubeer en daarna ondersoek. Die Selenietsopkultuur is vir 18 uur by 37°C getinkubeer en daarna is 'n 4 mm lusvol op 'n SS-agarplaat en soms 'n XLD-plaat en/of 'n HG-agarplaat uitgestryk en vir 18 uur by 37°C getinkubeer. Beide SS-agarplate is na inkubasie ondersoek vir die teenwoordigheid van *Salmonella* en *Shigella* spesies (Edwards en Ewing, 1972).

Die XLD-agar en die HG-agarplate is aanvullend tot die SS-agar en selenietsop-sisteem gebruik vir die isolering van *Salmonella* en *Shigella* spesies (Edwards en Ewing, 1972).

Aëroob getinkubeerde BA-plate is gebruik om *Staphylococcus* en *Candida* spesies te isoleer (Frankel, Reitman en Sonnenwirth, 1970; Rippon, 1974). Die MacConkeyagarplate is vir die primêre isolasie van *Enterobacteriaceae*, met uitsluiting van *Salmonella* en *Shigella* spesies, gebruik (Edwards en Ewing, 1972).

Vanweë die uitsluitlik waterige aard van stoelgange afkomstig van die gastroënteritis pasiënte en die deurgaanse gebruik van 'n 4 mm inokuleerlus, kon 'n semikwantitatiewe skatting van die relatiewe getalle van mikroörganismes wat in die stoelgange teenwoordig was, gemaak word. Afhangende van die aantal enkel kolonies is 9 tot 26 verteenwoordigende kolonies per stoelgang van die reeks plate afgetel. Omdat daar hoofsaaklik op *Enterobacteriaceae* gekonsentreer is (sien hoofstuk 1) is hoofsaaklik laktosefermenteerders sowel as nie-laktosefermenteerders van MacConkeyagarplate geïsoleer. Met enkele uitsonderings (sien hieronder) is alle isolate op brein-hart-infusie (BHI)-agarskuinsbodems geïnokuleer en geberg. Die stoelgangmonsters afkomstig van die kontrolegroep is op dieselfde wyse behandel en ondersoek. By hierdie groep is daar egter nie gepoog om anaërobe organismeries te isoleer nie.

2.5.1 Identifikasie van isolate

Die identiteit van isolate is met gebruikmaking van die onderskeidende kenmerke volgens toepaslike identifikasieskemas (sien hieronder) bewerkstellig (Edwards en Ewing, 1972; Cowan en Steel, 1974; Rippon, 1974). Kenmerke is noukeurig volgens die voorskrifte van laasgenoemde outeurs bepaal. Hücker se wysiging van die Gram-kleuring is volgens Cowan en Steel (1974) uitgevoer.

(i) *Enterobacteriaceae*

Na primêre isolasie is kolonies gesuiwer deur dit 1 tot 7 maal op MacConkeyagarplate uit te stryk. Lede van die *Enterobacteriaceae* is geïdentifiseer volgens die kenmerke uiteengesit in tabel 2-3. Hierdie skema vir identifikasie is op die werk van Edwards en Ewing (1972) gebaseer.

Die Gram-kleuring is op elke isolaat uitgevoer. Hierdie reaksie is nuttig om die suiwerheid van isolate te bepaal sowel as om die Gram-negatiewe kenmerk van lede van die *Enterobacteriaceae* te bevestig (Edwards en Ewing, 1972).

TABEL 2-3. Kenmerke gebruik vir die differensiasie van *Enterobacteriaceae* *

Kenmerke	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. liquefaciens</i>	<i>E. hafniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. freundii</i>
Indoolproduksie	+	-	-	>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Metielrooi-toets	+	+	+	+	+	>	-	-	-	>	+	+	+	+	>	+
Voges-Proskauer-toets	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sitraatverbruik (Simmons)	-	+	-	-	-	+	+	+	+	>	>	>	-	-	+	+
H ₂ S(DSY-agar)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	>
Urease	-	-	-	-	-	+	>	-	-	-	+	+	+	-	-	>
Groei op KCN	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatienvervloeiing (22°C)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Lisendekarboksilase	>	+	+	-	-	+	-	+	>	+	+	-	-	-	+	-
Arginiendihidrolase	>	+	>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>
Ornitiedekarboksilase	>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>
Fenielalaniendeaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Beweeglikheid (SIM)	>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	>	+	+
Glukose : suur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gas	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	>	+	+	+	+	+

TABEL 2-3. (vervolg)

Kenmerke	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. liquefaciens</i>	<i>E. hafniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. freundii</i>
Laktose : suur	+	-	-	-	+	+	+	+	>	>	-	-	-	-	-	+
gas	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Sukrose : suur	v	-	-	-	+	+	+	+	+	v	+	v	v	+	+	v
Maltose : suur	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Mannitol : suur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	v	v	+	+
Dulcitol : suur	v	+	v	-	-	v	v	+	-	-	-	-	-	-	-	v
Salisien : suur	v	-	-	-	-	+	+	+	+	v	v	v	v	-	+	v
Adonitol : suur	-	-	-	-	-	v	v	+	v	-	-	-	v	-	v	-
Inositol : suur	-	v	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	v	-
Sorbitol : suur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	v	v	+	+
Arabinose : suur	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Raffinose : suur	v	-	-	v	v	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	v
Ramnose : suur	v	+	-	v	+	+	+	+	-	+	-	-	v	v	-	+
Xilose : suur	v	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	v	v	+	+
Sellobiose : suur	-	+	v	-	-	+	+	+	v	+	v	v	v	v	+	+

* + = positief vir die spesifieke toets; - = negatief vir die spesifieke toets;
 v = mag 'n positiewe of negatiewe reaksie gee.

(ii) *Staphylococcus aureus*

Kolonies van hierdie organisme is gesuiwer deur dit op BA-plate uit te stryk. Die identifikasie van *S. aureus* is volgens die kenmerke in tabel 2-4 uitgevoer. Hierdie identifikasieskema berus op die bevindinge van Cowan en Steel (1974). Isolate is op BA-agarskuinsbodems by 4°C geberg.

TABEL 2-4. Onderskeidende kenmerke vir die identifikasie van *Staphylococcus aureus**

Kenmerke	Reaksies
Gram positiewe kokke	+
Suurvorming in mannitol, anaerobies	+
katalase	+
koagulase	+
Arginienhidrolise	+

+ = positief vir die spesifieke toets

(iii) *Pseudomonas aeruginosa*

Na suiwering op MacConkeyagarplate is die identifikasie van hierdie organisme volgens die kenmerke in tabel 2-5 gedoen (Cowan en Steel, 1974).

(iv) *Bacillus cereus*

B. cereus is op BA-plate gesuiwer en daarna volgens die kenmerke in tabel 2-6 geïdentifiseer (Cowan en Steel, 1974).

TABEL 2-5. Onderskeidende kenmerke vir die identifikasie van *Pseudomonas aeruginosa**

Kenmerke	Reaksies
Gram-kleuring	-
Beweeglikheid	+
Oksidase	+
Groei by 42°C	+
Groei by 37°C	+
Groei by 5°C	-
Sitraatverbruik	+
Groei op MacConkeyagar	+
Gelatienhidrolise	+
Styselhidrolise	-
Mannitol	+
Indool	-
Nitraatreduksie	+
Urease	+
Glukonaat	+
priosianien	+
fluoresseer	+
Diffusie van pigment	+
Arginiendihidrolase	+

* + = positief vir die spesifieke toets; - = negatief vir die spesifieke toets.

TABEL 2-6. Onderskeidende kenmerke vir die identifikasie van *Bacillus cereus**

Kenmerke	Reaksies
Gram-kleuring	+
Spoorswelling	-
Lesitienase	+
Beweeglikheid	+
Sitraatverbruik	+
Urease	+
Hemolities (BA-plaat)	+

* + = positief vir die spesifieke toets;

- = negatief vir die spesifieke toets.

(v) *Candida* spesies

Twee spesies van hierdie gis, *C. albicans* en *C. krusei* is geïsoleer en geïdentifiseer volgens die eienskappe uiteengesit in tabel 2-7 (Rippon, 1974).

Die identiteit van beide spesies is deur mnr S Lategan, Afdeling Mikologie, Departement Mikrobiologie, Universiteit van Pretoria bevestig. *Candida* spesies is op Sabouraudagarskuinsbodems by 4°C geberg.

TABEL 2-7. Onderskeidende kenmerke vir die identifikasie van *Candida albicans* en *Candida krusei**

Kenmerke	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
Kiembuisvorming in serum	+	-
Pseudomiselium	+	+
Chlamydospoorvorming	+	-
Glukose	+	+
Galaktose	+	-
Sukrose	+	-
Laktose	-	-
Mältose	+	-
Nitraat	-	-
Ammoniumsulfaat	+	+

*
+ = positief vir die spesifieke toets;
- = negatief vir die spesifieke toets.

2.5.2 Serotipering van *E. coli*

Alle *E. coli* isolate afkomstig uit pasiënte en die kontrolegroep is met behulp van die beskikbare agglutinerende antisera vir die bepaling van enteropatogene serotipes getipeer. Die voorskrifte van die vervaardiger (Wellcome Reagents Limited, Beckenham, Kent, Engeland) sowel as dié van Edward en Ewing (1972) is in ag geneem.

Die plaatagglutinasiemetode is uitgevoer deur 'n redelike digte en egalige suspensie van 'n 18 uur oue BHI-agarkultuur in twee druppels soutoplossing (0,85%) op 'n voorwerpglasplaatjie te maak en 'n lusvol onverdunde antiserum daarby te voeg. Vir die kontrole is dieselfde prosedure gevolg maar antiserum is met soutoplossing vervang. Die glasplaatjie word heen en weer gewieg en onder indirekte lig oor 'n donker agtergrond besigtig. 'n Sterk agglutinasie van selle deur die betrokke antiserum binne 1 minuut is as 'n bevestigende reaksie beskou. Vir elke stoelgang waaruit 'n enteropatogene serotipe bevestig is, is twee isolate vir herbevestiging deur middel van die buisagglutinasie-toets geselekteer. 'n Digte suspensie

($\pm 10^8 \text{ ml}^{-1}$) van die organisme is in soutoplossing berei en vir 1 uur by 100°C in 'n waterbad verhit. Tweevoudige reeksverdunnings (1:10 tot 1:320) van die antiserum is in soutoplossing berei. Van elke verdunning word 0,5 ml met 'n gelyke volume verhitte suspensie gemeng. Inkubasie daarvan 37°C vir 2 uur is gevolg deur 18 uur by 4°C . Na ekwilibrium by kamertemperatuur is die buise vir agglutinasie ondersoek. Die kontrole, wat uit verhitte suspensie en soutoplossing in plaas van antiserum bestaan, bly troebelrig.

Die volgende enteropatogene *E. coli* antisera is gebruik : polivalent 1, 2, 3, en 4; 026:K60(B6); 055:K59(B5); 086:K61(B7); 0111:K58(B4); 0112:K66(B11); 0114:K90(B); 0119:K69(B14); 0124:K72(B17); 0125:K70(B15); 0126:K71(B16); 0127:K63(B8); 0128:K67(B12) en 0142:K86(B),

Die meeste Tox^+ seropositiewe *E. coli* stamme is ook bevestig en die H-antigene bepaal deur Dr B Rowe, Central Public Health Laboratory, Colindale, London.

2.5.3 Bereiding van enterotoksiene

Aanvanklik is tot soveel as vyf isolate wat tot dieselfde spesie behoort en uit dieselfde stoelgang afkomstig is saamgevoeg vir die bereiding van 'n toksien. Omdat daar egter 'n moontlikheid bestaan dat bakteriosienproduserende stamme ander gevoelige stamme in so 'n mengsel mag dood (Ryder *et al.*, 1976) is al die isolate later individueel vir die voorbereiding van toksiene gebruik. Al die isolate is minstens twee keer by verskillende geleenthede op hierdie wyse getoets vir hul vermoë om enterotoksiene te vorm.

Twee verskillende klasse enterotoksien nl. labiele toksien (LT) en stabiele toksien (ST) (Sack, 1975) word by *E. coli* aangetref. Metodes vir die bereiding en identifikasie van die toksiene verskil van mekaar (Sack, 1975).

Vir die bereiding van ST is isolate uit gebergde kulture in 10 ml hoeveelhede BHI-sop geïnkuleer en 18 uur by 37°C geïnkuleer. Een 4 mm lus vol hiervan is telkens gebruik om 4 ml hoeveelhede BHI-sop, in 50 ml Erlenmeyer-flessies met watteproppe, te inkuleer. Optimale toestande vir die voortbrenging van stabiele toksien (ST) is verkry deur die kulture dan vir 18 uur by 37°C in 'n roteerskudapparaat (Labotec) teen 180 siklusse per minuut (skudkulture) te inkubeer (Giannella, 1976; Alderete en Robertson, 1977a en b). Skudkulture is hierna in steriele sentrifugeerbuis vir 30 minute teen 12000x gesentrifugeer. Die boliggende vloeistof is met behulp van 'n 5 ml wegdoenbare onderhuidsespuit, toegerus met 'n 38 mm by 20 dikte naald, afgetrek en deur 'n 25 mm by 0,22 µm poriegroote wegdoenbare filter (Millipore of Gelman) gefiltreer (Dean *et al.*, 1972; Donta en Smith, 1974). Die steriele filtraat is in klein Bijou botteltjies opgevang, vir 30 minute in 'n waterbad by 65°C verhit en dan by 4°C geberg (Smith en Gyles, 1970; Sack *et al.*, 1971).

Die bereiding van labiele toksien (LT) is soos vir ST in 4 ml hoeveelhede BHI-sop (pH 8,5) in 50 ml Erlenmeyer-flessies gedoen. Dit is egter vir 48 uur by 37°C geïnkubeer sonder om te skud (Sack, 1975; Mundell *et al.*, 1976). Na inkubasie is die kulture by 0-2°C vir 30 minute teen 12000 x g gesentrifugeer (Evans *et al.*, 1973a en b). Steriele filtrate is soos vir ST berei maar dit is in twee volumes van ongeveer 2 ml elk in yskoue Bijou botteltjies opgevang. Een botteltjie met toksien is by 65°C in 'n waterbad verhit vir 30 minute, sodat die labiele aard daarvan vasgestel kon word. Sowel die verhitte as onverhitte toksien is by 0-4°C geberg en binne 48 uur getoets. Wanneer LT nie binne 48 uur getoets kon word nie is dit gevriesdroog en binne 3 weke getoets (Mundell *et al.*, 1976).

2.5.4 Demonstrasie van enterotoksiene

Daar bestaan belangrike verskille tussen die twee klasse enterotoksiene van *E. coli*. Verskillende metodes word dan ook aangewend om die teenwoordigheid van die toksiene aan te dui. Sedert die vroegste studies oor die aard van *V. cholerae* enterotoksiene en *E. coli* ST en

LT is van die konyn-ileumlus as diermodel gebruik gemaak (De *et al.*, 1953, 1956). Onderskeid tussen ST en LT het hoofsaaklik berus op verskille tussen hierdie twee toksiene met betrekking tot die aanvangstyd en duur van vloeistofakkumulering in die konyn-ileumlus. Die hitte- en pH-labiele eienskap van LT het as verdere onderskeidende kenmerk gedien (Evans *et al.*, 1973a; So *et al.*, 1974; Sack, 1975). Ander onderskeidende kenmerke soos die molekulêre massa en antigeniteit vereis ingewikkelde metodes (Jacks en Wu, 1974; Finkelstein *et al.*, 1976), en is nie geskik om op 'n roetine basis vir die bepaling van hierdie toksiene te gebruik nie. Alhoewel die konyn-ileumlus tot onlangs, hoofsaaklik as navorsingstegniek gebruik is, bly dit 'n omslagtige en tydrowende metode. Eenvoudiger maar gevoelige tegnieke vir die bepaling van ST en LT is later ontwikkel

2.5.4.1 Die bepaling van stabiele toksien

Volgens Dean *et al.* (1972) en Sack (1975) is suigelingmuise feitlik uitsluitlik gevoelig vir die bepaling van ST. Ingeteelde suigelingmuise, Balb/c tussen 1 en 5 dae oud is, afhangende van die liggaamsgrootte, 75 to 100 μl hoeveelheid van die stabiele toksien toegedien. Twee druppels van 'n 0,5% Evansblouoplossing in water is by 4 ml ST gevoeg. 'n Wegdoenbare tuberkulienspuit, toegerus met 'n 1 mm by 150 mm plastiese kateter, is met ongeveer 800 μl ST-Evansbloumengsel gevul en daarna is van die lugblasies ontslae geraak. Deur die punt van die kateter bo-oor die tong tot in die farinks te stoot kon die verlangde dosis ST toegedien word (Schoub, Jacobs, Robins-Browne, Koornhof, Lecatsas en Prozesky, 1976). Die blougekleurde toksienpreparaat is maklik waarneembaar deur die dun liggaamswand van die suigelingmuise wanneer dit in die maag beland. Indien die toksien elders toegedien word is die toets waardeloos. Dit gebeur soms dat die kateter nie deur die farinks beweeg nie maar via die trachea in die longe beland. Dit kon egter onmiddellik na toediening waargeneem word en so 'n toets kon onmiddellik herhaal word.

Elke ST is telkens in minstens drie suigelingmuisse getoets. Die muis is kort voor die toets van hul moeders weggeneem en s6 in groepies van drie ingedeel dat elke lid van die groep van 'n ander ouerpaar afkomstig was. Dit, sowel as die feit dat 'n ingeteelde muisras, Balb/c, gebruik is het bygedra tot eenvormige resultate.

Na toediening van die toksien is die muis vir 4 uur by kamertemperatuur gelaat en daarna met chloroformdampe gedood. Vloeistofakkumulاسie in die dermkanaal as gevolg van die werking van ST (sien figuur 2-1) is volgens die volgende formule bepaal :

$$\frac{\text{massa van die dermkanaal}}{\text{massa van die karkas}} = 0,083$$

Die drie dooie muisse in 'n toets se gesamentlike massa is bepaal. Die dermkanaale van die drie muisse is deur disseksie vanaf die pilorus sfinkter tot by die rektale sfinkter verwyder en die totale massa hiervan is bepaal deur dit dadelik saam te weeg (sien figuur 2-1). Dermkanale is tydens disseksie ook vir ooglopende opswelling as gevolg van geakkumuleerde vloeistof ondersoek (sien figuur 2-1). Die verhouding van dermkanaal massa tot liggaams massa is volgens die formule hierbo bereken. 'n Massaverhoudingswaarde van groter as 0,083 is as bevestiging van 'n sterk positiewe ST-reaksie beskou. Waardes kleiner as 0,06 is as negatief vir ST beskou omdat geen vloeistofakkumulاسie in die dermkanaal plaasgevind het nie. In gevalle waar waardes tussen 0,06 en 0,083 verkry is, is die toets minstens een keer herhaal deur die toksien van nuuts af te berei en te toets. In sulke gevalle, sowel as by alle sterk positiewe ST-reaksies, is 'n verhitte porsie van die toksien (65°C vir 30 minute in 'n waterbad) ook weer getoets om die moontlikheid van 'n LT effek uit te sluit. Wanneer waardes tussen 0,06 en 0,083 by herhaling verkry is, is die reaksie as intermediêr positief beskou.

Positiewe en negatiewe kontrolestamme is deurgaans ingesluit by die bereiding van elke dag se groep toksiene. Verhitte porsies van die kontrole toksiene is dan altyd saam met die ooreenstemmende groep onbekende toksiene getoets. As positiewe kontrole vir ST is twee welbekende stamme, *E. coli* B7A (Dupont, Formal, Hornick, Snyder, Libonati, Sheahan, La Brec en Kalas, 1971) en *E. coli* H10407 (Evans *et al.*, 1973b), altwee waarvan ST sowel as LT produseer, gebruik. Beide hierdie stamme is goedgeunstiglik deur Dr B Rowe, Central Public Health Laboratory, Colindale, London, verskaf. As negatiewe kontroles vir ST en LT is 'n welbekende indringende stam, *E. coli* 111a, gebruik. Hierdie stam is goedgeunstiglik deur Dr H L du Pont, University of Texas Medical School, Houston, V.S.A. verskaf.

2.5.4.2 Die bepaling van labiele toksien

Net soos in die geval van choleraegeen is dit nou duidelik dat *E. coli* LT ook deur middel van die adenielsiklase-cAMP-sisteem van soogdiere selle optree (sien hoofstuk 1). Die werking van *E. coli* LT kan onder andere tot morfologiese verandering van 'n verskeidenheid van sellyne lei (Guerrant *et al.*, 1974, 1975; Sack en Sack, 1975). Hoofsaaklik twee sellyne is tans in gebruik om LT te bepaal. Guerrant *et al.* (1974) maak gebruik van 'n "Chinese hamster ovary K1" (CHO-K1) sellyn terwyl Sack en Sack (1975) 'n Y1 byniersellyn vir dieselfde doel gebruik. Die metode van Guerrant *et al.* (1974) soos verder omskryf deur Guerrant *et al.* (1975) is in hierdie studie gebruik. Hierdie metode is baie gevoelig vir enterotoksien deurdat dit 3×10^{-17} mole choleraegeen of 'n 1:250 verdunning van *E. coli* LT kan bespeur (Guerrant *et al.*, 1974).

Sowat $3-5 \times 10^6$ CHO-K1 selle is in 'n gliserolvriesmengsel (sien aanhangsel) by -70°C in klein Bijoubotteltjies geberg. Wanneer benodig is die selle vinnig (3-5) minute in 'n 37°C waterbad ontvries. Hierna is die selle in 25 ml F12 medium (Gibco), aangevul met 10% fetale kalfserum (Gibco; F12+10% FKS), in 75 cm^2 Falconflesse (Becton-Dickinson) onder 6% CO_2 by 37°C voortgekweek totdat dit aaneenlopend gegroei het (1-5 dae). Wanneer die selle 'n aaneen-

lopende monolaag gevorm het is die medium afgesuig en met 5 ml warm (37°C) tripsienoplossing (ATV) vervang. Tripsienbehandeling vir 5-10 minute by 37°C maak al die selle van die flesbodem los waarna dit drie keer in fosfaat gebufferde soutoplossing (FBS) gewas, en deur sentrifugering teen 1500 o.p.m. vir 6 minute herwin is. Gewasde selle is in 10 ml F12 medium wat 1,0 mM 1,3-dimetiexantien (theophylline) bevat, en aangevul is met 1% fetale kalfserum (F12+1% FKS-T), gesuspendeer. Die selsuspensie is daarna so verstel dat dit 'n konsentrasie van 2×10^4 selle per ml bevat het. Die selkonsentrasie is met behulp van 'n verbeterde Naubauer hemositometer bepaal (Hoskins, 1967).

Die bepaling van LT is uitgevoer in wegdoenbare mikrotiterplate met 96 platbodem putjies (Cooke Laboratory Products). In elke putjie van die mikrotiterplaat is 250 μ l F12+1% FKS-T, wat ongeveer 5×10^3 CHO-K1 selle bevat, gevoeg. Onmiddellik hierna is 20 μ l LT per putjie toegevoeg en die toksien-selmengsel vir 24 uur by 37°C onder 6% CO₂ geïnkubeer. Elke toksien is in minstens 6 putjies op 'n keer getoets.

Na inkubasie is die selle onder 'n omgekeerde binokulêre mikroskoop (Zeiss) ondersoek. 'n Totaal van minstens 400 selle per toets is vir elke toksien ondersoek (Guerrant *et al.*, 1974, 1975). Die persentasie verlengde spoelvormige selle wat ook hul knopvormige uitsteeksels verloor het, is bereken (sien figuur 2-2). Die gemiddelde persentasie morfologiese afwyking is op hierdie wyse eers vir al die lede van die *Enterobacteriaceae* wat uit die kongrolegroep geïsoleer is, bepaal. Daarna is die standaardafwyking van die gemiddelde persentasie CHO-K1 selle soos dit gereageer het op toksienpreparate afkomstig vanaf die kontrolegroep (Guerrant *et al.*, 1975) volgens Sokal en Rohlf (1969) bereken.

Die gemiddelde persentasie CHO-K1 selle wat teen die kontrolegroep isolate gerageer het was 4,98% met 'n standaardafwyking van $\pm 2,53\%$. Op grond van hierdie gemiddelde waarde is 'n indeling van al die isolate in hierdie studie as volg gemaak : isolate wat instaat is om

CHO-K1 selle tot 4 of meer standaardafwykings bo die gemiddelde (>15%) te stimuleer, is as hoogs toksies beskou. Stimulering van selle tussen 2 en 4 standaardafwykings bo die gemiddelde (10% tot 15%) is as intermediêr toksies beskou en onder 2 standaardafwykings bo die gemiddelde (<10%) as nie-toksies (Guerrant *et al.*, 1975).

2.5.5 Demonstrasie van indringingsvermoë

Twee metodes is gebruik om vir die indringende vermoë van alle *Enterobacteriaceae* isolate te toets.

2.5.5.1 Die marmot keratokonjunktivitis-toets (Serény-toets)

'n Digte suspensie van 18 uur oue BA-kulture is gemaak deur die organisme in 1 ml BHI-sop van die skuinsbodem af te was. Een druppel hiervan ($+ 10^8$ selle) is met 'n Pasteurpipet in die konjunktivale sak van volwasse marmotte toegedien. Die diere is daaglik vir 5 dae ondersoek vir die ontwikkeling van 'n inflammatoriese keratonkonjunktivitis (Serény, 1955; Du Pont *et al.*, 1971; en sien figuur 2-3).

2.5.5.2 Die Hela-seltoets

Die vermoë om in Hela-selle in te dring is bepaal volgens 'n wysiging (Schoub *et al.*, 1976) van die tegnieke van Labrec, Schneider, Magnani en Formal (1964) en Du Pont *et al.* (1971).

Helà-selle is op 12 mm sirkelvormige dekglasies in 10 ml skroefprop=proefbuis in Minimal Eagle's Medium (MEM; Gibco), aangevul met 10% beesserum (Gibco) en 100 i.e. ml^{-1} penisilien en 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomisien, by 37°C voortgekweek. Wanneer feitlik aaneenlopend is die monolaag 3 keer met 2 volumes van Hank se gebalanseerde soutoplossing (HBS) gewas om alle spore van die antibiotika te verwyder. 'n Suspensie van die toetsorganisme in MEM, aangevul met 2% beesserum, om 'n digtheid van $+3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ selle te gee is by die monolaag gevoeg en vir 30 minute by 37°C geïnkubeer. Vervolgens is dit driemaal met HBS gewas waarna 1 ml MEM met 2% beesserum bygevoeg en dit vir 16 uur by 37°C voortgekweek is. Die monolaag is hierna weer soos voorheen met

HBS gewas, die dekglasies met Hela-selle in Bouinoplossing gefikseer en daarna met hematoksilien-eosien-kleuring behandel (Hoskins, 1967). Preparate is in entellan op voorwerpglasies gemonteer en daarna mikroskopies ondersoek vir intrasellulêre bakterieë as gevolg van indringing.

2.5.6 Demonstrasie van hemolisienproduksie

Die vermoë tot hemolisienproduksie is by alle lede van die *Enterobacteriaceae* ondersoek. By ander organismes is hierdie eienskap aangeteken wanneer en indien dit op gewone BA-plate gekweek is.

Skaapbloed is in Alseveroplossing versamel (Dacie en Lewis, 1970) en die rooibloedselle daarna driemaal in soutoplossing gewas en deur sentrifugering herwin. Rooibloedselle is by afgekoelde (45°C) Columbia-agar (Oxoid) tot 'n finale konsentrasie van 4% gevoeg en gewoonweg in petribakkies gegiet. 'n Lus vol van 'n 18 uur BHI-sopkultuur is oor 'n oppervlakte van sowat 3 cm² uitgestryk. Soveel as 6 organismes per plaat kan so getoets word. Die kultuur is by 37°C voortgekweek en na 24 uur en 48 uur ondersoek vir hemolise.

2.6 Demonstrasie van parasiete

Stoelgangmonsters is dadelik na ontvangs beide makroskopies en mikroskopies vir die teenwoordigheid van parasiete ondersoek. Een druppel waterige stoelgang of sowat een mg vaste stoelgang is in twee dubbels soutoplossing (0,85%) op 'n voorwerpglasie gesuspendeer en onder 'n dekglasie mikroskopies ondersoek (Frankel *et al.*, 1970).

2.7 Die bepaling van rotavirus in stoelgange

Twee metodes nl. elektronmikroskopie en komplementbinding is gebruik vir die bepaling van rotavirus in stoelgange.

2.7.1 Elektronmikroskopie

'n Eenvoudige negatiewe kleuringstegniek is gebruik om die teenwoordigheid van rotavirus deur middel van elektronmikroskopie in stoel=

gange aan te toon (Schoub, Koornhof, Lecatsas, Prozesky, Freiman, Hartman en Kassel, 1975). Waterige stoelgange afkomstig van die pasiënte is teen 2500 o.p.m. vir 30 minute gesentrifugeer. Een tot vyf gram vaste stoelgang, uitsluitlik afkomstig van die kontrole= groep, is in FBS gesuspendeer in 'n verhouding van ongeveer 1:2 respektiewelik en daarna soos die waterige stoelgange behandel.

Die boliggende vloeistof is na bogenoemde sentrifugering weer in 'n Beckmann ultrasentrifuge teen 160,000xg vir 1 uur gesentrifugeer om virusdeeltjies te sedimenteer. Die sediment is hersuspendeer in 'n paar druppels gedistilleerde water. Een druppel van die suspensie is met een druppel van 'n 3% fosfowolframsuuroplossing (pH6) gemeng. 'n Klein druppeltjie hiervan is op 'n formvar-koolstofbehandelde kopergaas= skyfie aangewend, toegelaat om te droog en in 'n Phillips EM 300 elektronmikroskoop teen 60 kV ondersoek vir die teenwoordigheid van rotavirus.

2.7.2 Die komplementbindingstegniek

'n Omgekeerde komplementbindingstegniek waar die rotavirus-antigeen in stoelgange geïdentifiseer is deur titrasie daarvan teenoor 'n vasgestelde verdunning van konyn-antiserum teen Nabaska Calf Diarrhoea Virus (NCDV) is deur Spence, Fauvel, Bouchard, Babuik en Saunders (1975) beskryf.

In die huidige studie is die omgekeerde komplementbindingstegniek uitgevoer deur van 'n vasgestelde verdunning van konyn-antiserum teen die S.A. 11 aaprotavirus gebruik te maak. Die S.A. 11 aaprotavirus is baie naverwant aan dié van die mens. Antiserum teen laasgenoemde virus is geskenk deur dr B D Schoub, Nasionale Instituut vir Virologie, Privaatsak X4, Sandringham.

Antiserum teen S.A. 11 aaprotavirus se komplement is geïnaktiveer deur dit by 56°C in 'n waterbad vir 30 minute te verhit. Gevriesdroogde marmotkomplement (Wellcome Reagents Limited) is opnuut saamgestel in 2 ml gedistilleerde water en teen 'n sterkte van 2 eenhede gebruik. Gesensiteerde skaaprooibloedselle (4%) in Versene gebufferde sout= oplossing (VBS), wat as 'n standaard reagens in hierdie laboratorium

berei word, is gebruik. Die oorblywende gedeelte van die viruspreparaat na ultrasentrifugering, soos hierbo vir negatiewekleuring beskryf, is as antigeen gebruik.

Die titrasie van rotavirus-antigeen is in mikrotiterbakkies (Cooke) met U-vorm putjies soos volg uitgevoer : 25 μl antigeen in 25 μl VBS is tweevoudig verder in 25 μl hoeveelhede VBS verdun tot tussen $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{64}$. By elke antigeenverdunding is dan 25 μl S.A. 11 aaprotavirusantiserum wat vooraf $\frac{1}{320}$ verdun is gevoeg. Daarna is 50 μl komplement by elke verdunning gevoeg, die mikrotiterbakkies met sellofaankleefstof toe geplak en oornag (minstens 16 uur) in 'n yskas gehou. Daarna is 50 μl gesensiteerde skaaprooibloedselle by elke verdunning gevoeg waarna dit verder vir 1 uur in 'n vogtige broeikas onder 5% CO_2 by 37°C geïnkubeer is. Hierna is die mikrotiterbakkies vir 15 minute teen 1500 o.p.m. gesentrifugeer. Die omgekeerde van die hoogste verdunning waar 'n sediment gevorm het is as die titer vir menslike rotavirus geneem. Titers van 16 of groter is as positief vir die teenwoordigheid van rotavirus in stoelgange aanvaar (Kapikian, Cline, Mebus, Wyatt, Kalica, James, VanKirk, Chanock en Kim, 1975; Schoub *et al.*, 1977).

RESULTATE

2.8 Voorkoms en verspreiding van potensiële enteropatogene organismes

'n Totaal van 746 isolate is uit die stoelgange van 39 pasiënte met akute gastroënteritis geïsoleer en ondersoek vir hul potensiële enteropatogene eienskappe. 'n Verskeidenheid organismes met enteropatogene vermoëns, insluitende rotavirus, is gevind. Tipiese resultate met die suigelingmuistoets vir die demonstrasie van ST-produksie is volgens figuur 2-1 behaal. Soortgelyk kon LT-produksie met behulp van spesifieke morfologiese veranderinge by CHO-K1 selle, volgens figuur 2-2, by 'n verskeidenheid isolate aangetoon word. By sommige isolate is intermediêre en soms atipiese reaksies met betrekking tot enterotoksiëntoetsing waargeneem (sien hieronder). Die vermoë tot indringing kon slegs by twee *Shigella* spesies aangedui word. In beide gevalle kon 'n

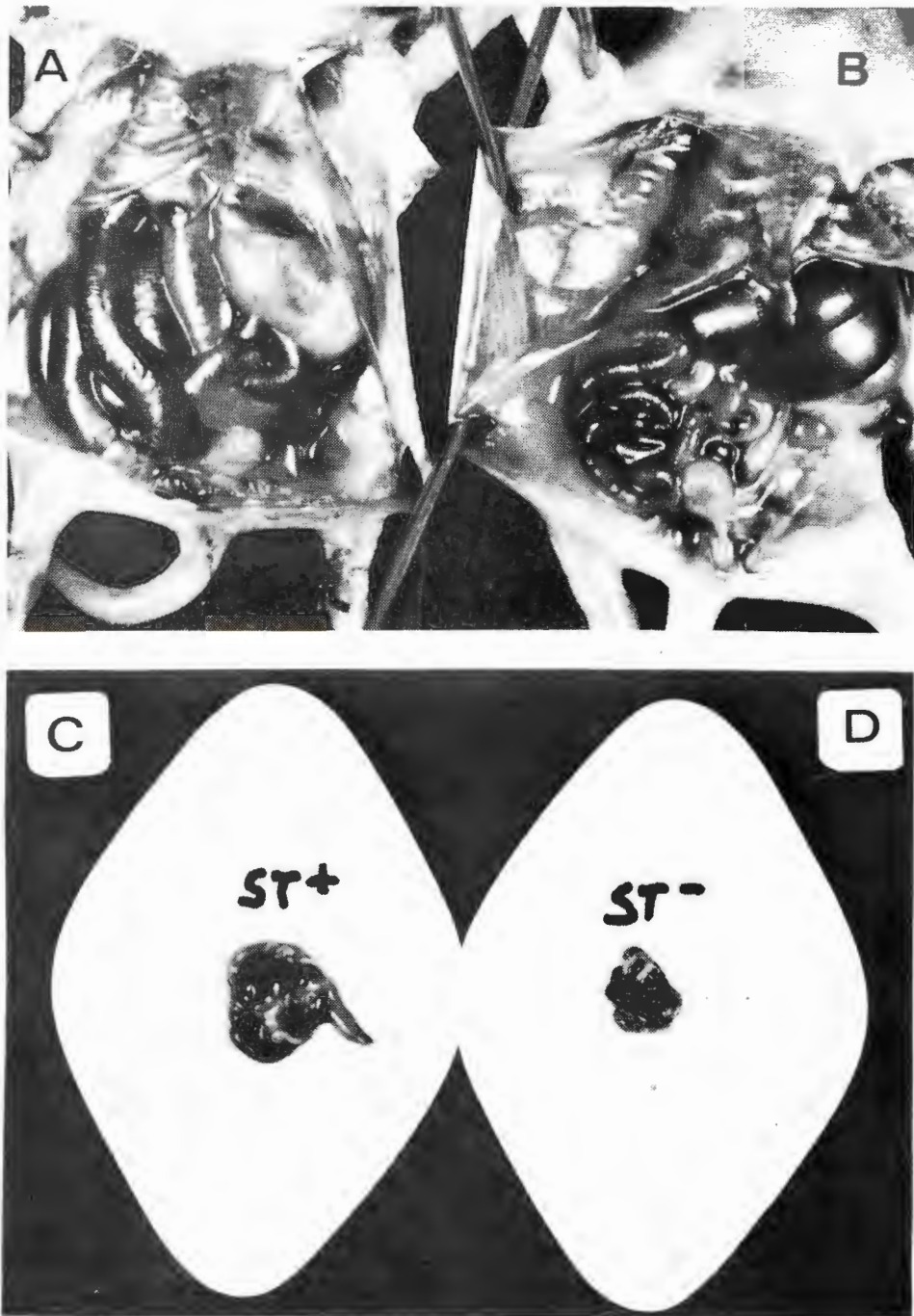


Fig. 2-1. Effect van stabiele toksien op suigelingmuise: A, vloeistofakkumulatie in dermkanaal; B, negatieve controle; C, gedissekteerde dermkanaal van A; D, gedissekteerde dermkanaal van B.

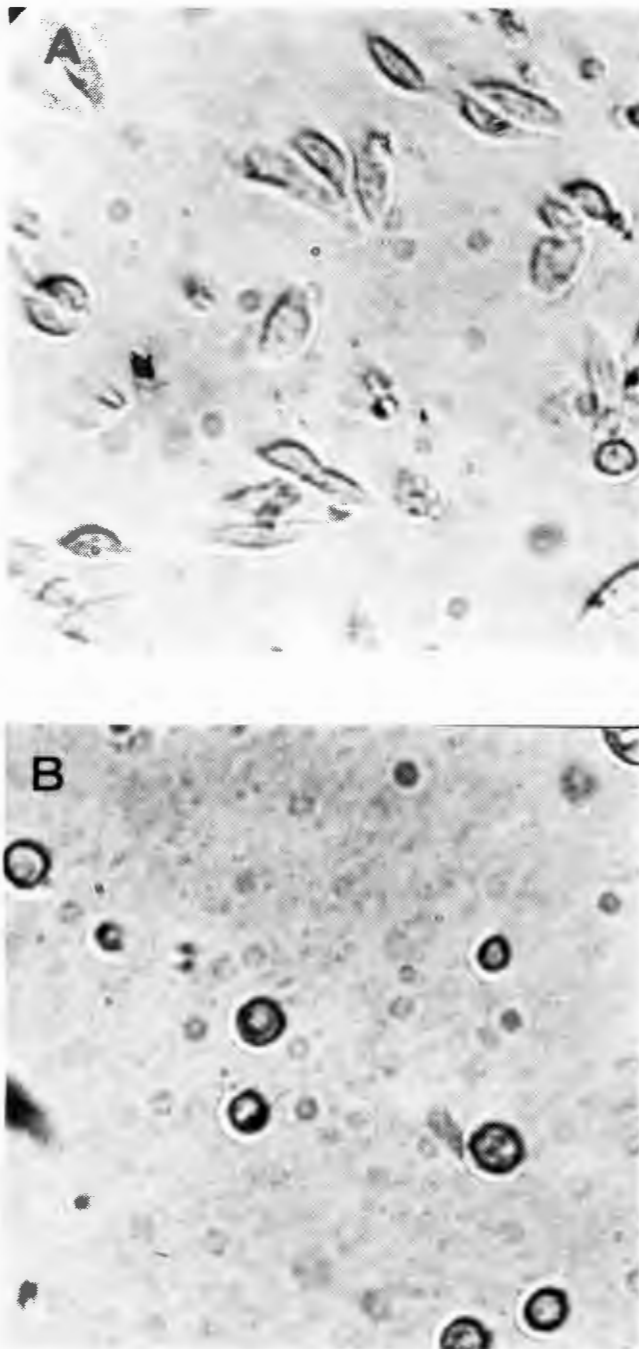


Fig. 2-2. Effek van labiele toksien op CHO-K1 selle:
A, labiele toksien induseer spoelvormige selmorfologie; B, negatiewe kontrole.

tipiese inflammatoriese keratokonjunktivitis van die marmotoog, volgens figuur 2-3, gedemonstreer word. Hemolisienproduksie is ook by 'n verskeidenheid organismes aangetoon. Die voorkoms en enteropatogene eienskappe van isolate waaraan 'n potensiële etiologiese rol toegewys kan word, word in tabel 2-8 uiteengesit.

By eeh lid van die kontrolegroep is 'n aantal *E. coli* LT-produserende isolate verkry wat as intermediêr toksies (+) geklassifiseer is. Een lid se stoelgang het 'n enteropatogene serotipe van *E. coli*, 0126:K71 (B16), sowel as *Ascaris* wurms opgelewer. In die stoelgang van 'n derde is slegs *Ascaris* wurms waargeneem. Geen ander potensiële enteropatogene organismes is by die kontrolegroep gevind nie (sien hieronder). Omdat daar, met die uitsondering van twee *Shigella* spesies, geen invallende stamme by pasiënte geïsoleer is nie, is hierdie eienskap nie by isolate van die kontrolegroep ondersoek nie.

Die klassifisering en verspreiding van enteropatogene organismes word in tabel 2-9 vergelyk met die isolate afkomstig uit die kontrolegroep.

Volgens die verspreiding van potensiële oorsake van gastroënteritis by pasiënte en kontroles in tabel 2-9 kan 'n indeling van die patogene groepe gerieflikheidshalwe soos volg gemaak word :

enterotoksigene (Tox⁺) *Enterobacteriaceae*, enteropatogene serotipes van *E. coli* (seropositiewe (SP) *E. coli*), *Salmonella* en *Shigella* spesies, *S. aureus*, eenmalige isolate van patogene organismes, parasiete en rotavirus.

2.8.1 Tox⁺ *Enterobacteriaceae*

Slegs ST⁺ en hoogs toksiese LT isolate is as potensiële enterotoksigene oorsake van gastroënteritis in aanmerking geneem (Guerrant *et al.*, 1975). In gevalle waar ander organismes as *Enterobacteriaceae* LT-agtige reaksies by CHO-K1 selle uitgelok het, word dit gerieflikheidshalwe met 'n (?) onder die LT reaksie in tabel 2-8 aangedui. Hiermee word egter geensins 'n verwantskap met *E. coli* LT of chölerageen bedoel nie. Gevolglik word hierdie reaksies nie saam met die Tox⁺ *Enterobacteriaceae* gegroepeer nie maar afsonderlik onder die betrokke organismes behandel (sien hieronder).

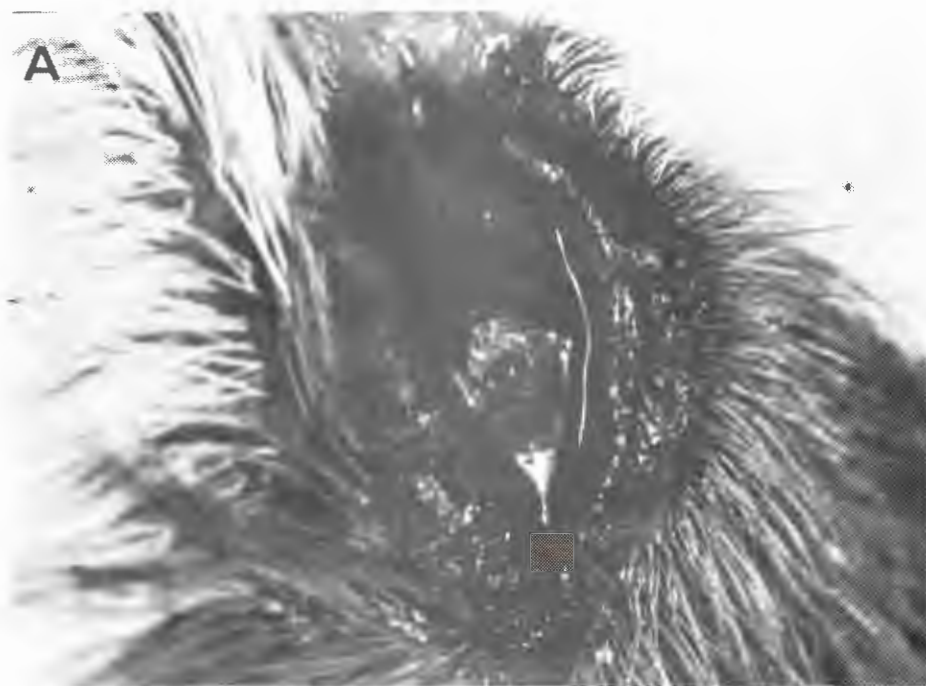


Fig. 2-3. Serény-toets: A, inflammatoriese indringing in marmotoog deur *Shigella flexneri*; B, negatiewe kontrole.

TABEL 2-8. Potensiële enteropatogene organismes betrokke by gastroënteritis pasiënte*

Pasiënt nommer	Mikroörganismes	Enteropatogene serotipe	Stabiele toksien	Labiele toksien	Serény-toets	Hela-seltoets	Hemolisien
1	<i>E. coli</i>	0126:K71 (B16)	-	-	-	-	-
2	<i>E. coli</i>	0? :K? : H27	+	-	-	-	-
3	<i>E. coli</i> Rotavirus	-	-	-	-	-	+
4	Rotavirus						
5	<i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i>	0127:K63 (B8)	-	-	+	+	-
6	<i>E. coli</i>	0126:K71 (B16)	-	-	-	-	-
7	<i>E. coli</i>	0126:K71 (B16)	-	-	-	-	-
8	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> Rotavirus	0125:K70 (B15) 0114:K90 (B)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
9	<i>E. coli</i> Rotavirus	0125:K70 (B15)	-	-	-	-	-
10	<i>E. coli</i> Rotavirus	Polivalent 4	-	-	-	-	-
11	<i>S. typhi</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>E. aerogenes</i> Rotavirus	0125:K70 (B15)	- - - - -	- - ? +	- - - -	- - - -	- - + -
12	<i>E. coli</i>	0114:K90:H?	+	-	-	-	-
13	<i>E. coli</i>	071 :K? :H?	-	+	-	-	-
14	<i>S. enteritidis</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i>	0125:K70 (B15)	- - - -	- - ? +	- - - -	- - - -	- - + -
15	<i>E. coli</i>	0125:K70 (B15)	-	-	-	-	-

TABEL 2-8. (Vervolg)

Pasiënt nommer	Mikroörganismes	Enteropatoogene serotipe	Stabiele toksien	Labiële toksien	Serény-toets	Hela-seltoets	Hemolisien
16	<i>E. coli</i>	078 :K?:H ⁻	-	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>		-	-	-	-	+
17	<i>S. aureus</i>		-	-	-	-	+
	<i>P. aeruginosa</i>		+	?	-	?	-
18	<i>E. coli</i>	-	+	+	-	-	-
19	<i>E. coli</i>	0125:K70 (B15)	-	-	-	-	-
20	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-
21	Geen agens (<i>E. coli</i>)		-	+	-	-	-
22	<i>E. cloacae</i>		-	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>		-	?	-	-	+
	Rotavirus						
23	<i>K. pneumoniae</i>		-	+	-	-	-
	Rotavirus						
24	<i>E. coli</i>	055 : K59 (B5):H ⁻	-	+	-	-	-
25	Rotavirus						
26	<i>E. coli</i>	Polivalent 1	-	-	-	-	-
	<i>E. cloacae</i>		-	+	-	-	-
27	<i>C. krusei</i>		-	?			-
	<i>B. cereus</i>		+	?			+
	Rotavirus						
28	Rotavirus						
29	<i>K. pneumoniae</i>		-	+	-	-	-
	Rotavirus						
30	<i>S. sonnei</i>		-	-	+	+	-
	<i>E. coli</i>	Polivalent 2	-	-	-	-	-
31	<i>C. albicans</i>		-	-	-	-	-
32	<i>S. aureus</i>		-	?	-	-	+

TABEL 2-8 (Vervolg)

Pasiënt nommer	Mikroorganismes	Enteropatogene serotipes	Stabiele toksien	Labiele toksien	Serény-toets	Hela-toets	Hemolisien
33	<i>P. vulgaris</i> Rotavirus		-	+	-	-	-
34	Rotavirus						
35	<i>E. coli</i> Rotavirus	0125:K70 (B15)	-	-	-	-	-
36	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	0128:K67:H27 Orof:K?:H55	+	+	-	-	-
37	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> Rotavirus	0125:K70 (B15)	-	-	-	-	-
38	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> Rotavirus	-	+	-	-	-	-
39	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-

* + en - = positief en negatief respektiewelik vir die spesifieke eienskap; \pm = intermediêr toksies; ? = stimuleer CHO-K1 selle.

TABEL 2-9. Klassifikasie en verspreiding van potensiële enteropatogene organismes by pasiënte vergeleke met die kontrolegroep

Enteropatogene organismes	Aantal pasiënte	% Pasiënte	Aantal kontroles	% Kontroles
Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	18	46,2	0	0
Rotavirus	17	43,6	0	0
Seropositiewe <i>E. coli</i> [*]	15	38,5	1	5,6
<i>S. aureus</i>	6	15,4	0	0
<i>Salmonella spesies</i>	2	5,1	0	0
<i>Shigella spesies</i>	2	5,1	0	0
<i>Candida albicans</i>	1	2,6	0	0
<i>Candida krusei</i>	1	2,6	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2,6	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	2,6	0	0
Hly ⁺ <i>E. coli</i>	1	2,6	0	0
Parasiëte ^{**}	0	0,0	2	11,1
Geen agens	1	2,6	15	83,3

* Sluit 4 Tox⁺, seropositiewe *E. coli* stamme uit. Een Pasiënt het 2 verskillende serotipes gehuisves.

***Ascaris* wurms is waargeneem

Enterotoksigene bakterieë kon by 18 van die 39 (46,2%) pasiënte aangetoon word (tabel 2-9). Daarenteen kon slegs by een lid van die kontrolegroep 'n intermediêr toksiese *E. coli* (LT) gevind word. Twintig verskillende Tox⁺ stamme was by die 18 pasiënte teenwoordig (tabel 2-8). Die LT- en ST-reaksies in CHO-K1 selle en suigelingmuise respektiewelik word in tabel 2-10 aangedui. Hierdie reaksies is verteenwoordigend van die beste toksienproduseerders uit die onderskeie stoelgange.

Al die moontlike kombinasies van toksienvorming naamlik ST alleen, LT alleen en ST + LT is by *E. coli* isolate uit pasiënte gevind (tabel 2-10). Dit is egter opmerklik dat die vermoë om ST te vorm slegs by *E. coli* isolate voorgekom het. In teenstelling hiermee is ook

TABEL 2-10. Enterotoksienreaksies van Tox⁺ *Enterobacteriaceae* met CHO-K1 selle (LT) en suigelingmuise (ST)

Pasiënt nommer	Stam nommer	Mikroörganisme	% CHO-K1 selle gestimuleer (LT)	Vloeistofakkumulasie in suigelingmuise	Enterotoksiene
2	H2E	<i>E. coli</i>	1,0	0,1535	ST
11	H11R	<i>E. aerogenes</i>	31,0	0,0493	LT
12	H12C	<i>E. coli</i>	2,0	0,1814	ST
13	H13B	<i>E. coli</i>	28,0	0,0563	LT
14	H14A	<i>K. pneumoniae</i>	37,0	0,0461	LT
16	H16H	<i>E. coli</i>	43,0	0,0500	LT
18	H18D	<i>E. coli</i>	47,0	0,1204	ST LT
20	H20A	<i>E. coli</i>	30,0	0,0531	LT
22	H22L	<i>E. cloacae</i>	37,0	0,0490	LT
23	H23M	<i>K. pneumoniae</i>	34,0	0,0573	LT
24	H24D	<i>E. coli</i>	23,0	0,0543	LT
26	H26B	<i>E. cloacae</i>	34,0	0,0474	LT
29	H29P	<i>K. pneumoniae</i>	38,0	0,0529	LT
33	H330	<i>P. vulgaris</i>	33,0	0,0504	LT
36	H36A	<i>E. coli</i>	39,0	0,1451	ST LT
	H36P	<i>E. coli</i>	5,0	0,1287	ST
37	H37T	<i>K. pneumoniae</i>	29,0	0,0512	LT
38	H38J	<i>E. coli</i>	0,0	0,0873	ST
	H38N	<i>K. pneumoniae</i>	25,0	0,0590	LT
39	H39E	<i>E. coli</i>	31,0	0,0581	LT

E. coli, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* en *P. vulgaris* wat slegs LT produseer uit pasiënte geïsoleer (tabel 2-10). *E. coli* is ook die belangrikste toksienproduseerder omdat 11 van die 20 (55%) Tox^+ stamme *E. coli* is en dit by 10 pasiënte (25,6%) geïsoleer is.

Op grond van die beste LT-produserende stam per stoelgang kan 'n indeling van die pasiënte en die kontrolegroep volgens figuur 2-4 met betrekking tot LT produseerders gemaak word. Groepe 1 en 2 verteenwoordig die nie-toksiese stamme uit pasiënte en kontroles. Groep 3 verteenwoordig hoogs toksiese stamme wat slegs deur pasiënte gehuisves is. Morfologiese stimulering van CHO-K1 selle deur die beste LT-produserende organismes uit groep 3 het onderling gewissel van stam tot stam maar was redelik konstant vir 'n gegewe stam (tabel 2-10; sien ook hoofstuk 3).

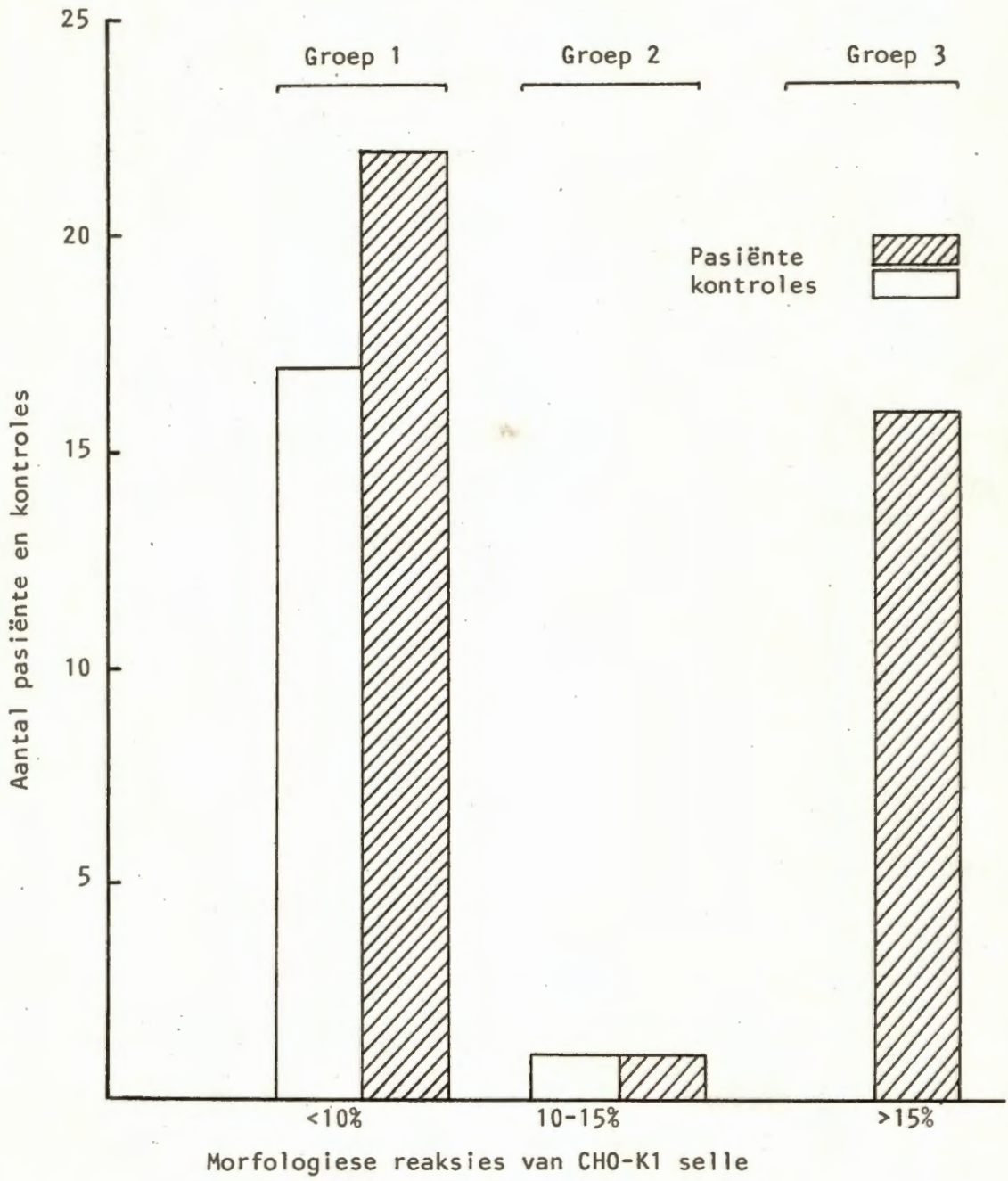
Soos in die geval van die ander enteropatogene groepe (sien hieronder) was die Tox^+ bakterieë dikwels met ander moontlike enteropatogene organismes geassosieer. Die volledige assosiasies van hierdie groep word in tabel 2-11 uiteengesit.

Dit is duidelik uit tabel 2-11 dat daar by 8 pasiënte (20,5%) slegs Tox^+ *E. coli* teenwoordig was. Al die ander Tox^+ *Enterobacteriaceae* was met ander potensiële enteropatogene organismes geassosieer.

Die hoë voorkomssyfer (46,2%) van Tox^+ *Enterobacteriaceae*, sowel as die feit dat by 8 pasiënte (20,5%) geen ander veroorsakende organismes gevind is nie, sonder die Tox^+ bakterieë uit as die belangrikste groep enteropatogene organismes in hierdie studie.

2.8.2 Enteropatogene serotipes van *E. coli*

Sestien klassieke Tox^- enteropatogene serotipes van *E. coli* is volgens tabel 2-8 by 15 pasiënte (38,5%) aangetoon. Daarenteen is slegs by een lid van die kontrolegroep (5,6%) 'n seropositiewe *E. coli*, 0126:K71 (B16), gevind. Die assosiasies van hierdie groep enteropatogene organismes toon volgens tabel 2-12 dat daar by 5 van die pasiënte (12,8%) slegs Tox^- seropositiewe (SP) *E. coli* stamme teenwoordig was.



Figuur 2-4. Verspreiding van LT produseerders by pasiënte en kontroles.

TABEL 2-11. Assosiasies van Tox⁺ *Enterobacteriaceae*

Assosiasies van Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	Aantal patiënte	% patiënte
<i>E. coli</i> (LT) alleen	4	10,3
<i>E. coli</i> (ST) alleen	2	5,1
<i>E. coli</i> (ST + LT) alleen	1	2,6
<i>E. coli</i> (ST) en <i>E. coli</i> (ST + LT)	1	2,6
<i>E. coli</i> (LT) en <i>S. aureus</i>	1	2,6
<i>E. coli</i> (ST), <i>K. pneumoniae</i> (LT) en rotavirus	1	2,6
<i>K. pneumoniae</i> (LT), <i>S. enteritidis</i> <i>E. coli</i> (SP) en <i>S. aureus</i>	1	2,6
<i>K. pneumoniae</i> (LT) en rotavirus	2	5,1
<i>K. pneumoniae</i> (LT), <i>E. coli</i> (SP) en rotavirus	1	2,6
<i>E. cloacae</i> (LT) en <i>E. coli</i> (SP)	1	2,6
<i>E. cloacae</i> (LT), <i>S. aureus</i> en rotavirus	1	2,6
<i>E. aerogenes</i> (LT), <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> (SP), <i>S. aureus</i> en rotavirus	1	2,6
<i>P. vulgaris</i> (LT) en rotavirus	1	2,6

TABEL 2-12. Assosiasies van Tox⁻, seropositiewe *E. coli*

Assosiasies van <i>E. coli</i> (SP)*	Aantal patiënte	% patiënte
<i>E. coli</i> (SP) alleen	5	12,8
<i>E. coli</i> (SP), <i>K. pneumoniae</i> (LT) en rotavirus	1	2,6
<i>E. coli</i> (SP), <i>K. pneumoniae</i> (LT) <i>S. enteritidis</i> en <i>S. aureus</i>	1	2,6
<i>E. coli</i> (SP) en <i>E. cloacae</i> (LT)	1	2,6
<i>E. coli</i> (SP), <i>E. aerogenes</i> (LT), <i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i> en rotavirus	1	2,6
<i>E. coli</i> (SP) en rotavirus	4	10,3
<i>E. coli</i> (SP) en <i>Shigella</i> spesies	2	5,1

* Sluit 4 Tox⁺, seropositiewe *E. coli* stamme uit

Die vermoë om enterotoksiene te produseer kon slegs by 4 van 20 (20%) verskillende seropositiewe *E. coli* stamme gedemonstreer word (tabel 2-13). In teenstelling hiermee kon enterotoksienproduksie by 7 (63,6%) nie-seropositiewe *E. coli* stamme aangetoon word. In die gevalle waar seropositiewe *E. coli* wel toksiene kan produseer is al die moontlike kombinasies gevind (sien tabel 2-13).

2.8.3 *Salmonella* en *Shigella* spesies

Alhoewel geen *Salmonella* en *Shigella* spesies by kontroles gevind is nie kon *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* en *Shigella sonnei* by elk van 4 pasiënte geïsoleer word (tabel 2-8). Die twee *Shigella* spesies was die enigste organismes in hierdie studie wat indringende eienskappe openbaar het (tabel 2-8). Die lae voorkomssyfer van beide *Salmonella* (5,1%) en *Shigella* (5,1%) spesies is opvallend. Elk van hierdie organismes was met ander potensiële enteropatogene organismes geassosieer (sien tabel 2-14).

2.8.4 *Staphylococcus aureus*

Hierdie organisme is by 6 pasiënte (15,4%) geïsoleer maar was afwesig by kontroles (sien tabelle 2-8 en 2-9). By 4 isolate kon stimulering van CHO-K1 selle(?) aangetoon word terwyl 2 isolate negatief was vir hierdie reaksie. Een van die positiewe isolate was die enigste organisme wat by daardie pasiënt geïnkrimineer kon word (tabel 2-8). Geen *S. aureus* isolaat kon ST produseer nie.

Die volledige assosiasies van *S. aureus* word in tabel 2-15 uiteengesit.

2.8.5 Eenmalige patogene isolate

'n Verskeidenheid potensiële enteropatogene organismes is elk slegs eenmaal by pasiënte geïsoleer. Die voorkoms en assosiasies van hierdie organismes word in tabelle 2-8 en 2-16 respektiewelik saamgevat.

TABEL 2-13. Toksienproduksie en enteropatogene serotipes

Tox ⁻ Seropositiewe <i>E. coli</i>	ST	LT	Aantal
<i>E. coli</i> 0125:K70(B15)	-	-	8
<i>E. coli</i> 0126:K71(B16)	-	-	3
<i>E. coli</i> 0114:K90(B)	-	-	1
<i>E. coli</i> 0127:K63(B8)	-	-	1
<i>E. coli</i> Polivalent 1	-	-	1
<i>E. coli</i> Polivalent 2	-	-	1
<i>E. coli</i> Polivalent 4	-	-	1
Tox ⁺ Seropositiewe <i>E. coli</i>			
* <i>E. coli</i> 055:K59(B5):H ⁻	-	+	1
* <i>E. coli</i> 078:K? :H ⁻	-	+	1
* <i>E. coli</i> 0114:K90 :H?	+	-	1
* <i>E. coli</i> 0128:K67 :H27	+	+	1
Tox ⁺ nie-seropositiewe <i>E. coli</i>			
* <i>E. coli</i> 07:K?:H27	+	-	1
* <i>E. coli</i> 071:K?:H?	-	+	1
* <i>E. coli</i> 0rof:K?:H55	+	-	1
<i>E. coli</i> -	+	-	1
<i>E. coli</i> -	-	+	2
<i>E. coli</i> -	+	+	1

* Serotipes bevestig en H-antigene bepaal deur dr B Rowe, Central Public Health Laboratory, Colindale, London.

TABEL 2-14. Assosiasies van *Salmonella* en *Shigella* spesies

Assosiasies van <i>Salmonella</i> en <i>Shigella</i> spesies	Aantal pasiënte	% pasiënte
<i>S. typhi</i> , <i>E. aerogenes</i> (LT), <i>E. coli</i> (SP) <i>S. aureus</i> en rotavirus	1	2,6
<i>S. enteritidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> (LT) <i>E. coli</i> (SP) en <i>S. aureus</i>	1	2,6
<i>Sl flexneri</i> en <i>E. coli</i> (SP)	1	2,6
<i>S. sonnei</i> en <i>E. coli</i> (SP)	1	2,6

TABEL 2-15. Assosiasies van *S. aureus*

Assosiasies van <i>S. aureus</i>	Aantal pasiënte	% pasiënte
<i>S. aureus</i> alleen	1	2,6
<i>S. aureus</i> en <i>E. coli</i> (LT)	1	2,6
<i>S. aureus</i> , <i>E. cloacae</i> (LT) en rotavirus	1	2,6
<i>S. aureus</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> (SP) <i>S. typhi</i> en rotavirus	1	2,6
<i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (SP) en <i>S. enteritidis</i>	1	2,6
<i>S. aureus</i> en <i>P. aeruginosa</i>	1	2,6

TABEL 2-16. Assosiasies van eenmalige patogene isolate

Assosiasie van eenmalige isolate	Aantal pasiënte	% pasiënte
<i>C. albicans</i> alleen	1	2,6
<i>C. krusei</i> , <i>B. cereus</i> en rotavirus	1	2,6
<i>P. aeruginosa</i> en <i>S. aureus</i>	1	2,6
Hly ⁺ <i>E. coli</i> en rotavirus	1	2,6

By een pasiënt (2,6%) is 'n aantal isolate van *Candida albicans* gemaak. Hierdie organisme was die dominante in die stoelgang en geen ander potensiële patogene organismes is by hierdie pasiënt gevind nie (sien tabel 2-8).

Een pasiënt (2,6%) het 'n stoelflora opgelewer wat slegs uit *Candida krusei* en *Bacillus cereus* bestaan het (sien tabel 2-8). Beide organismes was in min or meer gelyke getalle teenwoordig. *C. krusei* stimuleer CHO-K1 selle tot 11% en *B. cereus* tot 'n morfologiese afwyking van 43%. Die reaksie van *B. cereus* vir ST was intermediêr positief. *B. cereus* was ook β -hemolities op gewone BA-plate.

Slegs by een pasiënt is *Pseudomonas aeruginosa* geïsoleer (sien tabel 2-8). Hierdie organisme produseer 'n "toksien" wat CHO-K1 selle binne 3 uur "oplos" wanneer toksienpreparate soos vir LT berei en getoets word. 'n Soortgelyke sitotoksiese effek is by die Hela-seltoets waargeneem. Die Serény-toets was negatief. Dit blyk nie duidelik uit die Hela-seltoets of hierdie organisme wel indringend is nie. Enteropatogene vermoëns word egter ook aan sitotoksiese eienskappe toegeskryf (sien bespreking). Wanneer ST berei en getoets word toon dit hoogs potente eienskappe. Muiset het feitlik sonder uitsondering binne 30 minute na toediening van 'n 100 μ l dosis gesterf. Hierdie eienskap bly stabiel na verhitting tot

100°C vir 20 minute. Vloeistofakkumulاسie is wisselvallig tussen intermediêr en afwesigheid. *P. aeruginosa* was met *S. aureus* geassosieer (sien tabel 2-16) maar is nie by die kontrolegroep geïsoleer nie.

By slegs een pasiënt (sien tabel 2-8) is 'n aantal α -hemolisienproduserende *E. coli* isolate gevind. Geen ander patogene vermoëns kon by hierdie isolate aangedui word nie. Hierdie pasiënt het ook rotavirus gehuisves (sien tabel 2-16). Hemolisienproduksie was afwesig by al die isolate van die kontrolegroep.

2.8.6 Parasiete

Geen pasiënt het demonstreerbare parasiete gehuisves nie. By twee lede van die kontrolegroep kon egter *Ascaris* wurms aangedui word (sien tabel 2-9).

2.8.7 Rotavirus

Rotavirus kon slegs by 2 van 37 pasiënte (5,4%) met behulp van elektronmikroskopie (EM) aangetoon word. Met die omgekeerde komplementbindingstegniek (OKB) was 17 pasiënte (43,6%), insluitende bogenoemde twee, positief (sien tabel 2-8). Volgens die verspreiding van rotavirus by pasiënte (tabel 2-9) verteenwoordig dit die tweede hoogste voorkomssyfer (43,6%) na Tox^+ *Enterobacteriaceae*. Rotavirus kon egter slegs by 4 pasiënte (10,3%) as die enigste potensiële oorsaak van gastroënteritis geïmpliseer word. Die volledige assosiasies van rotavirus verskyn in tabel 2-17.

As gevolg van die lae gevoeligheid van die elektronmikroskoop vir die bepaling van rotavirus is slegs die omgekeerde komplementbindings-tegniek by die kontroles toegepas. Geen rotavirus kon egter by hierdie groep aangedui word nie.

Twee van die 39 pasiënte en drie van die 18 kontroles se stoelgange was antikomplementêr.

TABEL 2-17. Assosiasies van rotavirus

Assosiasies van rotavirus	Aantal pasiënte	% pasiënte
Rotavirus alleen	4	10,3
Rotavirus, <i>E. coli</i> (ST) en <i>K. pneumoniae</i> (LT)	1	2,6
Rotavirus en <i>K. pneumoniae</i> (LT)	2	5,1
Rotavirus, <i>K. pneumoniae</i> (LT) en <i>E. coli</i> (SP)	1	2,6
Rotavirus, <i>E. cloacae</i> (LT) en <i>S. aureus</i>	1	2,6
Rotavirus, <i>E. aerogenes</i> (LT), <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> (SP) en <i>S. aureus</i>	1	2,6
Rotavirus en <i>P. vulgaris</i> (LT)	1	2,6
Rotavirus en <i>E. coli</i> (SP)	4	10,3
Rotavirus, <i>C. krusei</i> en <i>B. cereus</i>	1	2,6
Rotavirus en Hly ⁺ <i>E. coli</i>	1	2,6

2.9 Omvattende bevindings

Potensiële patogene organismes kon by 38 pasiënte (97,4%) geïsoleer word. By 19 van die 39 pasiënte (48,7%) kon ongeassosieerde organismes betrek word. Die voorkoms van hierdie ongeassosieerde patogene groepe word in tabel 2-18 opgesom.

Volgens die verspreiding (tabel 2-9) en voorkoms van ongeassosieerde organismes (tabel 2-18) kan 'n indeling van die patogene organismes volgens tabel 2-19 gemaak word.

Uit die gegewens in tabel 2-19 kan gesien word dat elkeen van die hoofgroepe organismes by 'n groot deel van die pasiënte aanwesig was. Hierdie voorkomssyfer kontrasteer grootliks met die kontroles (sien tabel 2-9).

TABEL 2-18. Die voorkoms van ongeassosieerde organismes

Patogene Mikroörganisme	Aantal pasiënte	% pasiënte
<i>E. coli</i> (LT)	4	10,3
<i>E. coli</i> (ST)	2	5,1
<i>E. coli</i> (ST + LT)	1	2,6
<i>E. coli</i> (ST; ST + LT)	1	2,6
<i>E. coli</i> 0126:K71 (B16)	3	7,7
<i>E. coli</i> 0125:K70 (B15)	2	2,6
Rotavirus	4	10,3
<i>S. aureus</i>	1	2,6
<i>C. albicans</i>	1	2,6

TABEL 2-19. Klassifikasie van hoofgroepe enteropatogene organismes volgens voorkoms by pasiënte

Hoofgroepe Enteropatogene	Aantal pasiënte	% pasiënte
Tox ⁺ <i>Enterobacteriaceae</i>	18	46,2
Rotavirus	17	43,6
Klassieke enteropatogene [*]	19	48,7
Ander enteropatogene	11	28,2

* Sluit *Salmonella* en *Shigella* spesies en enteropatogene serotipes van *E. coli* in maar nie 4 Tox⁺ seropositiewe *E. coli* stamme nie.

BESPREKING

2.10 Enterotoksigene *Enterobacteriaceae*

Met betrekking tot die voorkomssyfer (46,2%) sowel as die persentasie ongeassosieerde organismes (20,5%) uit hierdie groep moet die Tox^+ *Enterobacteriaceae* as die belangrikste homogene groep potensieële enteropatogene organismes beskou word. Die hoë isolasiefrekwensie van hierdie bakterieë (46,2%) vertoon goeie korrelasie met die betreklik min studies in ander ontwikkelende lande. Volgens Nalin *et al.* (1975) kon hulle by 55% van hulle pasiënte in Bangladesh Tox^+ *E. coli* aandui en uit Brasilië is by 50% van die pasiënte Tox^+ bakterieë geïmpliseer (Guerrant *et al.*, 1975). Gegewens uit ontwikkelde lande varieer aansienlik. Die totale afwesigheid van enterotoksigene bakterieë is in studies uit Australië (Davidson *et al.*, 1975) en Brittanje (Gross, Scotland en Rowe, 1976) gerapporteer. Hierteenoor verskil verslae uit die V.S.A. van 73% in Chicago (Gorbach en Khurana, 1972), 86% in Texas (Rudoy en Nelson, 1975) en 16% by Apache kinders (Sack *et al.*, 1975) tot die algehele afwesigheid van hierdie bakterieë by kinders in Honolulu (Dean *et al.*, 1972), Boston (Echeverria *et al.*, 1975) en Columbia distrik (Kapikian, Kim, Wyatt, Cline, Arrobio, Brandt, Rodriguez, Sack, Chanock en Parrott, 1976).

Slegs een ondersoek waarin daar na enterotoksigene bakterieë in Afrika verwys word kon by die aanvang van hierdie studie opgespoor word. Volgens Schoub *et al.* (1975) kon hulle by 3% van hulle pasiënte ST-produiserende *E. coli* stamme isoleer. Die vermoë om LT te produseer is egter nie in daardie ondersoek bepaal nie (B D Schoub, persoonlike mededeling). Sedertdien is kennis geneem van enkele ander ondersoeke op hierdie kontinent. Uit Kenia is 'n voorkomssyfer van 2% gerapporteer (Mutanda, Hillman, Shukla en Oduori, 1976). Daar is egter net vir LT^+ *E. coli* gesoek. In teenstelling met laasgenoemde twee bevindinge rapporteer Wadström *et al.* (1976a en b) enteropatogene bakterieë by 37% van hul pasiënte in Ethiopië. Hulle rapporteer ook enterotoksigene bakterieë uit hierdie pasiënte wat, afgesien van *E. coli* wat slegs 38% van die isolate uitmaak, tot die genera *Klebsiella* (15%), *Enterobacter* (12%), *Citrobacter* (11%), *Aeromonas* (11%), *Proteus* (7%), *Serratia* (2%) en *Pseudomonas* (1%) behoort. Die

resultate van Wädström *et al.* (1976a en b) bevestig bevindinge uit hierdie studie wat reeds gerapporteer is (Schoub, Greeff, Lecatsas, Prozesky, Hay en Prinsloo, 1976a; Greeff *et al.*, 1977; Schoub *et al.*, 1977). In teenstelling word die isolasie van enterotoksigene *E. coli* by 6,2% van Swart pasiënte onder 2 jaar oud met akute gastroënteritis, nie deur Freiman, Hartman, Kassel, Robins-Browne, Schoub, Koornhof, Lecatsas en Prozesky (1977) as 'n betekenisvolle oorsaak van die siekte in hulle ondersoek beskou nie. 'n Vergelyking tussen die bevindinge van die huidige ondersoeke met dié van sommige ander werkers word in tabel 2-20 saamgevat.

Met verwysing na enterotoksigene bakterieë rapporteer feitlik al hierdie ondersoeke slegs die teenwoordigheid van Tox⁺ *E. coli* stamme. In baie min van hierdie ondersoeke is *E. coli* of ander lede van die familie *Enterobacteriaceae* geïsoleer wat slegs LT produseer (sien tabel 2-20). In teenstelling was dit juis 'n uitstaande bevinding van hierdie studie. Uiteenlopende werkswyses en metodes vir die bepaling van Tox⁺ bakterieë is deur hierdie werkers gebruik en dit verklaar soms die afwesigheid van ST of LT (Ryder *et al.*, 1976). Die gebruik van onder andere die konyn-ileumtus vir die demonstrasie van enterotoksien is berug vir die wisselvallige resultate wat dit met menslike Tox⁺ stamme gee (Smith en Halls, 1967a; Gorbach en Khurana, 1972; Editorial, 1975a). 'n Vergelyking met vorige bevindings word ook bemoeilik deur die beperkte spektrum van potensiële veroorsakende organismes wat deur meeste van hierdie werkers bestudeer is.

Die isolering van bakterieë wat óf LT óf ST afskei impliseer dat enige van hierdie enterotoksiene by die etiologie van gastroënteritis van belang is. Volgens Sack (1975) is feitlik alle enterotoksigene *E. coli* stamme wat tot dusver geïsoleer is produseerders van ST + LT. Soos in die huidige studie kon slegs LT-produseerders ook deur Guerrant *et al.* (1975) by akute kindergastroënteritis betrek word. Soortgelyk dui die huidige ondersoek en die van ander op 'n rol vir slegs ST-produseerders (Levine, Caplan, Waterman, Cash, Hornick en Snyder, 1977).

TABEL 2-20. Persentasie isolasiefrekwensies van enterotoksigene bakterieë by suigelings- en kinderdiarree

VERWYSING	AREA	TOKSIENE		ISOLASIE %
Dean <i>et al.</i> , 1972	Honolulu	-	-	0
Gorbach & Khurana, 1972	Chicago	LT	ST	73
Sack <i>et al.</i> , 1975	Apache kinders, Arizona	LT	ST	16
Guerrant <i>et al.</i> , 1975	Brasilië	LT	ST	50
Nalin <i>et al.</i> , 1975	Bangladesh	LT	ST	55
Davidson <i>et al.</i> , 1975	Australië	-	-	0
Schoub <i>et al.</i> , 1975	Swart (RSA)	-	ST	3
Echeverria <i>et al.</i> , 1975	Boston	-	-	0
Rudoy & Nelson, 1975	Texas	LT	ST	86
Gross <i>et al.</i> , 1976	Verenigde Koninkryk	-	-	0
Mutanda <i>et al.</i> , 1976	Kenia	LT	-	2
Kapikian <i>et al.</i> , 1976b	V.S.A.	-	-	0
Wädström <i>et al.</i> , 1976a	Ethiopië	LT	ST	37
Onderhawige ondersoek	Swart (RSA)	LT		36
			ST	10
		LT	ST	5

Baie min ondersoek na die etiologie van gastroënteritis verwys na die isolering van ander enterotoksigene bakterieë as *E. coli* en *V. cholerae*. Laasgenoemde organisme is nie tydens hierdie studie geïsoleer nie. Die endemiese teenwoordigheid van cholera in Malawi, Mosambiek en Angola in 1973 het egter gelei tot die daarstelling van 'n Nasionale Cholera Waaksaamheidsentrum in Johannesburg, met streeklaboratoriums in verskeie provinsies en tuislande (Isaacson, 1975). Dit is grootliks te danke aan hierdie waaksaamheidsentrum dat 'n uitbreek van cholera 10 dae voor die diagnose van die eerste simptomatiesse geval voorspel kon word (Isaacson, Clarke, Ellacombe, Smit, Smit, Koorhof, Smith en Kriel, 1974). Die moontlikheid dat *V. cholerae* in die toekoms 'n groter rol in die etiologie van gastroënteritis in die Republiek mag speel is dus nie uitgelsuit nie.

Die verskeidenheid Tox⁺ genera; *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* en *Proteus*, wat tydens die huidige ondersoek geïsoleer is, verbreed die insig aangaande die etiologie van gastroënteritis. Afgesien van *E. coli* was lede van die ander genera by 9 van die 18 (50%) pasiënte wat enterotoksigene organismes gehuisves het, teenwoordig (sien tabel 2-8). Hierdie organismes was wel altyd met ander organismes geassosieer maar dit was ook die geval met meeste lede van die ander enteropatogene groepe. Die belang van hierdie organismes word nietemin deur die bevindinge van ander werkers bevestig.

Klebsiella pneumoniae word bv dikwels aangetref in assosiasie met *E. coli* by individue met akute diarree (Gorbach, *et al.*, 1971; Gracey, Suharjono, Sunoto en Stone, 1973; Guerrant *et al.*, 1975; Heyworth en Brown (1975). Soms verteenwoordig dit die dominante stoelflora (Olarte, Ferguson, Henderson en Torregrosa 1961; Coello-Ramirez, Lifshitz en Zuniga, 1972).

Enterotoksienvorming by sommige isolate blyk nou van belang te wees by gastroënteritis. Twee *Klebsiella* spesies is deur Guerrant en sy medewerkers (Guerrant *et al.*, 1975) by 2 van 40 pasiënte (5%) onder 10 jaar oud geïsoleer. Beide organismes was slegs LT⁺ en was met LT⁺ *E. coli* geassosieer. Verskeie Tox⁺ genera naamlik *E. coli* (38%), *Klebsiella* (15%), *Enterobacter* (12%), *Citrobacter* (11%), *Aeromonas* (11%), *Proteus* (7%), *Serratia* (2%) en *Pseudomonas* (1%) is deur Wadström *et al.*

(1976a en b) by suigeling en kinders met akute gastroënteritis uit Ethiopië gerapporteer. By elk van 18 pasiënte was 2 verskillende spesies betrokke. Alhoewel laasgenoemde werkers nie die tipe enterotoksiene wat by die onderskeie genera voorgekom het vermeld nie, is gebruik gemaak van die konyn-ileumtus, die konyn-veltoets (deurlaatbaarheidsfaktor) en die Y1 bynier seltoets om enterotoksien aan te dui.

'n Belangrike aspek van laasgenoemde ondersoek is dat dit in kontras staan met hulle bevindings in 'n soortgelyke ondersoek in Swede waar slegs 2 uit 28 (7,1%) Tox⁺ stamme nie *E. coli* organismes was nie. Hierdie kontras mag volgens hulle aan geografiese en ouderdomsverskille te wyte wees. Stabiele toksien van *Klebsiella* en *Enterobacter* spesies speel ook 'n rol by gastro-intestinale aandoenings. Klipstein *et al.* (1973) kon ST⁺ *K. pneumoniae* en *E. cloacae* stamme uit die midjejunum van pasiënte met tropiese spru isoleer. Die enterotoksien van beide hierdie *K. pneumoniae* en *E. cloacae* stamme kom ooreen met die biofisiese, biochemiese en fisiologiese eienskappe van *E. coli* stabiele toksien (Klipstein en Engert, 1975; 1976a en b). Alhoewel daar herhaaldelik vir ST by onder andere *Klebsiella* en *Enterobacter* spesies uit die huidige ondersoek getoets is, kon hierdie klas enterotoksien nie gedemonstreer word nie.

Met die uitsondering van die verslae van Wadström *et al.* (1976a en b) waar ongedifferensieerde Tox⁺ *Proteus* spesies by gastroënteritis geïnkrimineer is, konstateer hierdie studie konkrete enteropatogene vermoëns met betrekking tot die moontlike meganisme van diarree-induksie deur die choleraagtige enterotoksien van *Proteus vulgaris*. (Greeff *et al.*, 1977; en sien hoofstuk 3).

Die *Salmonella* spesies uit die huidige ondersoek het geen enterotoksien-aktiwiteit of indringende vermoëns getoon nie. Tog is enterotoksiene by 'n kliniese isolaat van *Salmonella enteritidis* wat eienskappe soos die van *E. coli* LT en ST het deur Koupal en Deibel (1975) beskryf. Twee vaskulêre deurlaatbaarheidsfaktore is ook by *S. typhimurium* aangetoon (Sandefur en Peterson, 1976). Laasgenoemde organisme skei ook 'n enterotoksien in steriele ru-preparate uit wat CHO-selle stimuleer en

deur antiserum teen choleraegeen, en die B subeenheid daarvan, geneutraliseer word (Sandefur en Peterson, 1977).

Afgesien van die welbekende toksien van *Shigella dysenteriae* 1 is daar onlangs 'n soortgelyke toksien by *S. flexneri* 2a beskryf (O'Brien *et al.*, 1977). In die huidige studie is nietemin geen enterotoksiene-aktiwiteit by *Shigella* spesies aargeneem nie (sien ook 2.11). Beide organismes het egter die vermoë tot indringing besit.

2.11 Ander toksienproduseerders en eenmalige isolate

Geen choleraegeen-agtige of stabiele enterotoksiene kon onomwonde by die ander isolate uit die huidige ondersoek aangetoon word nie. Enterotoksiene mag egter op verskillende wyses diarree induseer. Bakteriese enterotoksiene wat veranderinge in vloeistof en elektroliet transport in die dermkanaal teweegbring word dan ook volgens Keusch en Donta (1975) in twee kategorieë ingedeel : dié wat 'n verhoging van cAMP deur middel van stimulering van adenielsiklase teweegbring en die wat sitotoksies is. Beide choleraegeen en *E. coli* LT veroorsaak cAMP-afhanklike reaksies by onder andere CHO-K1 selle (Guerrant *et al.*, 1974), Y1-bynierselle (Donta, King en Sloper, 1973; Donta en Smith, 1974) en tydens verhoging van vaskulêre deurlaatbaarheid in die vel (Basu Mallik en Ganguli, 1964; Craig, 1965; Evans *et al.*, 1973a).

In die dermkanaal verhoog choleraegeen die transmurale potensiaalverskil en die kortsluitingstroom asook die netto Cl^- sekresie. Terselfdertyd verminder dit die netto Na^+ absorpsie (Field, Fromm, Wallace en Greenough, 1969). Nóg choleraegeen nóg *E. coli* LT beskadig egter die mukosa van die ileum of jejunum histologies of is sitotoksies vir Hela-selle (Carpenter, 1972; Keusch en Donta, 1975).

In teenstelling met choleraegeen verander enterotoksiene van *Clostridium perfringens* en *Shigella dysenteriae* die water en elektroliet transport in die dermkanaal sonder stimulering van adenielsiklase en verhoog dit ook nie vaskulêre deurlaatbaarheid in die konyvel nie (Keusch, Grady, Mata en McIver, 1972; Stark en Duncan, 1972). Enterotoksiene van beide hierdie organismes is wel sitotoksies vir Hela-selle (Keusch en

Donta, 1975) en induseer vloeistofakkumulاسie in die rot-ileum en konyn-jenunum respektiewelik (McDonel, 1974; Steinberg, Banwell, Yardley, Keuch en Hendrix, 1975).

Die atipiese effekte wat by sommige isolate waar onder *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* en *C. krusei* tydens toksientoetsing waargeneem is, kan moontlik in die lig van bogenoemde aspekte vertolk word. 'n *P. aeruginosa* isolaat uit die huidige studie is sitotoksies vir CHO-K1 en Hela-selle. Dit veroorsaak ook intermediêre vloeistofakkumulاسie in suigelingmuise en dood hulle binne dertig minute. Hierdie bevindings kom ooreen met die tweede klas enterotoksiene volgens Keusch en Donta (1975). Sedert die voltooiing van hierdie ondersoek is identiese resultate behaal met *P. aeruginosa* afkomstig van twee Blanke pasiënte onder 5 jaar oud met akute gastroënteritis (A.S. Greeff; ongepubliseerde waarneming).

Die vermoë om vloeistofsekresie van die mukosa van proefdiere te induseer of diarree by mense te verwek is reeds by verskeie Gram-positiewe organismes aangetoon. Sommige navorsers skryf dan ook 'n besliste rol aan *S. aureus* toe by die verwekking van diarree (Bergdoll, 1972). Nietemin verskil die meganisme waarskynlik van die klassieke *V. cholerae* en verwante entiteite (O'Brian en Kapral, 1976). Dit word bv. algemeen aanvaar dat vomering (en soms diarree) tydens stafilokokale voedselvergiftiging, die gevolg van enterotoksien is. Hierteenoor verskil die kliniese beeld van stafilokokale enteritis (onder andere oorvloedige diarree) kenmerkend van laasgenoemde (Craig, 1972).

In die huidige ondersoek is *S. aureus* by ses pasiënte (15,4%) geïsoleer. In een geval was geen ander potensiële enteropatogene organismes daarmee geassosieer nie (sien tabel 2-15). By vier verskillende isolate, insluitende laasgenoemde, is stimulering van CHO-K1 selle waargeneem (tabel 2-8). Hierdie resultate word ondersteun deur onlangse bevindings. Die deltatoksien van *S. aureus* inhibeer die absorpsie van water vanuit die dermkanaal van marmotte en konyne (Kapral, O'Brian, Ruff en Drugan, 1976). Dit is positief

in die marmotveltoets (deurlaatbaarheidsfaktor) en verhoog die cAMP van marmotmukosa (O'Brian en Kapral, 1976). Die is ook verantwoordelik vir histologiese beskadiging van die marmotileum (O'Brian en Kapral, 1976), dit is sitotoksies vir Hela-selle en liseer CHO-K1 en Y1-bynierselle (O'Brian en Kapral, 1977). Hoogs gesuiwerde deltatoksien stimuleer egter nie CHO-K1 selle nie (O'Brian en Kapral, 1977). Met verwysing na die indeling van enterotoksiene volgens Keusch en Donta (1975) vertoon *S. aureus* deltatoksien dus eienskappe van beide kategorieë enterotoksiene. Deltatoksien word vry algemeen deur *S. aureus* stamme uitgeskei en tesame met die invallende vermoëns van hierdie organisme besit dit wye patogene potensiaal (O'Brian en Kapral, 1976). Op grond van die huidige eksperimentele getuienis behoort *S. aureus* dus nie sonder meer as 'n potensiële verwekker van akute gastroënteritis uitgesluit te word nie.

In hierdie ondersoek is bevind dat *B. cereus* CHO-K1 selle stimuleer en ook intermediêre vloeistofakkumulاسie in die suigelingmuis verwek (tabel 2-8). Hierdie effek simuleer dus dié van beide *E. coli* ST- en LT. Dit is vóórheen aangetoon dat die meeste stamme van *B. cereus* vloeistofakkumulاسie, wat met dié van *V. cholerae* vergelyk, in die konyn-ileumilus kan induseer (Spira en Goepfert, 1972). 'n Aantal uitbreke van voedselvergiftiging wat deur *B. cereus* veroorsaak is en waarby sowat 600 mense geaffekteer is, word deur Nygren (1962) beskryf. Waterige stoelgange was 'n tipiese simptome. Diarree kon ook by 5 van 7 vrywilligers geinduseer word na inname van sowat 10^8 basille per ml. By kinders kan so min as 10^5 organismes per gram die siekte veroorsaak. Nygren (1962) postuleer dat die enteropatogene vermoë van *B. cereus* aan die produksie van fosforielcholien te wyte is.

Bacillus cereus was in groot getalle saam met 'n *Candida krusei* in die waterige stoelgang van 'n pasiënt teenwoordig (tabel 2-8). Die moontlike rol van laasgenoemde organisme kan dus nie uitgesluit word nie. In der waarheid het ru-toksienpreparate van hierdie gis 'n intermediêre morfologiese stimulering van CHO-K1 selle bewerkstellig. Hiermee word geensins bedoel dat *C. krusei* 'n enterotoksien analoog aan dié van *Enterobacteriae* en *V. cholerae* vorm nie. Alhoewel daar baie goeie korrelasie tussen die konyn-ileumilus en beide die CHO-K1

sellyn en die Y1-byniersellyn vir die bepaling van LT bestaan (Guerrant *et al.*, 1974, 1975; Sack en Sack, 1975), is daar 'n verskeidenheid stowwe wat adeniel siklase kan stimuleer (sien 3.1). In die lig van die kompleksiteit van die eukariotiese sel kan laasgenoemde moontlikheid nie uit die oog verloor word nie. Ongelukkig het hierdie organisme tydens berging afgesterf en dit kon nie verder ondersoek word nie.

By een pasiënt was 'n *Candida albicans* in groot getalle teenwoordig. Geen ander patogene organismes kon geïmpliseer word nie. Volgens Kane, Chretien en Garagusi (1976) kon hulle *C. albicans* en ander *Candida* spesies by 'n aantal pasiënte met diarree impliseer. Veelvuldige los tot waterige stoelgange sonder mukus en bloed en soms gepaard met abdominale krampe was gemeenskaplike simptome.

Die isolering van 'n α -hemolisien-produuserende *E. coli* by een pasiënt is interessant. Die organisme is in suiwerkultuur uit die stoelgang geïsoleer maar was geassosieer met rotavirus (tabel 2-8). Hierdie organisme het geen ander enteropatogene eienskappe openbaar nie. Volgens Smith en Linggood (1970) produseer feitlik alle enterotoksigene *E. coli* stamme afkomstig van varke ook 'n α -hemolisien. Hemolitiese *E. coli* veroorsaak ook diarree en edeemsiekte by varke.

2.12 Enteropatogene serotipes van *E. coli*

Geen konkrete enteropatogene vermoëns kon by 16 klassieke serotipes van *E. coli*, afkomstig van 15 (38,5%) pasiënte gedemonstreer word nie. By 5 (12,8%) van hierdie pasiënte was daar geen ander potensiële enteropatogene organismes met dié serotipes geassosieer nie (tabel 2-12). In teenstelling hiermee is daar vier klassieke serotipes van *E. coli* geïsoleer waarby al die moontlike kombinasies van toksienvorming gedemonstreer is (sien tabel 2-13). Inderdaad is bevind dat die meeste Tox^+ *E. coli* stamme nie tot klassieke enteropatogene serotipes behoort nie (tabel 2-13). Dit volg dus hieruit dat serotipering nie 'n betroubare aanduiding van die vermoë tot enterotoksienproduksie is nie. Tog impliseer die voorkomssyfer (38,5%) en persentasie ongeassosieerde serotipes (12,8%) van Tox^- *E. coli*, gelykwaardige belang vergeleke

met Tox⁺ *Enterobacteriaceae* (46,2% en 20,5%) en rotavirus (43,6% en 10,3%) respektiewelik. 'n Verklaring vir die enteropatogene vermoëns van Tox⁻, nie-indringende enteropatogene serotipes, moet dus langs ander weë gesoek word.

Reeds sedert 1885 toe Escherich die eerste beskrywing van die organisme wat nou as *Escherichia coli* bekend staan gegee het, word hierdie bakterie by suigelingsdiarree betrek. Vroeë navorsers soos Bray (1945) kon deur serotogiese tegnieke sekere stamme van *E. coli* by die etiologie van suigelingsdiarree inkrimineer. Daarna kon serotipes van *E. coli*, 0111(B4) (Giles *et al.*, 1949) en 055(B5) (Taylor *et al.*, 1949), by gastroënteritis uitbreke, met hoë sterftesyfers (40-50%) onder babas, duidelik geïnkrimineer word.

Hierna het verskeie ernstige uitbreke, sommige met hoë sterftesyfers, onder gehospitaliseerde suigeling voorgekom. Enkele enteropatogene serotipes van *E. coli* naamlik 0119:H6 en 0128:H2 (Editorial, 1968), 0114:H2 (Jacobs, Holzel, Wolman, Keen, Miller, Taylor en Gross, 1970) en 0142:H6 (Love, Gordon, Gross en Rowe, 1972; Kennedy, Walker, Fallon, Boyd, Gross en Rowe, 1973) is duidelik by hierdie uitbreke geïnkrimineer. Vroeër het Schroeder *et al.* (1968) 'n ernstige watergedraagde epidemie van gastroënteritis, waarby volwassenes aangetas is, aan *E. coli* 0111 (B4) toegeskryf. Voedsel wat met *E. coli* 0126 (B16) (Vernon, 1969), en *E. coli* 0127:H4 besmet was (Chief Medical Officer of the Department of Health and Social Security, 1974) was 'n verdere oorsaak van gastroënteritis epidemies onder volwasse Britte, en *E. coli* 0124 (B17) onder Amerikaners (Marier *et al.*, 1973). Die gevestigde rol van enteropatogene serotipes van *E. coli* by epidemiese uitbreke van veral suigelingsgastroënteritis is dus goed gedokumenteer. Serotipering van *E. coli* het 'n roetine instelling geword terwyl die meganisme van enteropatogeniteit versluier gebly het.

Drie belangrike ontwikkelinge in die ontrafeling van *E. coli* as enteropatogene organisme het op ongeveer dieselfde tydperk gekom. Die hernude ernstige epidemiese uitbreke van gastroënteritis, veral by suigeling, sedert laat 1967 (sien hierbo) het saamgeval met 'n beskrywing van die rol van *E. coli* ST (Smith en Halls, 1967a en b) en die cholera-geenagtige

E. coli LT (Gyles en Barnum, 1969) in die etiologie van varkdiarree. Kort hierna is Tox^+ *E. coli* ook by gastroënteritis van mense betrek (Du Pont *et al.*, 1971; Gorbach *et al.*, 1971; Sack *et al.*, 1971). Ongeveer dieselfde tyd rapporteer Sakazaki *et al.* (1967) die rol van 'n klein klompie indringende serotipes van *E. coli* 0124, 0136 en 0144, in diarree by ouer kinders en volwassenes in Tokio. Hierdie organismes veroorsaak 'n kliniese sindroom net soos dié van *Shigella*. Indringende stamme wat by suigelingsgastroënteritis betrokke was is hierna in enkele studies gerapporteer. Uit Texas is 'n voorkomssyfer so hoog as 30% gerapporteer (Rudoy en Nelson, 1975) en uit Brasilië 10% (Guerrant *et al.*, 1975). Uit die huidige ondersoek en dié van ander wil dit egter voorkom of indringende *E. coli* stamme nie 'n betekenisvolle rol in gastroënteritis in Suid-Afrika speel nie (Freiman *et al.*, 1977 en Schoub *et al.*, 1977).

Bogenoemde gelyktydige ontwikkelinge het tot etlike ondersoeke, waarin daar na 'n verband tussen enteropatogene serotipes van *E. coli* en konkrete enteropatogene vermoëns gesoek is, gelei. Die mate van sukses met betrekking tot invallende serotipes van *E. coli* (Sakazaki *et al.*, 1967 en Marier *et al.*, 1973) is in teenstelling met verslae van aanhangers van serotipering (Rowe, Gross en Scotland, 1976) en teenstanders daarvan (Sack, 1976).

Die kern van die probleem is daarin geleë dat die vermoë tot enterotoksienproduksie by *E. coli* by sommige stamme deur 'n oordraagbare Ent plasmied beheer word (Smith en Halls, 1968; Smith en Linggood, 1971; Skerman *et al.*, 1972; Gyles *et al.*, 1974; Greeff, 1977). Hieruit volg dat enige Tox^+ *E. coli*, onafhanklik van die serotipe, teoreties die vermoë tot enterotoksienvorming deur konjugasie kan erf (sien hoofstuk 4). Inderdaad is dit in die onderhawige ondersoek bevind dat 'n gegewe klassieke enteropatogene serotipe van *E. coli*, Tox^+ of Tox^- mag wees (sien 0114:K90, tabel 2-13). Volgens tabel 2-13 kan ook gesien word dat 4 van die 11 (36,4%) Tox^+ *E. coli* stamme tot klassieke enteropatogene serotipes behoort. Maar dit is ook duidelik dat die meeste Tox^+ *E. coli* stamme nie tot hierdie serotipes behoort nie terwyl die grootste meerderheid seropositiewe *E. coli* stamme nie enterotoksiene vorm nie.

Afgesien van enterotoksienproduksie en die vermoë tot indringing bied 'n derde meganisme 'n moontlike verklaring vir die enteropatogeniteit van sekere serotipes van *E. coli*. Ørskov, Evans, Sack, Sack en Wadström (1976) voer aan dat die assosiasie tussen serotipe en enterotoksigeniteit nie lukraak is nie en dat die meeste Tox⁺ *E. coli* stamme tot 'n klein groepie O:H serotipes, waar onder 06:H16, 08:H9, 015:H11, 025:H42, 078:H11 en 078:H12 domineer, behoort. Onder hierdie klein groepie serotipes is die H11 antigeen die mees algemene. Volgens Lawn, Ørskov en Ørskov (1977) kan verskillende *E. coli* stamme volgens die elektronmikroskopies bevestigde morfologie van die H antigeen (flagella) onder agt morfotipes, A-F en twee U groepe ingedeel word. Die Tox⁺ *E. coli* stamme behoort almal tot morfotipes B, D, E of U. Die prominente H11 antigeen behoort tot groep D en so ook die twee *E. coli* H antigene, 07:K7:H27 en 0128:K67:H27, uit die onderhawige ondersoek (sien tabel 2-13). Volgens Ørskov *et al.* (1976) is hierdie klein groepe serotipes seldsaam onder meer as 20 000 *E. coli* stamme wat van 'n wye verskeidenheid bronne afkomstig is. Hulle stel dan ook voor dat hierdie spesiale O:H serotipes van *E. coli* klonas verteenwoordig wat geselekteer is om in die spesiale toestande van die dunderm te kan oorleef en as gevolg hiervan 'n groter kans gebied word om die plasmiede wat diarree induseer te erf en te huisves.

Die kwessie van koloniesering deur die organisme en aanhegting aan die gasheermukosa vind aansluiting by bogenoemde.

Die ondersoeke van Freter en sy medewerkers (Hentges en Freter, 1962; Ozawa en Freter, 1964; Fubara en Freter, 1973), asook die van andere (Guentzel en Berry, 1975; Schrank en Verwey, 1976), bepaal dat die assosiasie tussen *V. cholerae* en die dermmukosa onontbeerlik in die patogense van cholera is.

So 'n noue assosiasie word bewerk deur die beweeglikheid van die organisme wat gepaard gaan met 'n positiewe chemotaksis. Laasgenoemde faktore speel ook 'n essensiële rol in die patogense van *S. typhimurium* en *E. coli* ingewandsinfeksies (Allweiss, Dostal, Carey, Edwards en Freter, 1977). Die vermoë van *E. coli* om te kan aanheg is spesies= spesifiek (Editorial, 1977). Die teenwoordigheid van die plasmied

beheerde K88 en K99 antigene verleen 'n spesifieke aanhegtingsvermoë aan enteropatogene *E. coli* stamme van varke en kalwers respektiewelik. Hierdie antigene is ook essensiële virulensiefaktore omdat Tox^+ K88⁻ en Tox^+ K99⁻ *E. coli* stamme swak of geen induseerders van diarree is nie (sien 1.8). Volgens Isaäcson (1977) het die plus proteïen van die K99 antigeen 'n pI van groter as 10, wat dit in die fisiologiese pH van die dunderm 'n positiewe lading gee. As gevolg hiervan klou dit gretig maar nie-spesifiek aan die suur mukopolisakkaried in die dunderm vas. Sodanige kolonisering word waarskynlik gevolg deur 'n hoogs spesifieke ankering van die organisme aan heterosakkariedstrukture van membraan glikoproteïene (Gibbons, Jones en Sellwood, 1975). Indien die organisme nie kan vasheg nie word dit reeds vroeg deur die geïnduseerde vloeistofsekresie uit die dermkanaal gewas (Isaäcson, 1977). Tog bestaan daar minstens by varke 'n gasheerfaktor wat bepaal of 'n K88 antigeen kan aanheg of nie (Rutter *et al.*, 1975; Sellwood *et al.*, 1975; en sien 1.8).

Getuienis begin verskyn wat dui op 'n soortgelyke rol vir kolonisasie en aanhegting van menslike enteropatogene *E. coli* stamme. Evans *et al.* (1975) het 'n menslike Tox^+ *E. coli* stam beskryf wat die dermkanaal van suigelingkonyne koloniseer. Enteropatogene serotipes, 026:K60:H11 en 078:H12 van *E. coli* heg ook spesifiek aan menslike fetusdermselle vas maar nie aan dermselle van varke, kalwers, konyne en marmotte nie (McNeish *et al.*, 1975). Hierdie spesifieke aanhegtingsvermoë by serotipe 026:K60:H11 kan deur middel van 'n 50-60 x 10⁶ dalton konjugeerbare plasmied na nie-patogene *E. coli* stamme oorgedra word (Williams *et al.*, 1977). Bogenoemde ondersoeke impliseer egter steeds die besit van die primêre enteropatogene vermoëns van enterotoksien=produksie of indringing.

'n Derde moontlikheid bestaan. Volgens Cantey en Blake (1977) kon geen enterotoksienproduksie of invallende vermoëns by serotipe 015 van *E. coli* gedemonstreer word nie. Tog kan klein dosise van dié organisme (1,5 x 10² selle) die konyndermkanaal koloniseer en by 48 uit 62 diere diarree induseer. Die blote vermoë tot kolonisering en aanhegting blyk dus in sigself 'n derde meganisme vir diarree-induksie daar te stel. Laasgenoemde bevindinge bied dus 'n moontlike verklaring vir die entero=

patogeniteit van die betrokke serotipes van *E. coli* wat tydens die onderhawige ondersoek geïsoleer is. Tot dusver onbekende faktore mag ook aan klassieke serotipes van *E. coli* eiesoortige enteropatogene vermoëns verleen. Laasgenoemde bevindinge impliseer nietemin dat serotipering sy regmatige plek in die diagnostiese laboratorium behou.

2.13 Rotavirus

Ondersoeke met betrekking tot die etiologiese rol van rotavirus in gastroënteritis van mense en diere is reeds bespreek (sien 1.9). Die voorkomssyfer van rotavirus betrokkenheid by gastroënteritis van suigelingte varieer aansienlik van 16% in Argentinië (Lombardi, Roseto, Stamboulian en Oro, 1975) tot so hoog as 90% in Japan (Konno, Suzuki en Ishida, 1975). Die mees algemene voorkomssyfer is ongeveer 50% (Davidson *et al.*, 1975; Flewett *et al.*, 1975). Die voorkomssyfer (43,6%) van rotavirus in die huidige ondersoek vergelyk goed met laasgenoemde (tabel 2-9). Baie min verslae oor rotavirus uit ontwikkelende lande is nog gepubliseer. Een so 'n studie, waarby enterotoksigene bakterieë ook in aanmerking geneem is, rapporteer 'n voorkomssyfer van ongeassosieerde rotavirus by 55% van kinders onder 2 jaar oud in Bangladesh (Ryder *et al.*, 1976). Dit is in teenstelling met die ongeassosieerde syfer van 10,3% uit die huidige studie (tabel 2-17). In ondersoeke uit Afrika rapporteer Cruickshank *et al.* (1975) die teenwoordigheid van rotavirus by 44% van hulle Swart Rhodesiese pasiënte. In baie gevalle was die virus egter met patogene bakterieë geassosieer. Schoub *et al.* (1975) kon rotavirus met behulp van elektronmikroskopie by 16% van Swart pasiënte onder 2 jaar oud aantoon. Ewe-eens is 'n voorkoms van 14,4% meer onlangs met behulp van elektronmikroskopie ook in Suid-Afrika aangetoon (Freiman *et al.*, 1977).

Die hoë positiewe syfer wat met behulp van die omgekeerde komplement-bindingsproef verkry is, is in teenstelling met die lae syfer (6% van 37 pasiënte) verkry deur elektronmikroskopie. Hierdie resultaat was onverwags. 'n Ondersoek na die verband tussen die stadium van die

siekte waarop monsters geneem is en die lae bepaalbaarheid van rotavirus met behulp van die elektronmikroskoop kon heelwat lig op die probleem werp (Schoub *et al.*, 1976c). Dit is bekend dat virusuitskeiding in die stoelgang 'n maksimum bereik 2-3 dae na die aanvang van simptome en daarna vinnig daal (Davidson *et al.*, 1975). Terselfdertyd word ongeveer 1×10^6 virusdeeltjies per ml benodig voordat dit met die elektronmikroskoop waargeneem kan word (Davidson *et al.*, 1975; Torres-Medina, Wyatt, Mebus, Underdahl en Kapikian, 1976a en b). Suksesvolle elektronmikroskopiese diagnose van rotavirus vereis dus monsters uit die vroeë fase van die siekte.

'n Indeling van die pasiënte in twee groepe, op grond van die duur van die siekte voor toelating tot die hospitaal, in A(1-3dae) en B(4-8dae), was insiggewend. Op grond van die omgekeerde komplementbindingsproef kom dit vreemd voor dat groep B met die langste duur 'n hoër positiwiteitssyfer (65%) as groep A(35%) vertoon het (Schoub *et al.*, 1976c). Daar is dus geoordeel dat die moeders die siekteduur foutief gerapporteer het en gevolglik op 'n betreklik laat stadium in die siekteduur aangemeld het. So 'n foutiewe berekening kon maklik deur die moeders gemaak word deur die vroeë gematigde simptome te ignoreer en slegs die tydstop van ernstige diarree in aanmerking te neem. Die gewoonte van Swart pasiënte om by ondervraging antwoorde te verskaf wat die ondervraer die meeste sal bevredig (Spencer en Coster, 1969) mag moontlik ook hier 'n rol gespeel het.

Dit is bevind dat die omgekeerde komplementbindingstegniek bevredigende resultate onder die omstandighede van hierdie studie gelewer het. Alhoewel verskeie outers (Middelton, Petric, Hewitt, Szymanski en Tam, 1976; Tufvesson en Johnsson, 1976) in hulle werk gevind het dat die meeste stoelgange antikomplementêr gereageer het, is dit slegs by twee van die 39 pasiënte en by 3 van die 18 kontrolemonsters waargeneem.

2.14 Gevolgtrekkings

Uit die voorafgaande ondersoek is dit duidelik dat, afgesien van die klassieke enteropatogene organismes (*Salmonella* en *Shigella* spesies en seropositiewe *E. coli*), dominerende nuwe groepe enteropatogene organismes by gastroënteritis van suigeling betrokke is. In hierdie verband moet veral die Tox⁺ *Enterobacteriaceae* en rotavirus uitgesonder word (sien tabel 2-19). Ongeassosieerde lede van hierdie twee groepe kon by 31% van die pasiënte gekrimineer word (tabel 2-18). Terselfdertyd kon hierdie organismes nie by die kontrolegroep gevind word nie.

Behalwe die etiologiese implikasies wat uit hierdie ondersoek voortspruit betrek laasgenoemde bevindinge die diagnostiese laboratorium tot 'n hoë mate. Die identifikasie van klassieke enteropatogene organismes sowel as lede van die heterogene groep ander organismes (sien tabel 2-9), vereis bekende roetineprosedures. Daarenteen vereis die bepaling van toksienproduksie en rotavirus gespesialiseerde tegnieke. Eenvoudiger metodes vir laasgenoemde bepalings word benodig. Tog sal die roetine-toepassing van bestaande metodes 'n belangrike toevoeging tot ons kennis van die belang van die individuele enteropatogene organismes in die etiologie van gastroënteritis kan lewer.

HOOFSTUK 3

DIE AARD EN MECHANISME VAN DIARREE-INDUKSIE DEUR
ENTEROTOKSIENE VAN VERSKILLENDE GENERA

INLEIDING

3.1 Die werking van choleraeën en *E. coli* LT

Vibrio cholerae induseer akute diarree by mense en diere. Die proteïen enterotoksien wat deur hierdie organisme uitgeskei word stimuleer die membraangebonde adenielsiklase van dermvoeringepiteel (Schafer *et al.*, 1970; Chen *et al.*, 1971; Field, 1971; Kimberg *et al.*, 1971; Sharp en Hynie, 1971). Sodanige stimulering deur choleraeën lei tot 'n verhoging in die konsentrasie van intrasellulêre sikliese adenosien - 3',5'-monofosfaat (cAMP) (Schafer *et al.*, 1970; Vaughan *et al.*, 1970; Zieve *et al.*, 1970; Kimberg *et al.*, 1971). Aktivering van die adenielsiklase - cAMP sisteem van dermepiteel het tot gevolg dat 'n dramatiese en potensieël fatale intraluminaale vloeistofsekresie plaasvind (Schafer *et al.*, 1970; Chen *et al.*, 1971; Sharp en Hynie, 1971). Die cAMP-afhanklike sekresie is die gevolg van 'n verlaagde Na^+ absorpsie en verhoogde transmuraal potensiaalverskil en kortsluitingstroom sowel as netto Cl^- sekresie (Field *et al.*, 1968a en b; Field *et al.*, 1969; Field 1971).

Die labiele toksien van *E. coli* veroorsaak diarree net soos choleraeën deur stimulering van die adenielsiklase-cAMP-sisteem van die dermwandmukosa (Evans *et al.*, 1972). Beide hierdie toksiene stimuleer ook die adenielsiklase-cAMP-sisteem van 'n verskeidenheid vertebrate selle (sien 1.4 en 1.5). Die werking van beide toksiene kan verhoed word deur vooraf inkubering met antiserum teen choleraeën of die nie-toksiese B subeenheid daarvan (Evans *et al.*, 1973a en b). Verdere verwantskappe tussen choleraeën en *E. coli* LT bestaan. Teenliggame teen die een neutraliseer die ander tot 'n mindere of meerdere mate (Evans *et al.*, 1973a en b; Holmgren *et al.*, 1973b;

Donta en Smith, 1974; Guerrant *et al.*, 1974; Gyles 1974a en b; Kwan en Wishnow, 1974; Zenser en Metzger, 1974). Die A₁ peptied van die choleraageenmolekule (sien figuur 1-1) is die aktiewe spesies verantwoordelik vir stimulering van membraangebonde adenielsiklase (Bennett en Cuatrecasas, 1975; Gill en King, 1975; Berkenbile en Delaney, 1976; Holmgren en Lönnroth, 1976; Ohtomo *et al.*, 1976; Van Heyningen, 1976). Die B subeenheid van die molekule is verantwoordelik vir die konsentrering van choleraageen op die seloppervlakte deur spesifieke binding aan 'n membraan reseptorsetel Cuatrecasas *et al.*, 1973a, b, c en d. Die natuurlike reseptorsetel vir die B subeenheid in die dermepiteel is galaktosiel-N-asetielgalaktosaminiel (sialosiel) laktosielseramied (GM₁ gangliosied) (Van Heningen *et al.*, 1971; Cuatrecasas 1973a, b, c en d; Holmgren *et al.*, 1973a; King en Van Heyningen, 1973; Lönnroth en Holmgren, 1973; Holmgren en Lönnroth, 1975; Van Heyningen, S., 1974, 1976; Van Heyningen, W., 1974).

'n Verskeidenheid van diermodelle en weefselkultuurmetodes kan aangewend word om die vermoë tot enterotoksienproduksie by bakterieë aan te dui. Weefselkultuurmetodes waaronder CHO-K1 selle word tans algemeen gebruik. Die morfologiese veranderinge wat CHO-K1 selle op prikkeling van labiele enterotoksiene ondergaan is 'n cAMP-afhanklike reaksie (Puck *et al.*, 1972; Guerrant *et al.*, 1974). Tog kan 'n verskeidenheid ander stowwe waaronder hormone, prostaglandiene, katesjolamiene, fluoriede en benattingsmiddels ook die adenielsiklase-cAMP-sisteem van soogdierselle stimuleer (Vaughn *et al.*, 1970; Kimberg *et al.*, 1971; Sharp en Hynie, 1971; Evans *et al.*, 1972).

3.2 Doelstellings

Die isolering van verskillende genera van LT-produiserende organismes uit akute gevalle van suigelingsgastroënteritis hou belangrike implikasies vanuit 'n terapeutiese oogpunt sowel as vir 'n toekomstige immuniseringstrategie in. Gevolglik is dit belangrik geag om die aard en verwantskap van die verskillende LT-spesies met choleraageen, hoofsaaklik met betrekking tot die meganisme van cAMP-induksie by die soogdiersel, te vergelyk.

WERKWYSE

3.3 Organismes ondersoek

Die organismes wat in die volgende eksperimente ondersoek is word in tabel 3-1 aangedui. Behalwe waar anders vermeld is, word materiaal en formules vir media oplossings en reagense in die aanhangsel aangedui.

3.4 Toksienbereiding

Die basiese voorskrifte vir die bereiding van labiele toksien soos dit onder 2.5.3 beskryf is, is met sekere wysigings as volg uitgevoer :

'n Lusvol inokulum van 'n 18 uur oue BHI-sopkultuur is in 20 ml kasaminosuurgisekstrakmedium (2,0% kasaminosure (Difco), 0,6% gisekstrak (Difco), 0,25% NaCl, 0,87% K_2HPO_4 , 0,25% glukose en 0,1% (v/v) spooroute-oplossing bestaande uit 5% $MgSO_4$, 0,5% $MnCl_2$ en 0,5% $FeCl_3$), in 'n 125 ml Erlenmeyerfles vir 24 uur by $37^{\circ}C$ teen 130 s.p.m. geskud (Evans *et al.*, 1973a en b; Mundel *et al.*, 1976). Toksienpreparate is soos voorheen steriel filtreer, gevriesdroog en binne 3 weke gebruik (Gorbach en Khurana, 1972; Mundell *et al.*, 1976). Wanneer dit benodig is, is toksiene hersaamgestel in gedistilleerde water om die helfte van die oorspronklike volume te lewer. Dit het verdere verdunnings tot volsterkte vergemaklik (sien hieronder).

3.5 Neutralisering van morfologiese veranderinge by CHO-K1 selle

'n Hoogs gesuiwerde preparaat van choleraegeen is geskenk deur dr R A Finkelstein, Department of Microbiology, University of Texas, Dallas, Texas, V.S.A. Antiserum teen choleraegeen is geskenk deur dr C E Miller, Enteric Diseases Program, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, V.S.A.

TABEL 3-1. Organismes onderzoek

Stam	Mikroorganisme	Toksien	Oorsprong
H11R	<i>E. aerogenes</i>	LT	Gastroënteritis
H13B	<i>E. coli</i>	LT	Gastroënteritis
H14A	<i>K. pneumoniae</i>	LT	Gastroënteritis
H16H	<i>E. coli</i>	LT	Gastroënteritis
H18D	<i>E. coli</i>	LT + ST	Gastroënteritis
H20A	<i>E. coli</i>	LT	Gastroënteritis
H22L	<i>E. cloacae</i>	LT	Gastroënteritis
H23M	<i>K. pneumoniae</i>	LT	Gastroënteritis
H24D	<i>E. coli</i>	LT	Gastroënteritis
H26B	<i>E. cloacae</i>	LT	Gastroënteritis
H29P	<i>K. pneumoniae</i>	LT	Gastroënteritis
H330	<i>P. vulgaris</i>	LT	Gastroënteritis
H36A	<i>E. coli</i>	LT + ST	Gastroënteritis
H37T	<i>K. pneumoniae</i>	LT	Gastroënteritis
H38N	<i>K. pneumoniae</i>	LT	Gastroënteritis
H39E	<i>E. coli</i>	LT	Gastroënteritis
B7A	<i>E. coli</i>	LT + ST	Dr B Rowe
H10407	<i>E. coli</i>	LT + ST	Dr B Rowe

Anticholera-geen is in die verhouding van 1:500 in LT-preparate van die organismes in tabel 3-1 verdun. Suiwer cholera-geen is soortgelyk teen 'n finale konsentrasie van 10 en 100 ng ml⁻¹ getoets. Die mengsels is vooraf vir 30 minute by 37°C geïnkubeer voordat daar soos voorheen getoets is vir morfologiese veranderinge by CHO-K1 selle (sien 2.5.4.2). Die ongeneutraliseerde enterotoksiene is terselfdertyd getoets. Geneutraliseerde enterotoksien van *E. coli* (ST + LT) H36A, is ook soos voorheen in suigelingmuise getoets (sien 2.5.4.1).

3.6 Stimulering en neutralisering van verhoogde intrasellulêre cAMP

Enterotoksienproduserende *E. coli* (LT) H16H, *E. coli* (ST + LT) H36A, *P. vulgaris* (LT) H330, *E. cloacae* (LT) H26B en *K. pneumoniae* (LT) H14A is geselekteer om kwantitatief te bepaal tot watter mate hul labiele toksiene die konsentrasie intrasellulêre cAMP van CHO-K1 selle verhoog. Twee bekende ST + LT *E. coli* stamme, B7A en H10407, is as standaard gebruik (sien 2.5.4). Cholera-geen is as 'n verdere standaard ingesluit. Gepaste verdunnings van geneutraliseerde en ongeneutraliseerde enterotoksiene is, soos aangedui onder resultate (3.12) gebruik om met CHO-K1 selle te reageer. Enterotoksiene wat vir 20 minute by 65°C verhit is, is ook so getoets. Die CHO-K1 selle is soos dit onder 3.9 beskryf word behandel. Bepalings van cAMP is uitgevoer volgens die voorskrifte onder 3.10.

3.7 Behandeling van toksienreseptore met B subeenheid

'n Hoogs gesuiwerde preparaat van die B subeenheid van cholera-geen (cholera-geen) is geskenk deur dr R A Finkelstein, Department of Microbiology, University of Texas, Dallas, Texas, V.S.A.

Die natuurlike reseptorsetel vir die B subeenheid van cholera-geen, GM₁ gangliosied, is geblokkeer deur CHO-K1 selle vooraf met 200 ng ml⁻¹ B subeenheid, soos onder 3.9 beskryf, te behandel. Geskikte verdunnings van cholera-geen en LT-preparate, soos aangedui onder resultate, is hierna bygevoeg en vir 24 uur onder 6% CO₂ geïnkubeer, waarna die konsentrasie intrasellulêre cAMP soos dit onder 3.10 beskryf word, bepaal is. Met die uitsondering van *E. coli* H36A en B7A is enterotok=

siene van die organismes wat onder 3.6 genoem is en cholera gene vir hierdie eksperimente gebruik.

3.8 Behandeling van enterotoksiene met GM₁ gangliosied

'n Gesuiwerde preparaat van gangliosied, wat uit 70% GM₁ gangliosied en 30% sialiensuur bestaan, is geskenk deur dr W E van Heyningen, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, Engeland.

Inaktivering van die enterotoksiene genoem onder 3.7 is bepaal deur geskikte verdunnings daarvan, elk met 100 ng ml⁻¹ GM₁ gangliosied, vir 30 minute by 37°C te inkubeer. Hierna is die mengsel met CHO-K1 selle gereageer soos dit onder 3.9 beskryf word. Die bepaling van intrasellulêre cAMP is volgens die voorskrifte onder 3.10 uitgevoer.

3.9 CHO-K1 selkweeking en behandeling

CHO-K1 selle is gebruik volgens Guerrant *et al.* (1974). Vir die bepaling van intrasellulêre cAMP is CHO-K1 selle in F10 medium (Gibco) aangevul met 10% FKS (Gibco) onder 10% CO₂ by 37°C instand gehou. Tripsinering van selle en die bepaling van selkonsentrasies is uitgevoer soos beskryf onder 2.5.4.2. Plastiekpetribakkies (Falcon) van 6 cm deursnit is gebruik om 1x10⁶ tot 1,5x10⁶ CHO-K1 selle in 2 ml F10+10% FKS vir 8-12 ure voort te kweek totdat vashegting bewerkstellig is. Die medium is hierna afgesuig en die monolaag twee maal met 2 ml hoeveelhede F10 medium, sonder FKS, gewas. Twee ml F10 met 1% FKS en 0,05 mM 1-metiel-3-isobutiëlantien (F10+1% FKS-T) is by die selle gevoeg en toegelaat om vir 30 minute by 37°C te inkubeer. Geskikte verdunnings van enterotoksiene soos aangedui onder resultate, is by die CHO-K1 selle gevoeg waarna dit verder vir 24 uur onder 6% CO₂ by 37°C geïnkubeer is.

In die geval van die versperring van reseptorsetels deur die B subeenheid is die CHO-K1 selle as volg behandel: Die selle is soos hierbo (3.9) berei. Nadat dit met F10 medium gewas is, is 2 ml F10+1% FKS-T wat 200 ng ml⁻¹ B subeenheid bevat bygevoeg en die mengsel vir 30 minute by 37°C geïnkubeer. Geskikte verdunnings van LT-preparate en van cholerageen is dan bygevoeg, gevolg deur 'n inkubasieperiode van 24 uur by 37°C onder 6% CO₂.

Enterotoksiene met 100 ng ml⁻¹ GM₁ gangliosied is by CHO-K1 selle met 2 ml F10+1% FKS-T gevoeg om finale toksienkonsentrasies, soos onder resultate aangedui, te gee. Hierdie mengsel is verder vir 24 uur by 37°C onder 6% CO₂ geïnkubeer.

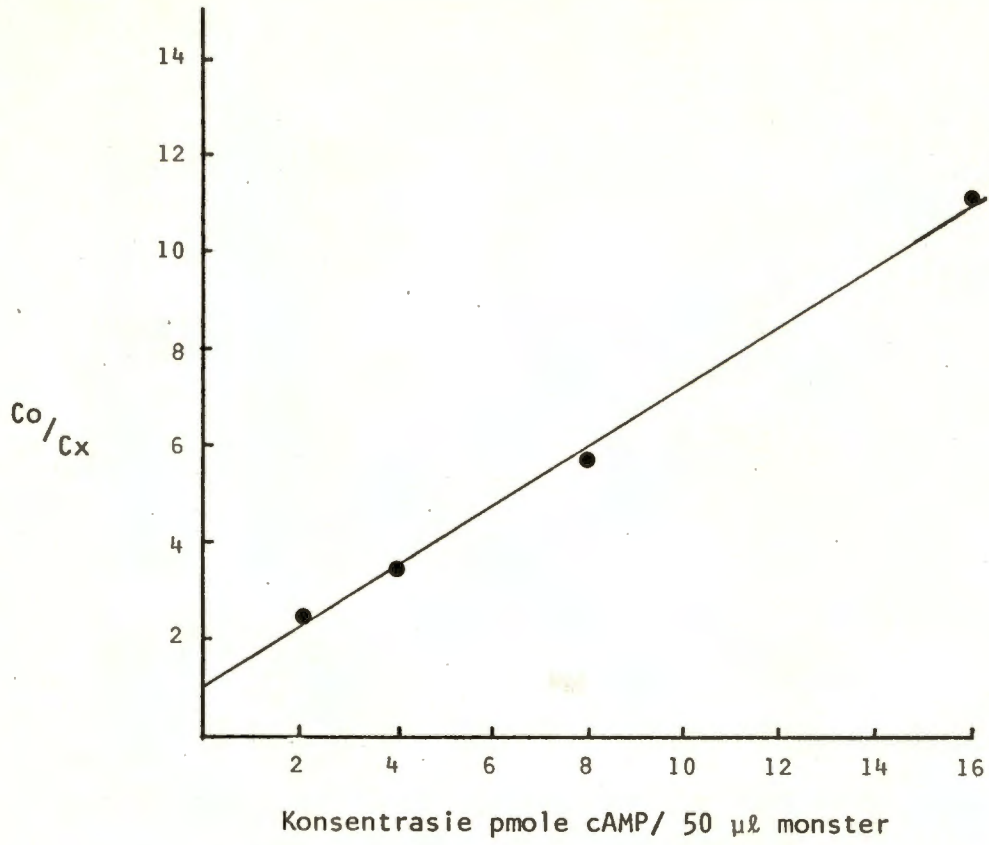
3.10 Die bepaling van intrasellulêre cAMP

Die konsentrasie intrasellulêre cAMP is bepaal volgens die kompeterende Proteïenbindingsmetode van Gilman (1970) soos gewysig deur Gilman en Murad (1974). Inkubasie van die toksienbehandelde selle is gestop deur aspirasie van die medium. Ekstraksie van cAMP is bewerk deur 1 ml yskoue 5% trichloroasynsuur by die selle te voeg en vir 10-15 minute te ekstraheer. Die weefselekstrak is deur aspirasie van die gepresipiiteerde proteïen geskei en met 0,1 ml 1N HCl aangesuur. Trichloroasynsuur kon uit die weefselekstrak verwyder word deur 6 keer met 3 volumes waterversadigde diëtieleter te ekstraheer. Residuele eter is verwyder deur die weefselekstrak vir 2-5 minute by 80-90°C in 'n waterbad te verhit. Weefselekstrak, bevattende die cAMP, is hierna gevriesdroog en heraan gestel in 50mM natriumasetaat (pH 4,5) wanneer dit benodig is vir cAMP-bepaling. Bogenoemde ekstraksieprosedures kan uitgevoer word met feitlik geen verlies aan cAMP nie (Gilman en Murad, 1974).

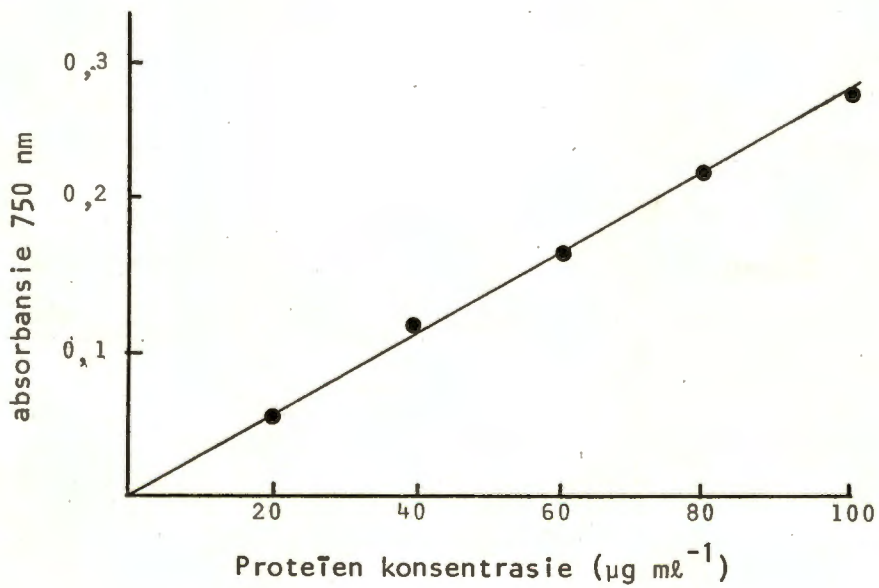
Die radioïmmunbepaling van cAMP berus op die kompeterende binding tussen ongemerkte cAMP en 'n bepaalde hoeveelheid [³H]-cAMP aan 'n bindingsproteïen met 'n hoë spesifisiteit en affiniteit vir cAMP. Die hoeveelheid gemerkte proteïen-cAMP-kompleks wat vorm is omgekeerd eweredig aan die hoeveelheid ongemerkte cAMP in die monster. Deur bepaling van die proteïengebonde radio-aktiwiteit kan die ongemerkte cAMP in die monster bereken word. Skeiding van proteïen=

gebonde cAMP van die vry nukleotied kan deur houtskool adsorpsie, gevolg deur sentrifugering, bewerk word. 'n Porsie van die bolig-gendevloeistof word gebruik vir vloeistofsintilasietelling en die konsentrasie van die ongemerkte cAMP word bepaal met behulp van 'n liniêre standaardkromme (sien figuur 3-1).

Alle bepalings is in duplikaat by 0°C oor ys en in 'n koelkamer uitgevoer. Blankotellings is op $150\ \mu\text{l}$ buffer ($0,05\ \text{M}$ Tris en $4\ \text{mM}$ EDTA, pH 7,5) met $50\ \mu\text{l}$ $[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$ (Radiochemical Centre, Amersham, Engeland) bepaal. Die standaardkromme is opgestel deur ongemerkte cAMP dubbelvoudig te verdun om 16, 8, 4, 2 en 1 pmole per essaiëringstuis te gee. By $50\ \mu\text{l}$ van elke cAMP-standaard is $50\ \mu\text{l}$ gemerkte cAMP gevoeg en daarna $100\ \mu\text{l}$ bindingsproteïen, gevolg deur werwelmeng vir 5 sekondes. Na 2 uur inkubering by $0\text{-}2^{\circ}\text{C}$ is $100\ \mu\text{l}$ houtskoolsuspensie bygevoeg, 5 sekondes gewerwelmeng en onmiddellik vir 3 minute teen 3000 o.p.m. gesentrifugeer. Tweehonderd μl monsters van die boliggendevloeistof is by $3,5\ \text{ml}$ sintilasievloeistof gevoeg en vir 10 minute in 'n Beckman vloeistofsintilasieteller getel. Alle gemiddelde tellings is omgerek na tellings per minuut (tpm). Blankotellings is soos hierbo op $150\ \mu\text{l}$ buffer met $50\ \mu\text{l}$ $[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$ bepaal. Binding in die afwesigheid van ongemerkte cAMP is op $50\ \mu\text{l}$ buffer, $50\ \mu\text{l}$ $[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$ en $100\ \mu\text{l}$ bindingsproteïen bepaal. Laasgenoemde tpm minus die blanko tpm gee die tpm in die afwesigheid van ongemerkte cAMP en word uitgedruk as C_0 . Die tpm in die aanwesigheid van die ongemerkte cAMP-standaarde, word verkry deur die blankotellings soos hierbo verkry van die gemiddelde tpm van elke cAMP standaard af te trek en as C_x uit te druk. 'n Liniêre kromme word verkry deur C_0/C_x vir elke standaardkonsentrasie cAMP te bereken en dit op die ordinaat teenoor pmole cAMP op die absis uit te sit. 'n Standaardkromme is opnuut opgestel vir elke nuwe groep bepalings. 'n Tipiese kromme soos in figuur 3-1 is verkry. Duplikaat bepalings van cAMP in die monsters is soos hierbo uitgevoer op $50\ \mu\text{l}$ monsters plus $50\ \mu\text{l}$ $[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$ plus $100\ \mu\text{l}$ bindingsproteïen waarna C_0/C_x bereken is. Die konsentrasie cAMP in pmole/ $50\ \mu\text{l}$ monster kan direk van die kromme met behulp van die C_0/C_x waarde afgelees word of soos in die onderhawige geval, met behulp van 'n Hewlett Packard model 9825A rekenaar bepaal word. Dit is uitgedruk as pmole cAMP mg^{-1} CHO-K1-selproteïen.



Figuur 3-1. cAMP kalibrasiekromme



Figuur 3-2. Proteïen kalibrasiekromme

Trichloorasynsuur gepresipiteerde CHO-K1 selle is in 1 ml 0,1N NaOH vir 2 uur opgelos en die konsentrasie proteïen is bepaal volgens die metode van Lowry, Rosebrough, Farr en Randall (1951). Die volgende reagens is gebruik : A, 2% Na_2CO_3 ; B, 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1% natriumsitraat; C, 50 ml van A gemeng met 1 ml van B; D, Folin-Ciocalteu reagens is in die verhouding van 1:1 in gedistilleerde water verdun om ongeveer 'n 1N oplossing te lewer. Een ml monster is met 5 ml reagens C gemeng en 10 minute gelaat voordat 0,5 ml van reagens D met werwelmeng bygevoeg is. Die absorbansie is na 45 minute spektrofotometries (Cecil Instruments) by 750 nm bepaal. 'n Standaardkromme is vooraf vir elke nuwe stel reagens met behulp van bekende konsentrasies serumproteïen soos hierbo bepaal en dit is gebruik vir die direkte aflees van onbekendes. Tipiese krommes soos in figuur 3-2 is verkry.

RESULTATE

3.11 Neutralisering van cAMP-afhanklike morfologiese veranderinge

Tabel 3-2 illustreer die resultate soos behaal met die morfologiese reaksies van CHO-K1 selle teen die labiele enterotoksiene voor en na neutralisasie met antiserum teen choleraageen. Enterotoksiene is vooraf vir 30 minute by 37°C saam met 'n 1:500 verdunning van antiserum teen choleraageen getnkubeer en daarna getoets vir morfologiese stimulering van CHO-K1 selle. Die ongeneutraliseerde ru-toksiene is terselfdertyd getoets. Elke toksien is soos voorheen in sesvoud getoets. As pösitiwe kontrole is choleraageen teen konsentrasies van 10 ng en 100 ng ml^{-1} getoets.

Die resultate dui duidelik daarop dat die cAMP-afhanklike morfologiese veranderinge deur anticholeraageen geneutraliseer word. Dit is 'n aanduiding van die serologiese verwantskap tussen die labiele toksiene van verskillende genera en choleraatoksien.

TABEL 3-2. Neutralisering van morfologiese veranderinge by CHO-K1 selle

Stam	Mikroörganisme	% Morfologiese reaksie	
		ru-toksien	Geneutraliseer
H11R	<i>E. aerogenes</i>	29	0,5
H13B	<i>E. coli</i>	30	1,0
H14A	<i>K. pneumoniae</i>	38	0,0
H16H	<i>E. coli</i>	45	0,0
H18D	<i>E. coli</i>	48	0,0
H20A	<i>E. coli</i>	32	0,5
H22L	<i>E. cloacae</i>	29	0,5
H23M	<i>K. pneumoniae</i>	35	0,0
H24D	<i>E. coli</i>	27	0,0
H26B	<i>E. cloacae</i>	33	0,0
H29P	<i>K. pneumoniae</i>	31	0,5
H330	<i>P. vulgaris</i>	36	0,0
H36A	<i>E. coli</i>	43	0,0
H37T	<i>K. pneumoniae</i>	23	0,0
H38N	<i>K. pneumoniae</i>	26	0,0
H39E	<i>E. coli</i>	28	0,0
B7A	<i>E. coli</i>	47	0,0
H10407	<i>E. coli</i>	31	0,5
Choleraageen :			
	10 ng mL ⁻¹	44	2,5
	100 ng mL ⁻¹	51	2,0

3.12 Induksie en neutralisering van verhoogde intrasellulêre cAMP

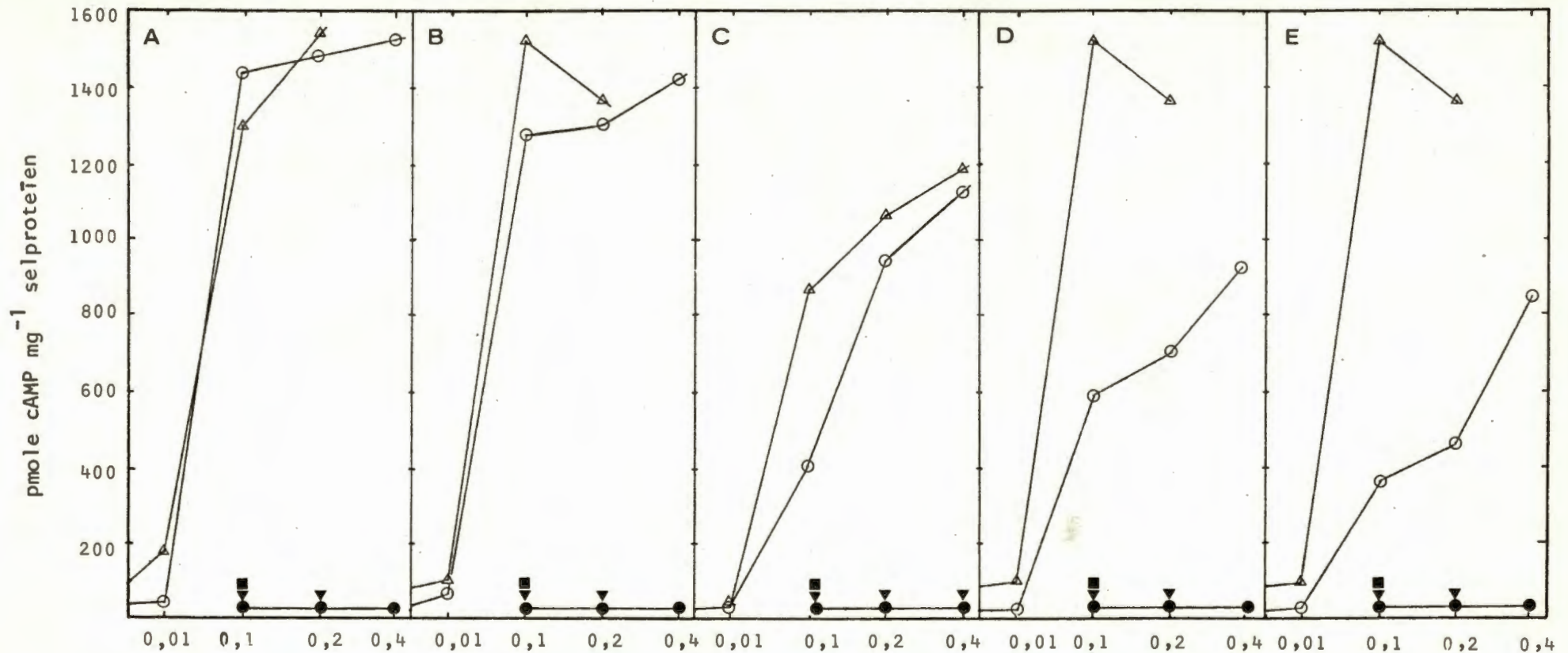
'n Aantal stamme uit verskillende genera is geselekteer om te toets vir hul vermoë om die adenielsiklase-cAMP-sisteem van CHO-K1 selle te stimuleer. Die resultate wat uit hierdie eksperimente verkry is word in figuur 3-3 A-E uiteengesit. Enterotoksiene is verdun en word as 'n fraksie van die finale gekubeerde volume uitgedruk. Die konsentrasies intrasellulêre cAMP word in pmole mg^{-1} selproteïen aangedui. Alle bepalinge van cAMP is na 'n inkubasietyd van 24 uur gedoen. Die punte op elke grafiek verteenwoordig die gemiddelde waarde van 2 tot 4 bepalinge.

Drie interne standaarde is gebruik. Beide *E. coli* H10407 en B7A is goed bestudeerde ST + LT produserende stamme wat uit pasiënte met gastroënteritis geïsoleer is (sien 2.5.4). Cholerageen is tienvoudig verdun en teen finale konsentrasies van 100 ng tot 10^{-2} ng ml^{-1} aangewend.

In alle gevalle is bevind dat die toename van intrasellulêre cAMP dosisafhanklik is (sien figuur 3-3 A-E). Die 0,1 fraksie van enterotoksien is nagenoeg ekwivalent aan die hoeveelheid ru-toksien wat op roetine grondslag vir die morfologiese toets met CHO-K1 selle gebruik word (Guerrant *et al.*, 1974). 'n Vergelyking van die verskillende enterotoksiene op hierdie grondslag is dus geregverdig. Vergeleke met die standaardstamme en cholerageen stimuleer die labiele toksiene uit hierdie studie hoëvlak maar onderling varierende konsentrasies van cAMP in terme van pmole mg^{-1} selproteïen as volg :

10 ng ml^{-1} cholerageen, 1290; *E. coli* (ST + LT) B7A, 1510;
E. coli (ST + LT) H10407, 860; *E. coli* (ST + LT) H36A, 1440;
E. coli (LT) H16H, 1265; *K. pneumoniae* (LT) H14A, 360;
E. cloacae (LT) H26B, 580 en *P. vulgaris* (LT) H330, 400.

Neutralisering van optimum konsentrasies enterotoksiene met anticholerageen verhoed die induksie van verhoogde cAMP en bevestig 'n verwantskap met die werking van cholerageen (sien figuur 3-3, A-E). Toksiene verhit tot 65°C vir 20 minute verloor die vermoë om cAMP te verhoog en bevestig die labiele aard daarvan (sien figuur 3-3, A-E).



Labele toksiene as 'n fraksie van die finale volume. Choleraageen, $100-1 \text{ ng ml}^{-1}$.

Figuur 3-3. Induksie en neutralisasie van intrasellulêre cAMP :

- A, *E. coli* (ST + LT) H36A ○-○, geneutraliseer ●-●, verhit ■; choleraageen △-△, geneutraliseer ▲-▲.
 B, *E. coli* (LT) H16H ○-○, geneutraliseer ●-●, verhit ■; *E. coli* B7A △-△, geneutraliseer ▲-▲.
 C, *P. vulgaris* (LT) H330 ○-○, geneutraliseer ●-●, verhit ■; *E. coli* H10407 △-△, geneutraliseer ▲-▲.
 D, *E. cloacae* (LT) H26B ○-○, geneutraliseer ●-●, verhit ■; *E. coli* B7A △-△, geneutraliseer ▲-▲.
 E, *K. pneumoniae* (LT) H14A ○-○, geneutraliseer ●-●, verhit ■; *E. coli* B7A △-△, geneutraliseer ▲-▲.

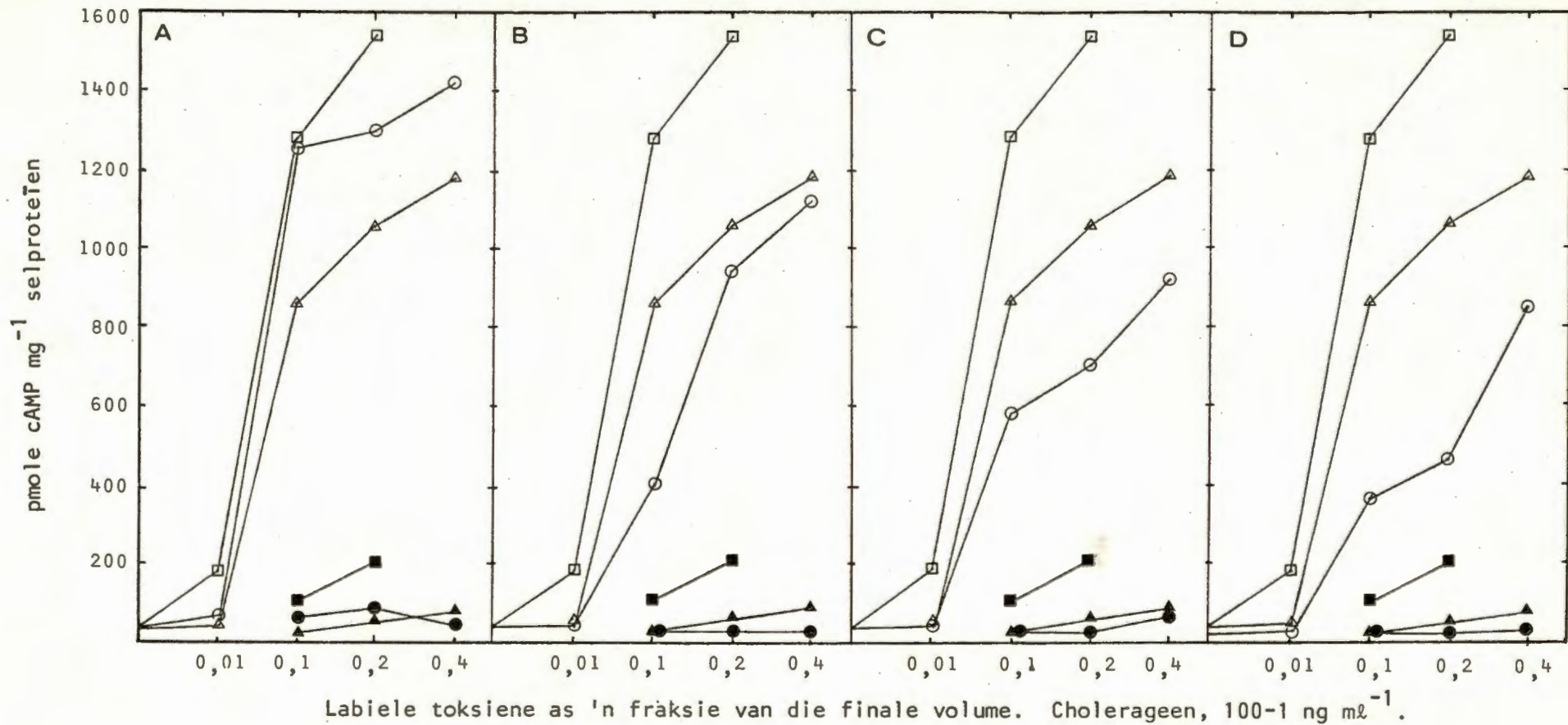
E. coli H36A, 'n produseerder van ST en LT verloor nie die vermoë om vloeistofakkumulاسie in die suigelingmuis na neutralisasie met anticholeraegeen, te verwek nie. 'n Aanduiding dus dat ST nie serologies verwant is aan choleraegeen nie.

3.13 Inhibering van verhoogde cAMP deur B subeenheid

Volgens figuur 3-4, A-D, het voorafbehandeling van CHO-K1 selle met 200 ng ml^{-1} B subeenheid, 'n drastiese inhiberende effek op die induksie van cAMP deur enterotoksiene. Die spesifieke binding van die B subeenheid aan choleraeenseleptore laat geen vry setels vir binding van die holotoksiene wanneer dit agterna bygevoeg word nie (Cuatrecasas, 1973a-d). Die bevindinge volgens figuur 3-4, A-D, impliseer dus dat die enterotoksiene van die verskillende genera wat in hierdie eksperimente gebruik is, 'n identiese reseptorsetel op soogdierseloppervlaktes met choleraegeen deel. Dit dui op 'n meganisme van cAMP induksie soortgelyk aan choleraegeen.

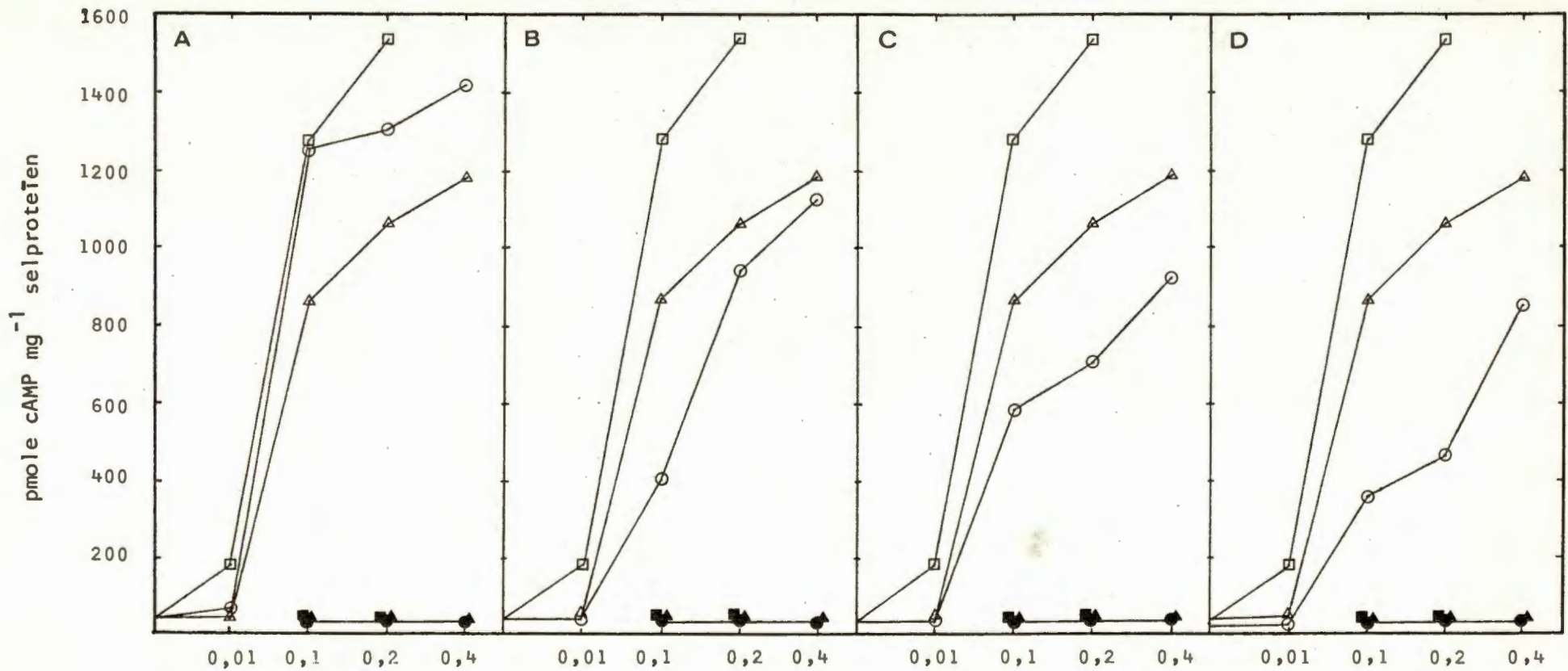
3.14 Inaktivering van enterotoksiene deur GM_1 gangliosied

Volgens figuur 3-5, A-D, word die werking van die verskillende enterotoksiene geheel en al geïnaktiveer deur voorafbehandeling met 100 ng ml^{-1} GM_1 gangliosied. Hierdie bevinding bevestig dat GM_1 gangliosied die reseptor vir die verskillende enterotoksiene is (Van Heyningen *et al.*, 1971; Van Heyningen, S., 1974, 1976; Van Heyningen, W., 1974). Dit dien ook as verdere bevestiging vir 'n meganisme van induksie van cAMP soortgelyk aan choleraegeen. In die lig van hierdie en bogenoemde bevindinge kan 'n meganisme van diarree-induksie, wat soortgelyk of identies aan die van choleraegeen is, vir enterotoksiene van die onderhawige genera gepostuleer word. Dit konstateer nuwe bevindinge.



Figuur 3-4. Inhibering van cAMP induksie deur reseptor versperring met B subeenheid (200 ng ml⁻¹) :

- A, *E. coli* (LT) H16H ○-○, versper ●-●; *E. coli* H10407 △-△, versper ▲-▲; choleraagen □-□, versper ■-■.
 B, *P. vulgaris* (LT) H330 ○-○, versper ●-●; *E. coli* H10407 △-△, versper ▲-▲; choleraagen □-□, versper ■-■.
 C, *E. cloacae* (LT) H26B ○-○, versper ●-●; *E. coli* H10407 △-△, versper ▲-▲; choleraagen □-□, versper ■-■.
 D, *K. pneumoniae* (LT) H14A ○-○, versper ●-●; *E. coli* H10407 △-△, versper ▲-▲; choleraagen □-□, versper ■-■.



Labele toksiene as 'n fraksie van die finale volume. Choleraheen, 100-1 ng ml⁻¹.

Figuur 3-5. Inhibering van c AMP induksie deur toksien inaktivering met GM₁ gangliosied (100 ng ml⁻¹) :

- A, *E. coli* (LT) H16H ○-○, met GM₁ ●-●; *E. coli* H10407 △-△, met GM₁ ▲-▲; choleraheen □-□, met GM₁ ■-■.
 B, *P. vulgaris* (LT) H330 ○-○, met GM₁ ●-●; *E. coli* H10407 △-△, met GM₁ ▲-▲; choleraheen □-□, met GM₁ ■-■.
 C, *E. cloacae* (LT) H26B ○-○, met GM₁ ●-●; *E. coli* H10407 △-△, met GM₁ ▲-▲; choleraheen □-□, met GM₁ ■-■.
 D, *K. pneumoniae* (LT) H14A ○-○, met GM₁ ●-●; *E. coli* H10407 △-△, met GM₁ ▲-▲; choleraheen □-□, met GM₁ ■-■.

BESPREKING

3.15 Die cholera-geenagtige aard van enterotoksiene van verskillende genera

CHO-K1 selle word wyd gebruik vir die demonstrasie van *E. coli* LT en cholera-geen (Guerrant *et al.*, 1974, 1975; Finkelstein *et al.*, 1976). Die eienskap van CHO selle om veranderinge in morfologie, kollageensintese, polimerisasie van mikrotubules, kontakinhibisie en agglutineerbaarheid te ondergaan is afhanklik van verhoogde cAMP-konsentrasies (Hsie *et al.*, 1971; Hsie en Puck, 1971; Puck *et al.*, 1972; Guerrant *et al.*, 1974). Beide die morfologiese veranderinge van CHO-K1 selle sowel as 'n toename in intrasellulêre cAMP kon voorkom word deur vooraf neutralisering van enterotoksiene van verskillende genera met antiserum teen cholera-geen. Die labiele aard van hierdie toksiene kon ook deur hitte-inaktivering bewerkstellig word (sien 3.11 en 3.12).

Die bevindinge uit die voorafgaande eksperimente dui gevolglik daarop dat die LT-produiserende isolate van verskillende genera cholera-geenagtige labiele toksiene produseer. Dit skakel die moontlikheid van vals positiewe reaksies as gevolg van stimulering van adenielsiklase deur ander stowwe uit (Kimberg *et al.*, 1971; Sharp en Hynie 1971; Zieve *et al.*, 1971).

Sack en Froehlich (1977) het bevind dat LT soos geproduseer deur 'n geografies en klinies heterogene groep *E. coli* stamme, immunologies verwant is. Sommige van hierdie stamme was slegs LT produseerders en enterotoksiene van almal word teen hoë titer deur beide antisera teen cholera-geen en *E. coli* LT geneutraliseer. Soortgelyke resultate is dan ook in die huidige studie met *E. coli* sowel as *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* en *Enterobacter aerogenes* behaal (Greeff, 1978a; en sien 3.11 en 3.12). Die cholera-geenagtige aard van hierdie enterotoksiene skep gevolglik die vermoede dat die werking daarvan analoog aan die van cholera-geen is (sien 3.17).

3.16 Die aktiwiteit van enterotoksiene van verskillende genera

Oor die algemeen is diarree wat deur *E. coli* veroorsaak word heelwat matiger as in die geval van *V. cholerae* (Finkelstein *et al.*, 1976). Dit is nietemin duidelik dat die labiele toksiene van die verskillende genera uit die huidige studie in die meeste gevalle hoëvlak stimulering van CHO-K1 selle veroorsaak. Cholerageen sowel as twee goed bestudeerde enterotoksigene *E. coli* stamme, B7A en H10407, kon as interne standaarde dien. Die meeste stamme uit hierdie ondersoek is dan ook instaat om enterotoksiene van 'n vergelykbare sterkte te produseer. Nietemin is daar opmerklike verskille in dié verband tussen die verskillende labiele toksiene. Hierdie verskille mag belangrike kliniese implikasies inhou.

Dit wil voorkom of gastroënteritis wat met enterotoksigene bakterieë geassosieer word varieer met betrekking tot die graad van ernstigheid (Du Pont *et al.*, 1971; Sack *et al.*, 1971; Guerrant *et al.*, 1975; Finkelstein *et al.*, 1976; Echeverria, Louria, Smith en Smith, 1977). Volgens Echeverria *et al.* (1977) mag daar geografiese verskille in dié verband bestaan.

Echeverria *et al.* (1977) voer aan dat verskille in die graad van ernstigheid van die siekte te wyte is aan verskille in die vermoë van verskillende *E. coli* labiele toksiene om verhoogde cAMP te bewerk. In terme van pmole cAMP mg⁻¹ proteïen is die enterotoksienaktiwiteit van isolate uit Calcutta en Viet Nam 15,2 tot 27,3 keer meer aktief as nie-enterotoksigene kontroles. Isolate uit die V.S.A. vertoon 2,8 tot 24,2 keer meer aktiwiteit vergeleke met kontroles. Alhoewel laasgenoemde outeurs se metodes verskil van die onderhawige, rapporteer hulle konsentrasies cAMP wat wissel vanaf 110 tot 4,040 pmole cAMP mg⁻¹ selproteïen vir verskillende enterotoksigene *E. coli* stamme uit akute gevalle van gastroënteritis. Geen gegewens in hierdie verband kon vir ander *Enterobacteriaceae* gevind word nie. Uit die onderhawige ondersoek blyk dit dat die pmole cAMP mg⁻¹ selproteïen, vir die verskillende genera, tussen 360 en 1440 wissel (sien 3.12).

Variasie in die aktiwiteite van verskillende LT-spesies van *E. coli* kan aan verskeie faktore gewyt word. Verskillende *E. coli* LT-spesies varieer met betrekking tot molekulêre grootte, elektroforetiese beweeglikheid en immunologiese reaktiwiteit (Evans, Evans, Richardson en Gorbach, 1976; Finkelstein *et al.*, 1976). Hierdie verskillende LT-produkte is egter almal neutraliseerbaar deur antisera teen choleraegeen of die B subeenheid daarvan (Finkelstein, 1976).

Verskille in die hoeveelheid enterotoksienopbrengs sowel as in die molekulêre spesies kan deur die groeimedium sowel as die groeikondisies in die hand gewerk word (Evans *et al.*, 1973a en b; Finkelstein *et al.*, 1976; Gianella, 1976; Mundell *et al.*, 1976; Alderete en Robertson, 1977a en b).

Sover dit die beheermeganismes van enterotoksiensintese aangaan is bitter min bekend. Die sintese van LT by *E. coli* word waarskynlik in perk gehou deur sellulêre faktore wat met vroeë fases van proteïensintese in verband staan (Levner, Wiener en Rubin, 1977). Linkomisien, 'n inhibeerder van proteïensintese (Chang, Sih en Weisblum, 1966), onthef die natuurlike remmende werking van tot nog toe onbekende faktore op die sintese van enterotoksien. By *E. coli* mag dit 'n 3 tot 25 voudige toename in LT produksie induseer en by *V. cholerae* (Inaba 659B) kan dit so hoog as 60 voudig wees (Levner *et al.*, 1977). 'n Moontlike aan- en afskakeling van enterotoksiensintese in die gasheer kan dus nie uit die oog verloor word nie.

Enkele studies dui daarop dat gasheerfaktore wel 'n rol in die enteropatogenese van hierdie organismes speel. Anders as choleraegeen, maar wel soortgelyk aan die tipe E toksien van *C. botulinum*, word *E. coli* LT deur proteolitiese gasheerensieme in die dermkanaal geaktiveer tot volle uiting van enteropatogeniteit (Rappaport, Sagin, Pierzchala, Bonde, Rubin en Tint, 1976). Na tripsienbehandeling van LT vertoon dit 'n 4 tot 10 voudige toename in aktiwiteit soos gemeet aan die konyn-veltoets en hormoonuitskeiding van rotpituitêre selle respektiewelik.

Ander aspekte, soos die vermoë van die organisme om aan te heg en die proksimale dunderm te koloniseer, is reeds in vorige hoofstukke bespreek. Die belangrike rol van genetiese vatbaarheid van die gasheer vir kolonisering by varke mag ook by die mens van belang wees.

In die lig van bogenoemde aspekte is die eienaardige hiperreaksie van 'n volwasse pasiënte wat deur Finkelstein *et al.* (1976) beskryf word van belang. Sy was die enigste van 'n hele aantal individue op 'n skip wat gedurende 'n diarree epidemie met kliniese simptome soos dié van cholera gaeageer het. Sestig liter stoelgang is binne 4 dae gepasseer. Tog is die LT-produserende *E. coli* stam wat by haar geïsoleer is nie 'n buitengewone toksienproduseerder soos *V. cholerae* 569B nie. (Finkelstein *et al.*, 1976).

3.17 Die meganisme van diarree-induksie deur enterotoksiene van verskillende genera

Feitlik alle ondersoeke na die meganisme waarvolgens choleraegeenagtige enterotoksiene diarree induseer is tot dusver op *V. cholerae* en ST + LT-produserende *E. coli* stamme uitgevoer. Dit is ook duidelik uit laasgenoemde ondersoeke dat diarree-induksie deur hierdie enterotoksiene van verhoogde intrasellulêre cAMP van die dermvoeringepiteel afhanklik is (sien 1.4 en 1.5). Die bevindinge uit die onderhawige ondersoek (sien 3.11 en 3.12) impliseer dus 'n soortgelyke meganisme vir die induksie van diarree by suigeling deur slegs LT-produserende *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* en *P. vulgaris*. Hierdie afleiding word ondersteun deur die feit dat die bindingsetel van die B subeenheid van choleraegeen (sien 1.4.4) deur hierdie enterotoksiene benodig word vir die stimulering van verhoogde cAMP-konsentrasies by CHO-K1 selle (sien 3.13). Verdere bevestiging vir 'n waarskynlike identiese meganisme van diarree-induksie is daarin geleë dat GM₁ gangliosied, die spesifieke bindingsetel van choleraegeen (sien 1.4.4), ook die enterotoksiene van bogenoemde organismes geheel en al inaktiveer (sien 3.14). Die baie klein hoeveelhede B subeenheid (200 ng ml⁻¹) en GM₁ gangliosied (100 ng ml), wat vir die inhibisie van werking van

hierdie enterotoksiene benodig word, is 'n verdere aanduiding van die spesifieke affiniteite wat hier betrokke is.

By *E. coli* (ST + LT) H36A, kan vloeistofakkumulاسie by suigelingmuise, na neutralisering van die enterotoksien met anticholeraegeen, gedemonstreeer word. Hierdie bevinding dui daarop dat ST nie aan choleraegeen verwant is nie. Die meganisme waarvolgens ST diarree induseer verskil waarskynlik ook van dié van choleraegeenagtige enterotoksiene. Onlangse bevindinge deur ander werkers vind aansluiting by bogenoemde.

Volgens Cole, Staley en Whipp, (1977) is daar twee bindingsreseptore vir *E. coli* LT in die dermkanaal. Een hiervan kom ooreen met die membraanbindingsetel vir choleraegeen terwyl die ander met die glikokaliks geassosieer is. Stabiele toksien word egter nie soortgelyk gebind nie en die meganisme vir induksie van vloeistofsekresie bly onbekend.

3.18 Gevolgtrekkings

Die bevindinge uit hierdie ondersoek impliseer dat labiele toksiene van slegs LT-produiserende *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* en *P. vulgaris* choleraegeenagtige eienskappe openbaar. Die verskillende labiele toksiene is instaat om onderling varieerende maar hoëvlak stimulering van intrasellulêre cAMP by CHO-K1 selle te induseer. Hierdie reaksie benodig die spesifieke bindingsetel van choleraegeen. Die meganisme waarvolgens diarree geïnduseer word is dus waarskynlik identies aan dié van cholera toksien.

Minstens twee belangrike implikasies spruit uit die bogenoemde bevindinge voort :

- (i) Choleraegeenagtige enterotoksiene kom by 'n verskeidenheid genera voor. Die diagnostiese laboratorium is dus daarop aangewys om 'n wye spektrum van organismes as potensiële oorsake van gastroënteritis in ag te neem.

- (ii) Die verwantskap tussen cholera-geen en die LT van verskillende genera, en die soortgelyke meganisme van diarree-induksie, impliseer dat gelyksoortige behandeling van pasiënte suksesvolle gevolge mag hê. Meer spesifiek word 'n gekombineerde strategie met betrekking tot toekomstige immunisering van suigelingte teen enterotoksigene infeksies van hierdie aard aangedui.

HOOFSTUK 4

DIE GENETIESE AARD VAN ENTEROTOKSIGENE BAKTERIEË
UIT GASTROËNTERITIS PASIËNTE

INLEIDING

4.1 Plasmiede as bepalers van enteropatogeniteit

Oordraagbare sowel as nie oordraagbare ekstrachromosomale elemente (plasmiede) kom vry algemeen onder die normale ingewandsflora van mense en diere voor. Plasmiede besit 'n wye verskeidenheid bepalers waarvan baie bekend is om addisionele patogene vermoëns aan die organisme te verleen. By enteropatogene *E. coli* stamme is die voorkoms van konjugeerbare plasmiede 2-3 keer hoër as by stamme uit asimptomatiesse gevalle (Gyles *et al.*, 1974). Verder kom sekere klasse plasmiede feitlik uitsluitlik by enteropatogene *E. coli* stamme voor. Hly verleen byvoorbeeld aan die organisme die vermoë om 'n hemolisien te produseer (Smith, 1963; Smith en Halls, 1967c). Die aanhegtingsantigene K88 (Ørskov en Ørskov, 1966) en K99 (Smith en Linggood, 1972) is weer noodsaaklik vir kolonisering van die dermkanaal van varke en kalwers respektiewelik (Jones en Rutter, 1972; Smith en Linggood, 1971, 1972; Isaäcson, 1977). Tesame met die besit van Ent, 'n plasmied wat die sintese van enterotoksiene bepaal (Smith en Halls, 1968; Smith en Linggood, 1971; Skerman *et al.*, 1972; Gyles *et al.*, 1974) ontstaan gedugte entero=patogene organismes.

Die plasmied gemedieerde aard van enterotoksiensintese by *E. coli* afkomstig van diere, is goed gedokumenteer (Smith en Halls, 1968; Smith en Gyles, 1970; Skerman *et al.*, 1972; Gyles *et al.*, 1974; Falkow, Williams, Seaman en Rollins, 1976). Minder is bekend omtrent menslike stamme. Smith en Linggood (1971) kon die konjugeer=baarheid van Ent by 1 uit 27 (3,7%) menslike Tox⁺ stamme aandui.

So kon Skerman *et al.* (1972) ook Ent by *E. coli* H10407, wat tydens 'n gastroënteritis epidemie geïsoleer is, na 'n Tox^- *E. coli* K12 F^- stam oordra. Die hoogste voorkoms van oordraagbare Ent naamlik by 4 uit 24 (17%) *E. coli* stamme, almal afkomstig van pasiënte met diarree, is deur Gyles *et al.* (1974) gerapporteer. Al bogenoemde studies met menslike stamme het slegs die oordraagbaarheid van Ent, wat ST + LT bepaal, aangetoon. 'n Rede vir die afwesigheid van enige noemenswaardige genetiese studies by *E. coli* ST-produseerders is daaraan te wyte dat hul rol by mense eers onlangs omskryf is (Sack *et al.*, 1975; Wachsmuth, Falkow en Ryder (1976). Dieselfde geld vir stamme wat slegs LT produseer (Sack, 1975; Guerrant *et al.*, 1975; Greeff 1977, 1978a en b; Greeff *et al.*, 1977; Schoub *et al.*, 1977). Sover vasgestel kan word is geen genetiese ondersoek in dié verband oor slegs LT-produseerders of ander organismes as *E. coli* gepubliseer nie.

4.2 Doelstellings

Die isolasie van 20 Tox^+ lede van die familie *Enterobacteriaceae*, uit suigeling met gastroënteritis, skep 'n geleentheid om spesifieke genetiese aspekte van hierdie organismes as 'n integrale deel van hierdie ondersoek na te gaan. Die volgende eksperimente stel dit dan ook ten doel om veral die voorkoms van selfoordraagbare Ent plasmiede by hierdie enteropatogene organismes te bepaal. 'n Nadere ondersoek na die teenwoordigheid van ekstrachromosomale elemente by enkele geselekteerde stamme is ook uitgevoer.

WERKWYSE

4.3 Organismes ondersoek

Die 20 Tox^+ organismes wat tydens die huidige ondersoek by suigeling met gastroënteritis geïsoleer is, is vir hul genetiese aard ondersoek (sien tabelle 2-8 en 2-10). Die volgende *E. coli* K12 stamme is ook gebruik :

- (i) *E. coli* J5 F^- *strep-r*. Huisves 'n nie-selfoordraagbare R plasmied, RSF1010, wat bestandheid teen $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomisien verleen (S.Falkow, persoonlike mededeling).
- (ii) *E. coli* W1485-1 F^- *thy^-*. Dit is chromosomaal bestand teen $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ nalidiksiksuur (S. Falkow, persoonlike mededeling).
- (iii) *E. coli* J62/N F^- *lac^- pro his trp*. Dit is chromosomaal bestand teen $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ nalidiksiksuur.

Eersgenoemde twee organismes is geskenk deur dr S Falkow, University of Washington, Seattle, V.S.A. Laasgenoemde organisme is geskenk deur prof J N Coetzee, Departement Mikrobiologie, Universiteit van Pretoria.

Behalwe waar anders vermeld word is alle inkubasies in 'n droëlug broeikas by 37°C uitgevoer. Formules vir media, oplossings en reagense verskyn in die aanhangsel behalwe waar anders aangedui.

4.4 Konjugasietegnieke

'n Enkelstap konjugasietegniek, volgens Smith en Linggood (1971), is aanvanklik gebruik om die oordrag van Ent na *E. coli* K12 stamme W1485-1 en J62 te bewerkstellig. Skenker en ontvanger organismes is vir 18 uur afsonderlik in 10 ml Oxoid Nutrient Broth No2 (NB2-sop) gekweek. Gelyke volumes ($0,2 \text{ ml}$) van elke kultuur is dan by 10 ml vars NB2-sop gevoeg en vir 24 uur saam geïnkubeer. Die kultuur is hierna met 10 ml vars NB2-sop verdun en vir nog 24 uur geïnkubeer. Vervolgens is dit gesentrifugeer, die sediment in NB2-sop met $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ nalidiksiksuur (N100) hersuspendeer, en vir 24 uur voortgekweek om die skenker te dood. Na sentrifugering is die sediment weer in 10 ml vars NB2-sop (N100) gesuspendeer en vir 18 uur voortgekweek, weer gesentrifugeer en die totale sediment gebruik om enterotoksien volgens 2.5.3 te berei. By skenkers wat beide ST en LT produseer is bogenoemde prosedure in duplikaat gedoen en die finale sedimente elk afsonderlik vir die bereiding van ST en LT gebruik.

'n Tweestap bestandheidsfaktor-mobilisasietoets (BFM-toets), vir die bespeuring van oordragsfaktore by *Enterobacteriaceae*, is deur Anderson en Lewis (1965a en b) en Anderson (1965) ontwikkel. Die BFM-toets is volgens die wysiging van Skerman *et al.* (1972) gebruik om die teenwoordigheid van oordragsfaktore sowel as selfoordraagbare Ent plasmiede aan te dui. Die BFM-toets maak gebruik van 'n tweestap kruising tussen 'n moontlike skenker en 'n intermediêre ontvanger en daarna die toevoeging van 'n finale ontvanger. Afsonderlike 18 uur oue kulture van skenkers en ontvangers is in 10 ml NB2-sop berei. Een ml van 'n 6 uur oue skenkerkultuur in NB2-sop is met 0,5 ml van 'n soortgelyke kultuur van die intermediêre ontvanger, *E. coli* K12 J5, gemeng en vir 2 uur saam gekubeer. Laasgenoemde organisme huisves 'n nie-selfoordraagbare R-plasmied, RSF1010, wat bestandheid teen $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomisien (S50) verleen (S. Falkow, persoonlike mededeling). Hierna is 0,5 ml van die 6 uur oue finale ontvanger, *E. coli* K12 stam W1485-1 of J62, by die mengsel gevoeg en verder vir 18 uur gekubeer. Na gesamentlike kweking word die kultuur gesentrifugeer en die hele sediment op MacConkeyagarplate wat S50 en N100 bevat, uitgestryk met behulp van 'n gebuigde glasstafie. Inkubasie van hierdie plate is vir 'n verdere 24 uur voortgesit. Al die selle is met soutoplossing (0,85%) van die plate afgewas en soos hierbo in NB2-sop met S50 N100 gekweek en behandel. Die sediment is dan gebruik om toksiene te berei. Soms is verdunnings van konjugasie mengsels in plaas van sedimente gebruik (sien 4.4.2). Al die moontlike gepaarde kombinasies in 'n toets is elk telkens op MacConkeyagarplate met S50, N100 en S50 plus N100 uitgestryk om as kontroles te dien. Indien 'n oordragsfaktor of 'n selfoordraagbare Ent plasmied uit die skenker die nie-selfoordraagbare plasmied, RSF 1010 van *E. coli* J5, kan mobiliseer verwerf dit bestandheid teen streptomisien. Die verskyning van streptomisienbestandheid by die finale ontvanger stel sulke transkonjugante in staat om op S50 N100 te oorleef. Dit is 'n aanduiding van die teenwoordigheid van 'n oordragsfaktor en/of onder andere 'n oordraagbare Ent plasmied afkomstig van die skenker (Skerman *et al.*, 1972).

Vir die bepaling van die oordragsfrekwensie van R plasmiede en Ent is 'n enkelstap konjugasietegniek volgens Datta, Hedges, Shaw, Sykes en Richmond (1971) en Datta en Hedges (1972) uitgevoer. Agtien uur oue kulture van skenkers en ontvangers is soos hierbof berei. Ontvangers is 1:100 en skenkers 1:10 onderskeidelik in 10 ml NB2-sop verdun. Ontvangers is dan by 37°C vir 6 uur in 'n waterbad geskud en skenkers is vir 4 uur stil geïnkubeer. By 4,5 ml ontvanger is 1 ml skenker en 4,5 ml vars steriele NB2-sop gevoeg en die mengsel is dan vir 2 uur of langer geïnkubeer. Tienvoudige verdunnings hiervan of die gesedimenteerde selle is vir seleksie van transkonjugante gebruik (sien ook 4.4.1). By seleksie vir oordraagbare R plasmiede is die enkel en soms dubbel merkers daarvan sowel as die bestandheidseienskappe van die ontvanger in aanmerking geneem. By Ent is seleksie teen die skenker uitgevoer. Die oordragsfrekwensie word uitgedruk as die aantal transkonjugante per skenkersel onder bogenoemde toestande.

4.4.1 Die bepaling van antibiotiese bestandheid

Die antibiotiese bestandheid van geselekteerde Ent⁺ *E. coli* stamme is met die geïmpregneerde skyfdiffusiemetode soos beskryf deur Frankel *et al.* (1970) met mastringe (Mast Laboratories) op Mueller Hinton medium (Difco) bepaal. Die konjugeerbaarheid van bestandheid=bepalers is soortgelyk bepaal. Die volgende antibiotika is gebruik : chlooramfenikol, 30 µg; tetrasiklien, 30 µg; gentamisien, 10 µg; kanamisien, 30 µg; eritromisien, 15 µg; tobramisien, 10 µg; nitrofurantoen 300 µg; nalidiksiksuur, 30 µg; sulfafurasool, 300 µg; ampisillien, 10 µg; karbenisillien, 100 µg; polimiksien B, 300 eenhede; penisillien G, 10 eenhede en fusidiensuur 10 µg.

4.4.2 Seltellings en verdunnings

Wanneer enkelkolonies of tellings van skenkers, ontvanger- of konjugasie=kulture tydens enige van bogenoemde konjugasie eksperimente benodig is, is tienvoudige verdunnings daarvan in warm (37°C) soutoplossing (0,85%) berei. 'n Inokulum van 0,1 ml van elke verdunning is op geskikte MacConkeyagarplate, met of sonder seleksie na gelang van omstandighede, uitgesprei, geïnkubeer en getel. Tellings is in duplikaat gedoen en as kolonievormende eenhede (KVE) in berekening gebring.

4.4.3 Demonstrasie van Ent by transkonjugante

Transkonjugante is te alle tye bevestig deur vir die ouksotrofe eienskappe van die onderhawige ontvanger te toets. In die geval van plate met enkelkolonies van transkonjugante is daar na minimale agarmedium, sonder die ouksotrofe vereistes van die ontvanger, ge-repliseer. Kolonies wat nie hierop kon groei nie is van die meesterplaat verwyder en vir toksientoetsing gebruik. Wanneer sedimente gebruik is, is 'n lusvol soortgelyk op minimale agarmedium getoets voordat daar vir toksiene getoets is. Transkonjugante is op BHI-agar by 4°C geberg.

Daar bestaan nie 'n seleksiemetode vir Ent nie. Gevolglik moet elke transkonjugant getoets word vir die vermoë om enterotoksien te produseer. Samevoegings van 10 transkonjugante is vir die bereiding van toksiene gebruik. Deur 4 ml BHI-sop te inokuleer met 'n lusvol van elk van 10 afsonderlike 18 uur oue kulture van transkonjugante in 10 ml BHI-sop kon toksiene op die gewone manier berei en getoets word. By toksienpositiewe samevoegings is elke lid daarna afsonderlik ondersoek vir toksienproduksie.

4.5 Isolاسie van plasmied DNA

Geselekteerde Tox^+ *Enterobacteriaceae* en Ent^+ transkonjugante, sowel as *E. coli* K12 stam W1485-1, is vir 18 uur in die minimale medium (M9-medium) van Freifelder en Freifelder (1968) soos gewysig deur Silver en Falkow (1970) geïnkubeer. Dit is dan 1:20 verdun in 30 ml M9-medium, waarby $3,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ [^3H]-timidien en $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ deoksiadeno-sien gevoeg is, en voortgekweek totdat 'n seldigtheid van sowat 10^8 ml^{-1} bereik is. Die selle is vir 15 minute teen $12\,000 \times g$ gesentrifugeer (Sorvall), die sediment drie maal met yskoue soutoplossing (0,85%) gewas en in 1,0 ml koue 25% sukrose-oplossing in 0,05 M tris (hidroksiemetiel) aminometaan (Tris), pH8, gesuspendeer. Alle verdere hanterings van selle is by 0-2°C oor ys of in 'n koelkamer uitgevoer. Sentrifugering is verder in 'n Beckman L2 ultrasentrifuge uitgevoer.

Helder lisate is volgens die metode van Clewell en Helinski (1969) berei. Lisosiem (0,2 ml van 'n 5 mg ml^{-1} oplossing in 0,25M Tris, pH8) is by die sukrose selsuspensie gevoeg en vir 5 minute gelaat waarna 0,4 ml 0,25 M etileendiamientetra-asynsuur (EDTA), pH8, bygevoeg is. Hierdie mengsel is vir 5 minute periodiek liggies geswaai waarna lise van sferoplaste bewerkstellig is deur die toevoeging van 1,6 ml van 'n benattingsmiddelmengsel (1% Brij 58, 0,4% natrium deoksicholaat, 0,0625 M EDTA en 0,05 M Tris, pH8). Na 5-10 minute word die mengsel betreklik helder en klewerig waarna die chromosomale DNA gesedimenteer word deur sentrifugering by $48\ 000\text{g}$ vir 25 minute by 2°C . Hierdie stap sedimenteer 98% van die totale chromosomale DNA terwyl die plasmied DNA in die boliggendevloeistof agterbly (Gyles *et al.*, 1974).

Koue liniêre gradiënte van 15-50% sukrose in 0,01 M EDTA, 0,06 M KCl en 0,02 M Tris by pH 7,3 is vooraf met behulp van 'n gradiëntmaker (LKB) vervaardig. Die boliggendevloeistof van die helder lisate is sonder versteuring bo-op 15-50% sukrose gradiënte geplaas en in 'n SW27 rotor teen $21\ 500\text{g}$ vir 15 uur by 2°C gesentrifugeer. Wanneer ontspanne DNA molekules benodig is, is die helder lisate eers vir 15 minute by 25°C met $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ pronase behandel en dan op 15-20% sukrose gradiënte gesentrifugeer. Agt honderd μl fraksies is van die bodem van die gradiëntbuis, deur 'n 22 dikte naald verbind aan die druppelteller van 'n LKB UltraRac 7000 fraksieversamelaar, opgevang. Vyftig μl monsters van elke fraksie in 3,0 ml triton X-100 sintilasievloeistofmengsel is gebruik vir isotootellings in 'n Packard Tricarb sintilasieteller. Die DNA in saamgevoegde radio-aktiewe fraksies is gedialiseer teen twee 1L veranderinge van $0,1 \times \text{SSC}$ (0,15 M NaCl, 0,015 M natriumsittraat, pH 7,3) oor 72 uur en daarna vir elektronmikroskopie voorberei.

Liniêre gradiënte van 5-20% sukrose in 0,5 M NaCl en 0,01 M kaliumfosfaat by pH 7,0 is vooraf volgens Gyles *et al.* (1974) vervaardig. Die boonste 0,5 ml van gesedimenteerde helder lisate is 1:1 verdun in TES (0,05 M NaCl, 0,005 M EDTA en 0,03 M Tris, pH8). 'n Honderd μl monster hiervan is bo-op 5-20% sukrose gradiënte geplaas en in 'n SW 50.1 rotor teen $114\ 000\text{g}$ vir 60 minute by

20°C gesentrifugeer. Vyfdruppel fraksies is soos hierbo direk in flessies met sintilasievloeistof opgevang en vir isotootellings gebruik.

4.5.1 Elektronmikroskopie van plasmied DNA

Die metode van Davis, Simon en Davidson (1971) is gebruik vir die montering van DNA molekules. 'n Konsentrasie van 300-500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNA in 0,01% sitochroom C, 500 mM ammoniumasetaat en 1 mM EDTA by pH 7,5 is as spreiooplossing aangewend. Kopergaasskyfies (400 maas/25mm²) bedek met 'n Formvarvlies (0,3% g/v in 1:2 dichloroetaan) is binne 5 dae vir DNA montering gebruik. Vyftig μl DNA is teen 'n glasskuinste afgestuur in ammoniumasetaat (250 mM, pH 7,5) met 'n dun gepoeierde talklagie bo-op. 'n Druppel is vinnig naby die glasasetaat intervlak deur aanraking met die gaasskyfie opgetel en vir 30 sekondes gedoop in 'n oplossing met 50 mM uranielasetaat in 50 mM HCl, vars verdun tot 1:100 in absolute etanol. Hierdie stap kleur en droog die monster meteens.

Gemonteerde gaasskyfies is met rotasie beskadwing teen 8° in 'n Edwards E12E vakuumparaat teen 2×10^{-5} torr behandel deur 2 cm lengtes van 40:60 palladium : goud draadjies, gekoppel aan 'n wolfram filament, teen 300 mA te verdamp. Die gemiddelde kontoerlengte in mikrometer van minstens 10 DNA molekules is met 'n faktor van $2,07 \times 10^6$ vermenigvuldig om die molekulêre massa in dalton te verkry (Lang, 1970).

RESULTATE

4.6 Oordragsfaktore en Ent by Tox⁺ *Enterobacteriaceae*

Met die enkelstap konjugasietegniek van Smith en Linggood (1971) kon die oordrag van Ent na Tox⁻ *E. coli* K12 F⁻ ontvangers W1485-1 en J62 slegs by *E. coli* (ST) H2E aangetoon word. Dit kan deels daaraan toegeskryf word dat geen genetiese seleksie vir Ent toegepas kon word nie en deels aan 'n relatief lae oordragsfrekwensie vir

Ent. Gevolglik is besluit om indirek vir oordraagbare Ent plasmiede te selekteer deur van die BFM-toets gebruik te maak. Hiermee is die voorkoms van oordragsfaktore bepaal en 'n mate van indirekte seleksie vir Ent toegepas (Skerman *et al.*, 1972; Gyles *et al.*, 1974).

Die voorkoms van oordragsfaktore en Ent by die 20 Tox⁺ *Enterobacteriaceae*, soos bepaal met die BFM-toets, word in tabel 4-1 saamgevat. Op hierdie wyse kon oordragsfaktore by 11 van die 20 Tox⁺ stamme (55%) aangetoon word. Dit verteenwoordig 10 van die 18 pasiënte (56%) wat Tox⁺ *Enterobacteriaceae* gehuisves het. Oordragsfaktore kon by 7 van 11 (64%) *E. coli* stamme aangetoon word. Beide *E. coli* W1485-1 of *E. coli* J62 is afwisselend as finale ontvanger in hierdie eksperimente gebruik. Die hele konjugasiemengsel is gesentrifugeer en die sediment op MacConkeyagarplate, met seleksie teen die skenker, uitgestryk. Al die wildetipe skenkerorganismes was gevoelig vir 100 µg ml⁻¹ nalidiksiksuur en geen kombinasie van skenkers en ontvangers kon voor konjugasie op MacConkeyagarplate wat 100 µg ml⁻¹ nalidiksiksuur plus 50 µg ml⁻¹ streptomisien bevat het groei nie.

Elke skenker waarby 'n oordragsfaktor aangetoon is, is daarna vir die konjugeerbaarheid van Ent getoets. By hierdie stamme (sien tabel 4-1) is in die meeste gevalle aaneenlopende groei gevind. Die totale groeisel is gebruik om ST en/of LT te berei (sien 4.4).

By *E. coli* stamme H2E (ST), H18D (ST + LT) en H38J (ST), kon die konjugeerbaarheid van Ent op hierdie wyse aangetoon word (sien tabel 4-1).

Bogenoemde eksperimente het die vermoede laat ontstaan dat oordraagbare Ent moontlik ook by die ander stamme met oordragsfaktore teenwoordig was maar teen 'n laer frekwensie oorgedra word. Daarom is die konjugasiemengsel tienvoudig verdun op S50 N100 plate uitgestryk, en al die kolonies, soms uit triplikaat verdunnings, in samevoeging van 10 gebruik om toksiene te berei en te toets. Die 3 *E. coli* stamme waarby die konjugeerbaarheid van Ent reeds aangetoon is, is op dieselfde wyse getoets om die oordragsfrekwensie volgens die

TABEL 4-1. Voorkoms van oordragsfaktore en Ent by Tox⁺ *Enterobacteriaceae**

Pasiënt	Stam Kode	Organisme	Toksiene		Aantal proewe positief			
			ST	LT	Oordragsfaktore		Ent	
					W1485-1	J62	W1485-1	J62
2	H2E	<i>E. coli</i>	+	-	9/10	5/5	9/10	5/5
11	H11R	<i>E. aerogenes</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
12	H12C	<i>E. coli</i>	+	-	7/10	5/5	0/10	0/5
13	H13B	<i>E. coli</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
14	H14A	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	10/10	5/5	0/10	0/5
16	H16H	<i>E. coli</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
18	H18D	<i>E. coli</i>	+	+	10/10	5/5	6/10	4/5
20	H20A	<i>E. coli</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
22	H22L	<i>E. cloacae</i>	-	+	7/10	5/5	0/10	0/5
23	H23M	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
24	H24D	<i>E. coli</i>	-	+	9/10	5/5	0/10	0/5
26	H26B	<i>E. cloacae</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
29	H29P	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
33	H330	<i>P. vulgaris</i>	-	+	3/10	5/5	0/10	0/5
36	H36A	<i>E. coli</i>	+	+	10/10	5/5	0/10	0/5
	H36P	<i>E. coli</i>	+	-	8/10	5/5	0/10	0/5
37	H37T	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5
38	H38J	<i>E. coli</i>	+	-	0/10	2/5	4/10	2/5
	H38N	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	2/10	2/5	0/10	0/5
39	H39E	<i>E. coli</i>	-	+	0/10	0/5	0/10	0/5

* Reflekteer resultate waar slegs die totale groeisel, na konjugasie volgens die BFM-toets, vir Ent getoets is.

BFM-toets te bepaal. Die resultate van hierdie eksperimente verskyn in tabel 4-2. Hiervolgens kon die oordrag van Ent by 4 *E. coli* stamme bevestig word. Die konjugeerbaarheid van Ent by 'n vierde *E. coli* stam, H36A (ST + LT) is besonder belangrik. Hierdie stam behoort tot 'n klassieke enteropatogene serotipe, 0128:K67:H27, van *E. coli*. Die suksesvolle oordrag van Ent in laasgenoemde geval spruit voort uit die feit dat enkelkolonies van transkonjugante in samevoegings van 10, in plaas van totale sedimente, vir toksientoetsing gebruik is. Op hierdie wyse kon 'n hoë oordragsfrekwensie van Ent (73%) by *E. coli* (ST) H2E ook aangetoon word. Bogenoemde resultate dui op 'n besonder hoë voorkomssyfer (36,4%) van konjugeerbare Ent by menslike *E. coli* stamme. Dit verteenwoordig 3 van die 18 (16,7%) pasiënte wat Tox⁺ organismes gehuisves het.

By die twee konjugeerbare ST + LT Ent stamme, H18D en H36A, is die produksie van beide ST en LT by elke transkonjugant aangetoon. Die vermoë om enterotoksiene te produseer is by enkele transkonjugante oor 'n tydperk van 6 maande getoets en dit was stabiel.

Die 4 *E. coli* stamme met oordraagbare Ent, H2E (ST), H18D (ST + LT), H36A (ST + LT) en H38J (ST), is geselekteer vir verdere studie. Twee aspekte was van besondere belang. Dit sou waardevol wees om die oordragsfrekwensie van die ST-produuserende stam, H2E, meer presies met die enkelstap konjugasietegniek van Datta *et al.* (1971) en Datta en Hedges (1972) te bepaal. Tweedens is die moontlikheid van gelyktydige besit van Ent en oordraagbare R faktore by hierdie vier stamme nagegaan.

Die oordragsfrekwensie van Ent van *E. coli* H2E na *E. coli* J62 was $\pm 2,2 \times 10^{-1}$ per skenkersel. Die betreklike gemak waarmee Ent in hierdie enkelstap konjugasie eksperiment na Tox⁻ *E. coli* J62 oorge=dra kan word hou belangrike implikasies vir geen uitruiling in. Ent kan ook met die enkelstap konjugasietegniek, van *E. coli* H2E na *E. coli* W1485-1, oorgedra word. Soortgelyk is Ent uit *E. coli* W1485-1 (ent⁺) na Tox⁻ *E. coli* J62 oorgedra.

TABEL 4-2. Voorkoms en oordragsfrekwensie van Ent volgens die BFM-toets

Oordragsfaktor positiewe stam		Aantal kolonies positief vir Ent				% Ontvangers van Ent	
		W1485-1		J62		Gemiddelde	Beste
		1	2	1	2		
H2E	<i>E. coli</i> (ST)	173/281	86/156	171/210	212/233	73,0	91,0
H12C	<i>E. coli</i> (LT)	0/113	0/198	0/47	0/312	0,0	0,0
H14A	<i>K. pneumoniae</i> (LT)	0/87	0/221	0/103	0/252	0,0	0,0
H18D	<i>E. coli</i> (ST + LT)	1/197	0/255	1/111	7/286	1,0	2,4
H22L	<i>E. cloacae</i> (LT)	0/327	-	0/61	0/250	0,0	0,0
H24D	<i>E. coli</i> (LT)	0/40	-	0/202	0/273	0,0	0,0
H330	<i>P. vulgaris</i> (LT)	0/54	-	0/138	0/410	0,0	0,0
*H36A	<i>E. coli</i> (ST + LT)	0/46	0/295	1/706	0/829	0,7	0,7
H36P	<i>E. coli</i> (ST)	-	-	0/78	2/289	0,6	0,7
H38N	<i>K. pneumoniae</i> (LT)	-	-	0/341	0/279	0,0	0,0
H38J	<i>E. coli</i>	-	-	0/156	0/223	0,0	0,0

* Met J62 as ontvanger is triplikaat verdunnings ondersoek. Die oordragsfrekwensie is volgens resultate by J62 bereken.

Geen R faktor oordrag kon by *E. coli* H2E, H18D of H38J met enige van bogenoemde konjugasietegnieke bewerkstellig word nie. Dit is aanvaar dat Ent by hierdie 3 stamme selfoordraagbaar is.

By *E. coli* H36A kon bestandheid teen sulfafurasool ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$), ampisilien ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), karbenisilien ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) en tetrasiklien ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) gelyktydig na *E. coli* J62 oorgedra word. Die oordragsfrekwensie van hierdie bestandheidbepalers was $\pm 7,3 \times 10^{-2}$ per skenkersel. Uit 540 van hierdie transkonjugante kon Ent by 23 (4,4%) aangetoon word. Die oordragsfrekwensie van Ent was dus $\pm 1,7 \times 10^{-4}$ per skenkersel. Al hierdie Ent⁺ transkonjugante, sowel as die een wat met die BFM-toets geïsoleer is (sien tabel 4-2), vertoon die bestandheidseienskappe van die R faktor. Beide Ent en die bestandheidsbepalers was saam stabiel oor 'n tydperk van minstens 6 maande.

Hierdie bevindings dui daarop dat Ent en die betrokke R faktor waarskynlik saam oorgedra word. Ent is in hierdie geval waarskynlik nie selfoordraagbaar nie maar afhanklik van die R-plasmied daarvoor (Wachsmuth *et al.*, 1976).

4.7 Ekstrachromosomale DNA by Tox⁺ *Enterobacteriaceae*

Enkele Tox⁺ stamme, *E. coli* (ST) H2E, *E. coli* (LT) H16H, *E. coli* (LT) H39E en *E. cloacae* (LT) H26B is geselekteer vir 'n ondersoek na die teenwoordigheid van ekstrachromosomale DNA.

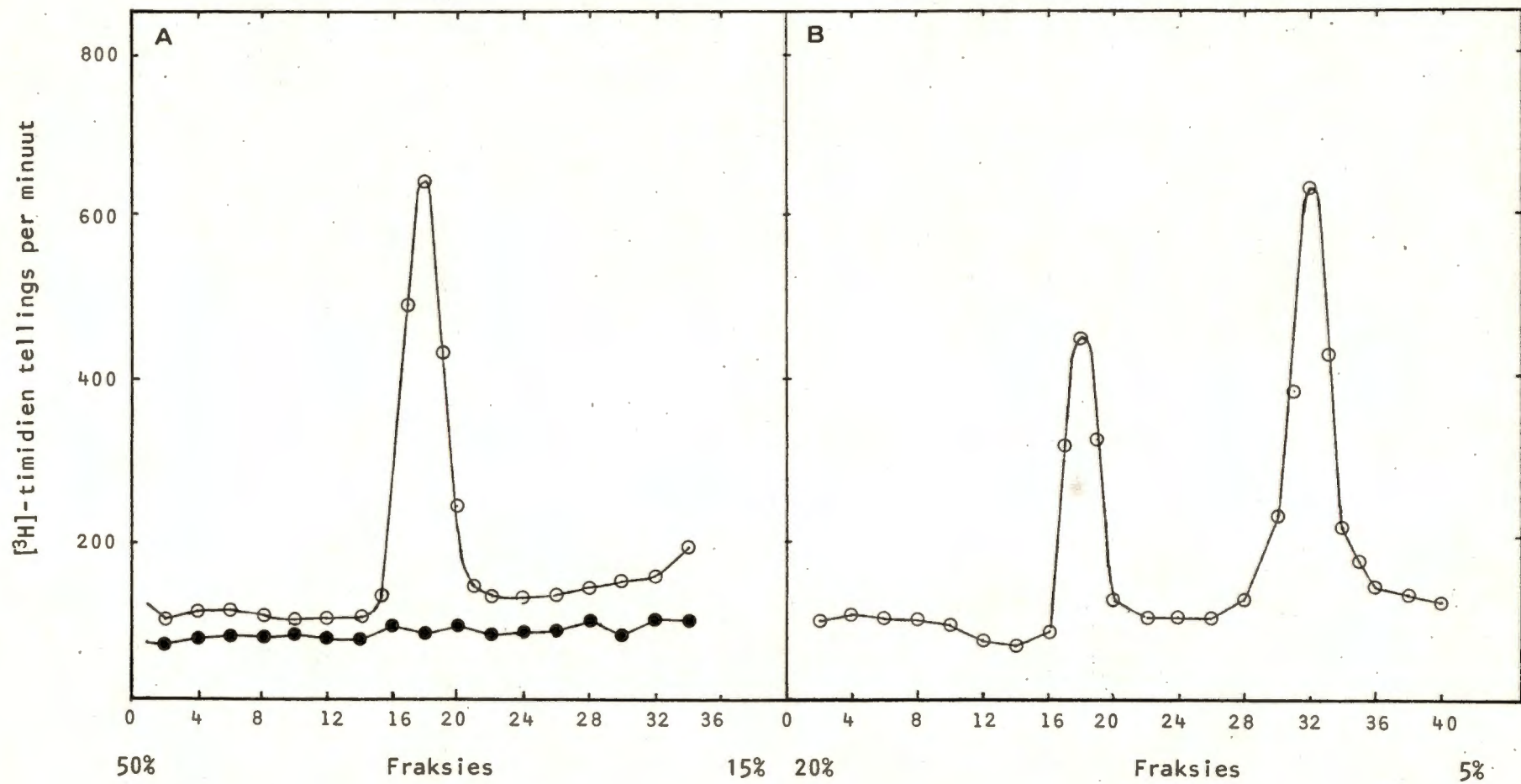
Die sedimentasie van DNA vanaf *E. coli* W1485-1 voor en nadat dit die vermoë tot ST-produksie verwerf het, word in figuur 4-1A aangedui. Helder lisate van *E. coli* W1485-1 en 'n Ent⁺ transkonjugant, *E. coli* W1485-1 (ent⁺) uit 'n kruising tussen *E. coli* H2E (ST) en *E. coli* W1485-1, is op 15%-50% neutrale sukrose gesentrifugeer. 'n Prominente [³H]-timidiengemerke piek verskyn naby die middel van die gradiënt. Soortgelyke ekstrachromosomale DNA is afwesig in die Tox⁻ *E. coli* K12 W1485-1 F⁻ stam voor kruising. Volgens S. Falkow, University of Washington, Seattle, V.S.A. bevat laasgenoemde stam geen bespeurbare ekstrachromosomale DNA nie (S. Falkow, persoonlike mededeling).

Helder lisate van bogenoemde transkonjugante is met $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ pronase vir 15 minute by 25°C behandel en op 15% tot 50% neutrale sukrose gesentrifugeer. Saamgevoegde radio-aktiewe DNA fraksies is direk onder die elektronmikroskoop ondersoek. Sommige DNA molekules was teenwoordig as oop sirkelvormige strukture volgens figuur 4-2A. Kontouerlengtes van hierdie ST plasmied DNA molekule dui op 'n molekulêre massa van $\pm 46 \times 10^6$ daltons.

Helder lisate van 'n Tox^+ transkonjugant, W1485-1 (ent^+ , RSF1010), verkry uit die BFM-toets na 'n kruising tussen *E. coli* stamme H2E, J5 en W1485-1, is berei. Die DNA sedimentasieprofiel van W1485-1 (ent^+ , RSF1010) in 5% tot 20% neutrale sukrose is volgens figuur 4-1B verkry. Dit toon die verwerwing van Ent sowel as die $5,5 \times 10^6$ dalton gemobiliseerde R plasmied, RSF1010 aan. Hierdie lisate is nie verder ondersoek nie.

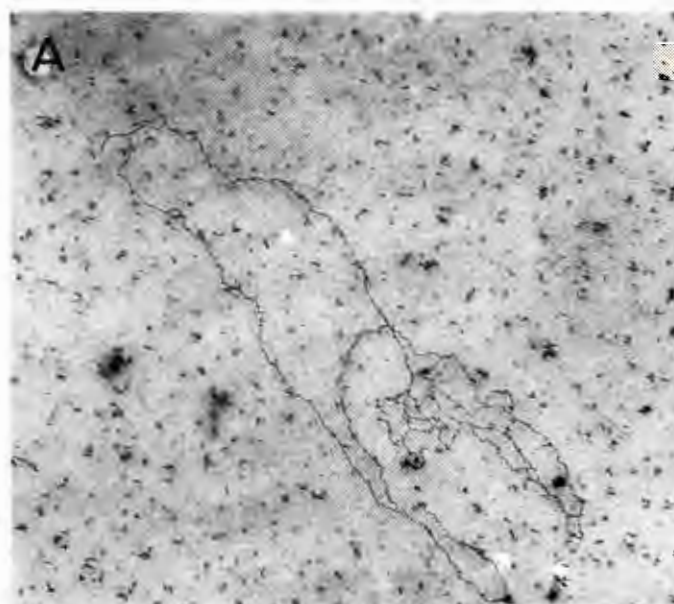
Enterobacter cloacae H26B is die mees potente LT-produuserende lid van die *Klebsiellae*. Die vermoë tot toksiensintese kon nie na *E. coli* K12 F^- stamme oorgedra word nie. Ook kon oordragsfaktore nie by hierdie stam aangedui word nie (sien tabel 4-1). Helder lisate van wildetipe *E. cloacae* is soos hierbo behandel. Die DNA sedimentasieprofiel in 15% tot 50% neutrale sukrose is soos in figuur 4-3 bevind. Elektronmikroskopie van saamgevoegde gedialiseerde fraksies volgens hierdie piek het die teenwoordigheid van baie klein oop sirkelvormige DNA molekules, volgens figuur 4-2B, aangedui. Die molekulêre massa van hierdie DNA molekules kon volgens kontouerlengtes op $\pm 2,56 \times 10^6$ daltons bereken word. Anders as in die geval van *E. coli* H2E is hierdie plasmied nie noodwendig verantwoordelik vir toksienproduksie nie.

Twee LT-produuserende *E. coli* stamme H16H en H39E, waarby geen oordragsfaktore of Ent oordrag bewerkstellig kon word nie, is geliseer en soos hierbo vir die teenwoordigheid van ekstrachromosomale DNA ondersoek. As positiewe en negatiewe kontroles vir Ent plasmied DNA is *E. coli* stamme W1485-1 (ent^+) en W1485-1 (ent^-) respektiewelik gebruik. Figuur 4-4A toon die DNA sedimentasieprofiel in 15%-50% sukrose van stam W1485-1 voor en na die verwerwing van 'n ST Ent plasmied. Die

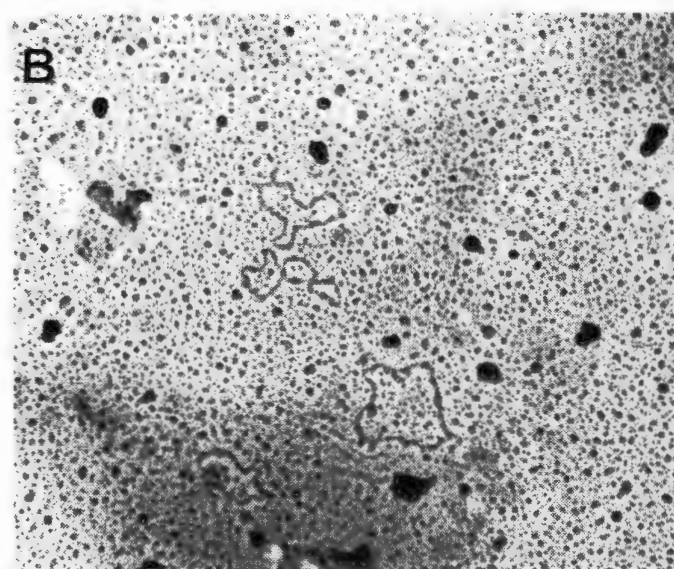


Figuur 4-1. DNA sedimentasie profiele in neutrale sukrose :

A, *E. coli* W1485-1 (ent^+) ○-○, *E. coli* W1485-1 (ent^-) ●-●.
 B, *E. coli* W1485-1 (ent^+ , RSF 1010) ○-○.

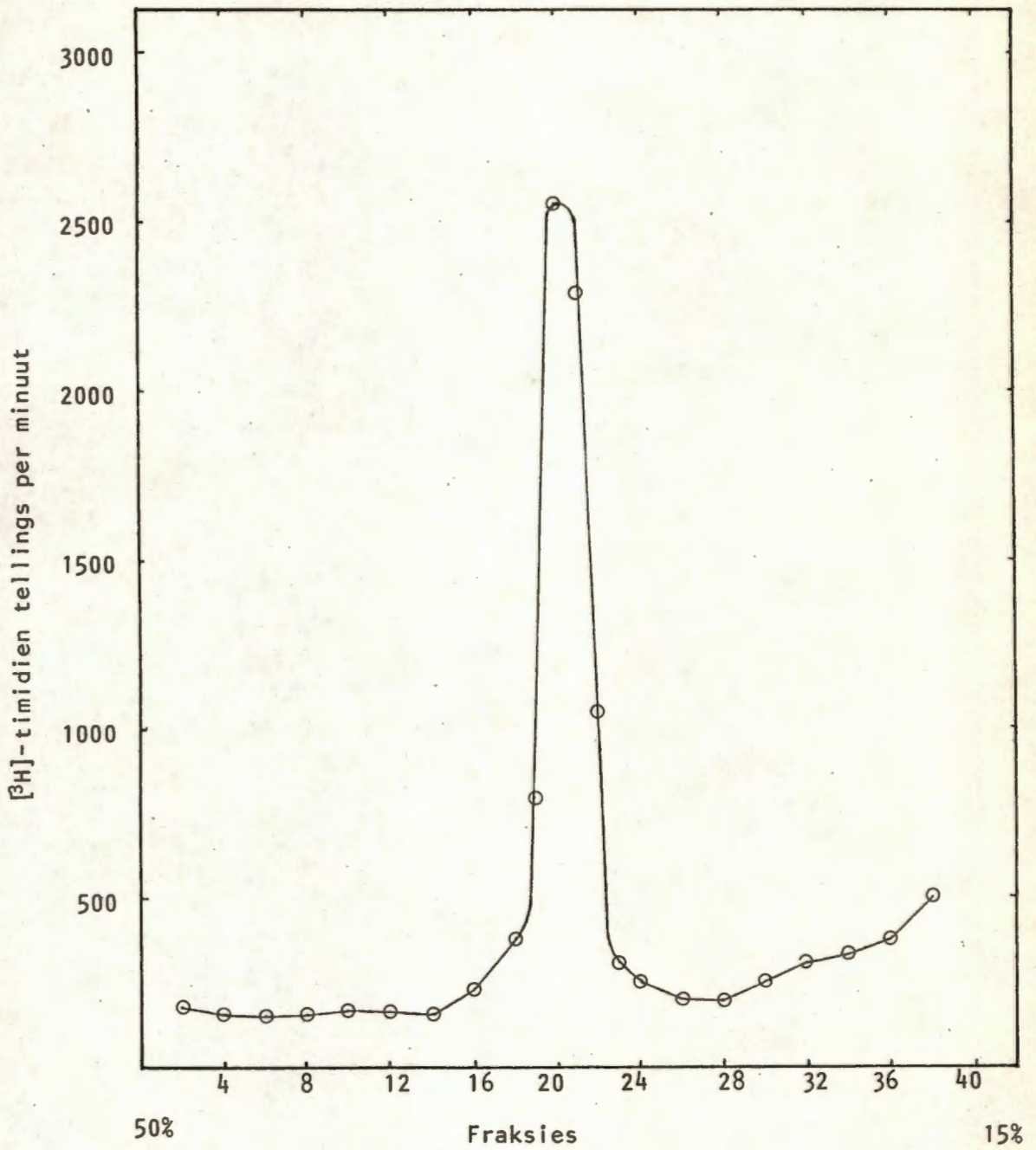


1 μm

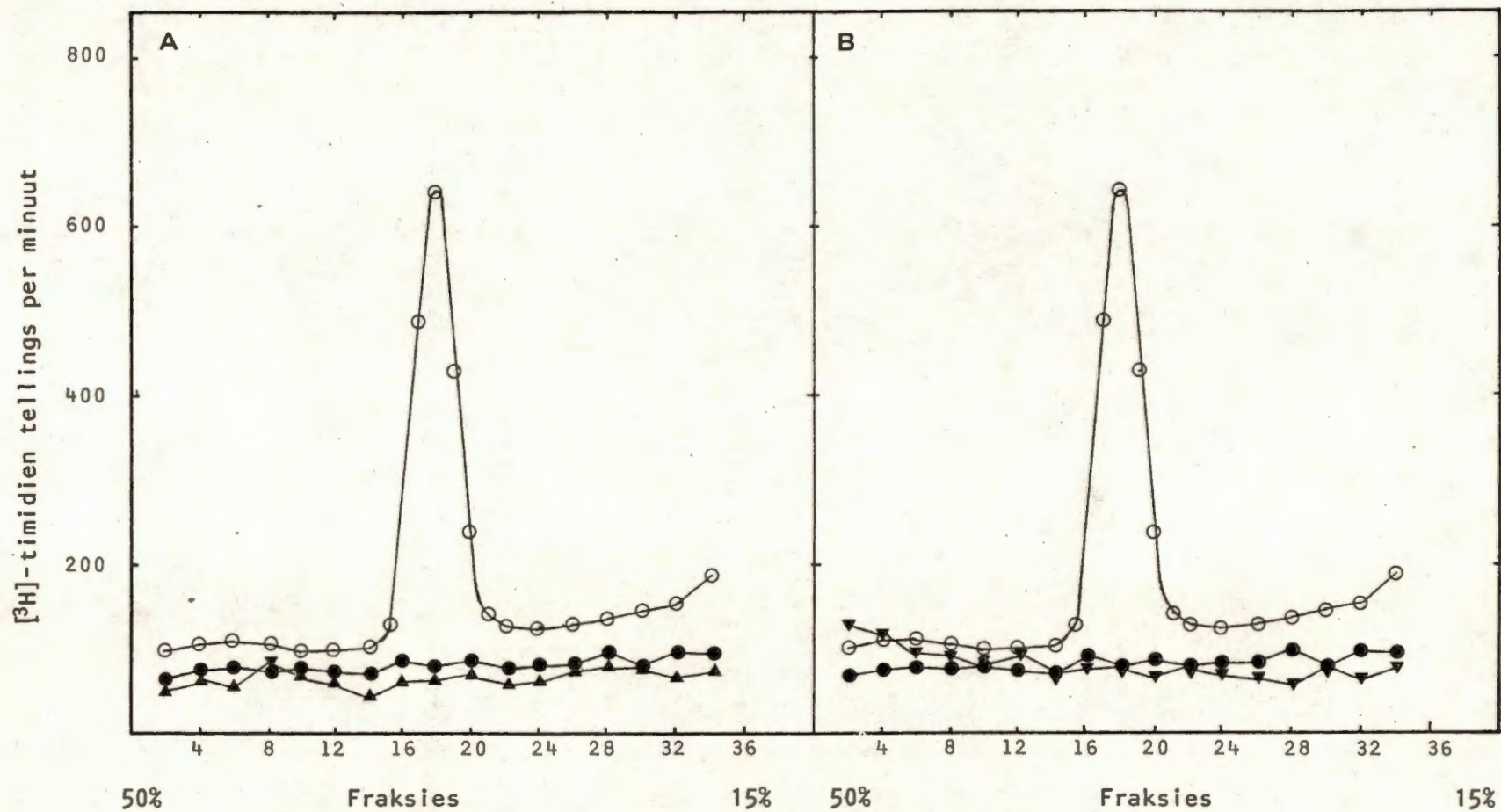


1 μm

Fig. 4-2. A: Plasmied DNA van *E. coli* H2E, molekulêre massa $\pm 46 \times 10^6$ daltons.
B: Plasmied DNA van *E. cloacae* H26B, molekulêre massa $\approx 2,6 \times 10^6$ daltons.



Figuur 4-3. DNA sedimentasie profiel in neutrale sukrose van *E. cloacae* (LT) H26B.



Figur 4-4. DNA sedimentasie profiele in neutrale sukrose.

A, *E. coli* (LT) H16H ▲-▲; *E. coli* W1485-1 (*ent*⁻) ●-●; *E. coli* W1485-1 (*ent*⁺) ○-○.
 B, *E. coli* (LT) H39E ▼-▼; *E. coli* W1485-1 (*ent*⁻) ●-●; *E. coli* W1485-1 (*ent*⁺) ○-○.

sedimentasieprofiel van wildetipe *E. coli* H16H (LT) toon egter die afwesigheid van ekstrachromosomale DNA. Soortgelyke eksperimente met *E. coli* H39E kon, volgens figuur 4-4B, ook nie die aanwesigheid van plasmied DNA bevestig nie. Hierdie resultate is herhaaldelik verkry en dui op 'n moontlike chromosomale lokus vir die *tox* gene by laasgenoemde twee *E. coli* stamme.

BESPREKING

4.8 Die aard en implikasies van konjugeerbare Ent by Tox^+ *Enterobacteriaceae*

Die voorkoms van oordragsfaktore by 63,6% van die Tox^+ *E. coli* stamme in hierdie studie vergelyk goed met die bevindinge van ander werkers.

By enteropatogene *E. coli* stamme, afkomstig van simptomatiese mense en diere, is die voorkoms van oordragsfaktore so hoog as 75% tot 100% (Smith en Linggood, 1970; Skerman *et al.*, 1972; Gyles *et al.*, 1974). Daarteenoor rapporteer laasgenoemde outeurs 'n skerp kontras van 28% tot 38% vir die voorkoms daarvan by *E. coli* stamme vanuit asimptomatiese gevalle. By enteropatogene stamme van *E. coli* word hierdie oordragsfaktore feitlik uitsluitlik deur plasmiede soos Ent, Hly, K88, K99, R en Col verteenwoordig (sien 1.8). Plasmiede soos hierdie sowel as ander ekstrachromosomale elemente dra by tot die aanpasbaarheid van die organisme tot sy omgewing (Reaney, 1976). Soms kom meer as een van hierdie plasmiede by 'n organisme voor en verleen dit gedugte enteropatogene vermoëns (Sherrat, 1977). Die totale plasmiedkompleks van *E. coli* bepaal dan ook grootliks die enteropatogeniteit van hierdie organisme (So *et al.*, 1974). Sommige oordragsfaktore uit die onderhawige studie is gevolglik verder ondersoek.

Die voorkoms van konjugeerbare Ent plasmiede by 4 van 11 (36,4%) *E. coli* stamme uit hierdie studie is heelwat hoër as die waardes wat deur ander werkers gerapporteer is. Die oordraagbaarheid van Ent by *E. coli* afkomstig van varke kon slegs by 6 van 51 (12%) enterotoksigene stamme deur Smith en Halls (1968) en Smith en Gyles (1970) aangetoon word. By menslike Tox^+ *E. coli* kon die

konjugeerbaarheid van Ent by 1 van 27 (4%) stamme deur Smith en Linggood (1971) bewerkstellig word. Ses en twintig van laasgenoemde stamme het tot klassieke enteropatogene serotipes van *E. coli* behoort, almal getinkrimineer by suigeling met diarree. Die enkele konjugeerbare Ent plasmied was by 'n enteropatogene serotipe van *E. coli* 026:K60:H11, teenwoordig (Smith en Linggood, 1971). In die huidige studie is vier klassieke enteropatogene serotipes gevind wat enterotoksiene produseer (sien tabel 2-13). By een van hierdie serotipes, *E. coli* 0128:K67:H27 stam H36A, kon die konjugeerbaarheid van Ent (ST + LT) na 'n nie-enteropatogene *E. coli* K12 aangetoon word.

Hierdie bevinding impliseer dat serotipering nie 'n aanduiding van die vermoë tot toksienproduksie kan gee nie (sien ook 2.12 en hieronder).

As gevolg van die afwesigheid van seleksie vir Ent by die gewone enkelstap konjugasie eksperiment sal oordrag slegs aangedui kan word indien dit teen 'n hoë frekwensie plaasvind. Volgens Smith en Halls (1968) kon Ent oordrag met behulp van laasgenoemde konvensionele metodes net aangetoon word indien die oordragsfrekwensie hoër as ongeveer 10^{-1} is. Die meeste natuurlike oordraagbare plasmiede word egter selde teen 'n frekwensie hoër as 10^{-4} per skenkersel per uur *in vitro* oorge=dra (Skerman *et al.*, 1972). Die BFM-toets bied tans die beste moontlik= hede vir die indirekte seleksie van Ent met 'n bespeuringsgevoeligheid van ongeveer 6 keer die van die enkelstap konjugasietegniek (Skerman *et al.*, 1972). Hierdie gevoeligheid steek nogtans skerp af teen die sensitiewe selektiewe tegnieke, met 'n gevoeligheid van ongeveer 10^{-8} , vir die bepaling van antibiotiese bestandheidbepalers (Gyles *et al.*, 1974). Met behulp van die BFM-toets kon Gyles *et al.* (1974) oordraag= bare Ent by 17% van Tox⁺ *E. coli* stamme van menslike en dierlike oorsprong aantoon. Die algemene gevoel van al hierdie outeurs is dat Ent waarskynlik by 'n heelwat hoër persentasie stamme selfoordraagbaar is maar dat dit teen so 'n lae frekwensie geskied dat die bestaande metodes dit nie bespeur nie. Die hoë persentasie van oordragsfaktore en oordraagbare Ent uit hierdie studie ondersteun laasgenoemde standpunt.

In die huidige ondersoek kon die bepalers vir ST sowel as dié verantwoordelik vir ST + LT produksie na *E. coli* K12 oorgedra word. In laasgenoemde geval het al die transkonjugante die vermoë om beide enterotoksiene te sintetiseer openbaar. Die sintese van ST + LT kan deur 'n enkele plasmied beheer word (Gyles *et al.*, 1974). In der waarheid is die klein klompie ST + LT Ent plasmiede wat tot dusver ondersoek is 'n homogene groep met 'n molekulêre massa van ongeveer 60×10^6 daltons en 'n G + C verhouding van 50% (Gyles *et al.*, 1974). Hierdie plasmiede deel ook die grootste gedeelte van hul polinukleotiedvolgorde met mekaar afgesien van hul menslike of dierlike oorsprong (Santos *et al.*, 1975; So, Crosa en Falkow, 1975). In hierdie opsig kom hulle ook ooreen met plasmiede van die FI en FII onverenigbaarheidsgroepe maar nie met R plasmiede wat tot die I, N, W, P of X onverenigbaarheidsgroepe behoort nie (Santos *et al.*, 1975; So *et al.*, 1975). Uit DNA-DNA heterodupleks studies vertoon hierdie plasmiede 55% homologie met die seksfaktor F (Santos *et al.*, 1975). Daar is egter verrassend genoeg minder as 1% onderlinge verwantskap tussen die DNA van ST + LT plasmiede, ST plasmiede en *V. cholerae* DNA (So *et al.*, 1975).

In teenstelling met bogenoemde bestaan die plasmiede afkomstig van diere, en wat slegs vir ST kodeer, uit 'n heterogene groep met molekulêre massas wat wissel van 21×10^6 tot 80×10^6 daltons (So *et al.*, 1975; en sien 4.9). Terwyl die *E. coli* labiele toksiene van ST + LT-produseerders homogeen voorkom, bestaan daar aansienlike twyfel oor die homogeniteit van verskillende stabiele toksienspesies (Gyles 1974a en b; So, Boyer, Betlach en Falkow, 1976). 'n Moontlike verklaring hiervoor kan in die heterogeniteit van ST plasmiede onderling en met ST + LT Ent plasmiede gesoek word.

Feitlik alle genetiese ondersoeke van slegs ST-produseerders is tot dusver op varkstamme uitgevoer. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat tot betreklik onlangs slegs ST + LT produseerders by mense betrek is (Sack, 1975; Wachsmuth *et al.*, 1976).

Dit is gevolglik belangrik om daarop te let dat die konjugeerbaarheid van Ent by twee *E. coli* (ST) stamme, H2E en H38J, uit die huidige

ondersoek aangedui kon word. By *E. coli* (ST + LT) H36A is die gesamentlike oordrag van Ent en die bestandheidsbepalers vir sulfafurasool, ampicilien, karbenisilien en tetrasiklien bewerkstellig. Die teenwoordigheid van al hierdie bestandheidsbepalers by al die Ent⁺ transkonjugante impliseer dat Ent waarskynlik afhanklik van die R plasmied oorgedra word (Wachsmuth *et al.*, 1976). Dit is ook belangrik om daarop te let dat in die gevalle waar transkonjugante beide die bestandheidsfaktor en Ent gehuisves het hierdie genetiese elemente stabiel saam kan bestaan. In enkele gevalle waar sulke transkonjugante periodiek oor 'n tydperk van 6 maande getoets is was daar geen verlies van beide hierdie eienskappe nie. Dit is 'n bekende feit dat verskillende R plasmiede tot verskeie onverenigbaarheidsgroepe behoort. Plasmiede wat tot dieselfde onverenigbaarheidsgroep behoort kan nie stabiel saam in dieselfde bakteriese sel bestaan nie terwyl die omgekeerde ook waar is (Datta en Hedges, 1971; Hedges en Datta, 1971; Khatoon en Iyer, 1971; Coetzee, Datta en Hedges, 1972). Die isolasie van hierdie enteropatogene serotipe van *E. coli*, 0128:K67:H27, met konjugeerbare Ent (ST + LT) en R faktore met veelvuldige bestandheidsbepalers uit die huidige ondersoek mag belangrike mediese implikasies inhou. Die selektiewe druk in 'n antibiotika verbruikende gemeenskap kan tot die seleksie van Ent⁺ organismes met veelvuldige antibiotiese bestandheid lei (Wachsmuth *et al.*, 1976).

Geen oordrag van Ent kon by ander stamme as *E. coli* bewerkstellig word nie. 'n Studie van die literatuur dui op geen soortgelyke ondersoeke met ander genera nie. Afgesien van bogenoemde redes mag genetiese verskille tussen skenker- en ontvangerorganismes 'n rol by die oordraagbaarheid van Ent speel. Volgens Smith en Linggood (1970) varieer die bespeurbaarheid van oordragsfaktore met die BFM-toets na gelang van die stamverskille tussen die paringskomponente in die toets. Mobilisasie is die beste wanneer al drie die stamme *E. coli* is (Smith en Linggood, 1970). Oordragsfaktore kon wel tussen ander lede van die *Enterobacteriaceae* en *E. coli* in die onderhawige ondersoek aangedui word. Nietemin was so 'n resultaat nie altyd herhaalbaar nie (sien tabel 4-1). Sêlfs met net *E. coli* komponente in die toets kon daar by sommige stamme geen oordrag bewerkstellig word nie. Varieerende resultate is weer by ander *E. coli* stamme, veral met *E. coli* W1485-1, as finale ontvanger verkry.

4.9 Die voorkoms en betekenis van ekstrachromosomale DNA by Tox^+ *Enterobacteriaceae*

'n Aantal Tox^+ stamme is geselekteer vir 'n verdere ondersoek na die teenwoordigheid van ekstrachromosomale DNA. Met *E. coli* (ST) stam H2E kan die vermoë om ST te produseer duidelik aan die verwerwing van 'n $+ 46 \times 10^6$ dalton plasmied toegeskryf word. Hierdie plasmied kon deur middel van konjugasie na twee $Tox^- E. coli$ K12 F^- stamme oorgedra word. Die vermoë van *E. coli* W1485-1 en J62 om ST te produseer gaan gepaard met die verwerwing van hierdie plasmied. Die vermoë tot ST produksie kan ook onderling deur konjugasie tussen 'n Ent verwerwe transkonjugant, *E. coli* W1485-1 (ent^+), en $Tox^- E. coli$ J62 bewerkstellig word. Toksiensintese bly stabiel by transkonjugante. Pogings van verskeie werkers om *E. coli* van Ent, met behulp van 'n verskeidenheid mutagene middels, te bevry was ook tot dusver onsuksesvol (Smith en Halls, 1968; Mitchell en Kenworthy 1977). Dit vorm 'n teenstelling met die betreklik maklike wyse waarop 'n organisme van Hly, K88 en K99 bevry kan word (Mitchell en Kenworthy, 1977). Dit wil dus voorkom of Ent besonder stabiele genetiese eienskappe openbaar.

Twee slegs LT-produuserende *E. coli* stamme waarby geen oordragsfaktore aangedui kon word nie is geliseer en vir die teenwoordigheid van ekstrachromosomale DNA ondersoek. Herhaaldelike pogings in die verband was egter onsuksesvol. Hieruit kan verskeie afleidings gemaak word. Indien ekstrachromosomale DNA by hierdie stamme afwesig is moet die gene vir toksienproduksie op die chromosoom van die organisme geleë wees. Vanweë die noue verwantskap tussen *E. coli* LT en cholera gene (sien Hoofstukke 1 en 3) word die bepalers vir enterotoksienproduksie by *V. cholerae* as die oerouer van *E. coli* LT of andersom gepostuleer (So *et al.*, 1974). Dit is nietemin duidelik dat die gene vir die produksie van cholera toksien op die chromosoom van die organisme geleë is (Gerdes en Romig, 1975; Vasil, Holmes en Finkelstein, 1975). Alle ondersoeke na moontlike omskakeling van *V. cholerae* deur bakteriofage dui egter op die teendeel (Gerdes en Romig, 1975). Nietemin kan so 'n moontlike verklaring vir 'n chromosomale lokus van die *tox* gene by laasgenoemde *E. coli* stamme nie uitgesluit word nie. Belangrike enteropatogene vermoëns word by verskeie bakterieë aan faagomskakeling gewyt. By *Corynebacterium diphtheriae* is die vermoë om toksien te

produseer te wyte aan infeksie deur 'n faag (Freeman, 1951; Freeman en Morse 1952). Nie-toksigene stamme van *C. diphtheriae* kan die vermoë tot toksienvorming verwerf deur infeksie met lisogene β -faag (Groman, 1953; Barksdale en Pappenheimer, 1954). Verlies van die faag gaan ook gepaard met die verlies aan die vermoë om toksien te produseer (Groman, Eaton en Booher, 1958).

Die verandering van somatiese antigene by salmonellae word ook aan fagomskakeling gewyt.

Groep E salmonellae word onderskei deur hul somatiese antigene. Subgroep E_1 word gekenmerk deur antigene 3 en 10, subgroep E_2 deur antigene 3 en 15 en subgroep E_3 deur antigeen 34. Salmonellae van subgroepe E_2 en E_3 is lisogeen vir nie-verwante gematigde fage ϵ^{15} en ϵ^{34} respektiewelik. Wanneer sensitiewe organismes van subgroep E_1 lisogeen geïnfekteer word met faag ϵ^{15} staak dit die produksie van antigeen 10 en begin antigeen 15 sintetiseer (Iseki en Sakai, 1953). Produksie van antigeen 15 begin binne 'n paar minute na infeksie (Uetake, Luria en Burrous, 1958). Faag ϵ^{34} kan nie aan antigene 3 en 10 adsorbeer nie en infekteer dus nie normale subgroep E_1 organismes nie. Dit kan egter aan antigeen 15 vasheg en is dus infektief vir E_2 organismes sowel as vir E_1 organismes wat lisogeen deur faag ϵ^{15} geïnfekteer is. Dubbele lisogene salmonellae, (ϵ^{15}) (ϵ^{34}), kan dus geïsoleer word wat nou antigene 34 en 3 sowel as die gewysigde antigeen 15 sintetiseer (Uetake *et al.*, 1958). Die somatiese antigeen 10 bestaan struktureel uit galaktosielmanosielramnosiel volgordes wat aanmekaar gekoppel is met α -verbindinge (Robbins en Uchida, 1962; Mäkela en Stocker, 1969). Na infeksie met faag ϵ^{15} verander die α -bindinge na β -bindinge. Faag ϵ^{34} is weer verantwoordelik vir die aanhegting van glukose aan die β -galaktosielres van die polisakkaried wat dan uiting vind as antigeen 34 (Robbins en Uchida, 1962).

'n Wisselwerking van DNA fragmente onderling tussen plasmiede of tussen plasmied en chromosoom bied ook 'n moontlike verklaring vir 'n chromosomale lokus vir *tox* gene by *E. coli* LT produseerders.

Alhoewel die vermoë om α -hemolisien te produseer by *E. coli* deur 'n plasmied, Hly, beheer word, mag die bepalers vir hierdie eienskap by sommige stamme chromosomaal wees (Smith en Linggood, 1970). Translokasie van 'n $3,2 \times 10^6$ dalton DNA fragment wat bestandheid teen ampisilien verleen, kan tussen verskillende plasmiede plaasvind (Hedges en Jacob, 1974; Heffron, Sublett, Hedges, Jacob en Falkow, 1975). Hierdie ampisilien transposon (TnA) kan op verskillende plekke in die DNA molekule van nie-konjugeerbare plasmiede soos RSF1010 (Heffron, Rubens en Falkow, 1977) en pSC101 (Kopecko en Cohen, 1975) inskakel en tot bestandheid bydra. Dit mag ook op verskeie plekke van Col E1 DNA inskakel (Inselburg, 1977). Translokasie van TnA tussen 'n plasmied (R388) en die *E. coli* chromosoom vind ook plaas (Bennett en Richmond, 1976). Rekombinasie van 'n $5,7 \times 10^6$ dalton plasmied (P307) DNA fragment wat die gene vir ST bevat, met 'n R plasmied, pSC101, sowel as met RSF 2124, 'n Col E1 derivaat, is onlangs deur So *et al.*, (1976) bewerkstellig. In laasgenoemde geval is die rekombinant plasmied in 20-30 kopieë per sel teenwoordig en lewer die organisme ongeveer 3 keer meer ST.

In hierdie verband vind sekere bevindinge uit die huidige studie 'n belangrike aansluiting. Die groot gemak waarmee Ent by *E. coli* H2E, selfs deur 'n enkelstap konjugasietegniek, na Tox^- *E. coli* oorgedra kan word hou belangrike epidemiologiese en mediese implikasies in. Die oordragsfrekwensie ($2,2 \times 10^{-1}$) van hierdie stam is sover bekend die hoogste wat nog gerapporteer is. Promiskuititeit van hierdie aard herhinner aan aansteeklike bestandheid en al die probleme wat daarmee gepaard gaan (Watanabe, 1963; Anderson en Lewis, 1965a en b; Maré en Coetzee, 1965). Dit verhoog ook die kans op geen uitruiling en rekombinasie en die moontlike tot standkoming van patogene organismes met nuwe kenmerke (Sherrat, 1977). Dit tesame met die feit dat normale sowel as enteropatogene *E. coli* stamme dikwels soveel as 6 verskillende ekstrachromosomale elemente huisves, elk met 'n wye verskeidenheid eie bepalers, skep besliste moontlikhede (So *et al.*, 1974; 1976). 'n Epidemiese ST-produseerders waar Ent altyd gepaar is met 'n R plasmied, wat veelvuldige bestandheid verleen, is onlangs beskryf (Wachsmuth *et al.*, 1976). Uit die huidige studie word 'n vergelykbare toestand by 'n ST + LT

produserende *E. coli*, waar Ent altyd saam met bestandheidbepalers vir sulfafurasool ampisilien, karbenisilien en tetrasiklien konjugeerbaar is, gerapporteer.

Aan die anderkant kon daar by verskeie Tox^+ organismes uit hierdie studie geen oordrag van Ent bewerkstellig word nie. By minstens twee LT-produserende *E. coli* stamme, H16H en H39E, kon getuienis vir die afwesigheid van ekstrachromosomale DNA gelewer word. By *E. cloacae* H26B weer is die teenwoordigheid van 'n klein $2,56 \times 10^6$ dalton nie-selfoordraagbare plasmied aangetoon. Dit mag of mag nie vir die sintese van LT verantwoordelik wees.

4.10 Gevolgtrekkings

'n Aansienlike mate van genetiese diversiteit is by Tox^+ *Enterobacteriaceae* aangetref. Die konjugeerbaarheid van Ent, by sommige *E. coli* stamme, impliseer dat die vermoë om ST of ST + LT te produseer minstens na Tox^- *E. coli*, moontlik selfs *in vivo* na ander dermflora, kan versprei. Dit hou belangrike diagnostiese en terapeutiese implikasies in. Die konjugeerbaarheid van Ent (ST + LT), van enteropatogene serotipe 0128:K67:H27 van *E. coli* H36A na nie-patogene *E. coli* K12, bevestig dat tradisionele serotipering van *E. coli* uit suigelingsgastroënteritis nie 'n betroubare aanduiding van toksienproduksie is nie. Die gesamentlike oordrag by *E. coli* H36A van Ent en veelvuldige antibiotiese bestandheidbepalers, en die waarskynlike afhanklikheid van Ent van laasgenoemde vir oordrag, kom gedug voor. Seleksie van sulke organismes in 'n antibiotika verbruikende gemeenskap kan terapeutiese en epidemiologiese komplikasies in die hand werk.

Die afwesigheid van demonstreerbare ekstrachromosomale DNA by sommige LT produserende *E. coli* dui op 'n chromosomale lokus vir die *tox* gene in sommige gevalle. Hierdie toestand korreleer ook nie met tradisionele enteropatogene serotipes van *E. coli* nie.

Ent kon nie onomwonde by ander genera as *E. coli* gedemonstreer word nie. Tog sintetiseer al die LT produseerders hoogs verwante LT produkte (sien Hoofstuk 3) wat mag impliseer dat, afgesien van die geen lokus, dit gelyksoortig funksioneer. 'n Eenvormige strategie, vir immunisasie van suigelingte teen cholerageenagtige enterotoksiene, mag dus uit hierdie oogpunt gesien belowend wees. Die nie-immunogeniese en plasmied gemedieerde aard van ST mag egter probleme in dié verband skep.

HOOFSTUK 5

ENTEROTOKSIGENE BAKTERIEË IN RIOOL EN WATER EN HUL
ROL AS KWALITEITINDIKATORE VAN WATER

INLEIDING

5.1 Die voorkoms van Tox⁺ bakterieë in die natuur

Die isolasie van 'n verskeidenheid Tox⁺ *Enterobacteriaceae* uit pasiënte met akute gastroënteritis skep onder andere nuwe vrae in verband met die moontlike verspreiding van hierdie organismes in die natuur. Ongetwyfeld is dit so dat die huidige komplekse en tydrowende aard van die metodes vir toksientoetsing 'n beperkende faktor in ondersoeke van hierdie aard is. Die voor die hand liggende bronne om ondersoek te word is water en voedsel. Veral in die ontwikkelende lande, waar dikwels 'n gebrek aan sanitasie en kwaliteitsbeheer heers, sou hulle teenwoordigheid in die mens se onmiddellike omgewing verwag kan word.

'n Watergedraagde rol vir Tox⁺ bakterieë in die etiologie van suigelingsgastroënteritis word nie deur Sack *et al.* (1975) en Ryder *et al.* (1976) uitgesluit nie. Voedsel speel ook 'n rol in hierdie verband (Sack *et al.*, 1977). Volgens Rosenberg *et al.* (1977) kan groot epidemiese uitbreke van gastroënteritis aan enterotoksigene *E. coli* in rioolbesmette drinkwater toegeskryf word. Geen kwantitatiewe gegewens omtrent die voorkoms van Tox⁺ bakterieë in riool en natuurlike waterbronne is na wete tot dusver gepubliseer nie.

5.2 Indikatororganismes en die kwaliteit van water

Water vir menslike gebruik vereis kwaliteitsbeheer daarvan. Die kwantitatiewe teenwoordigheid van indikator organismes soos *E. coli* I en coliforme dien as kwaliteitstandaarde vir water. Interpretasie verskille met betrekking tot die status en belang van verskillende indikator organismes gee aanleiding tot verskillende kwaliteitstandaarde (Brand, Kemp, Pretorius en Scoonbee, 1967; Livingstone, 1969; Grabow, Prozesky en Smith, 1974; American Public Health Association *et al.*, 1976). Verskille van hierdie aard mag 'n belangrike rol speel in die etiologie van gastroënteritis.

5.3 Doelstellings

In die lig van die voorafgaande, sowel as die ernstige omvang van gastroënteritis in ontwikkelende lande insluitende die Republiek, is dit belangrik geag om die voorkoms van Tox⁺ *E. coli* in riool en rivierwater na te gaan. Die eksperimentele ontwerp was tweërlei van aard. Deur die coliformgedrag van Tox⁺ *Enterobacteriaceae* wat tot dusver uit hierdie studie geïsoleer is te bestudeer, is getrag om 'n geskikte metode vir die kwantitatiewe bepaling van Tox⁺ *E. coli* in riool en water te vind. Uit hul gedrag kon ook 'n evaluering van hul status as indikator organismes gemaak word. Tweedens is die kwantitatiewe bepaling van enterotoksigene *E. coli* op beperkte skaal in riool en enkele varswaterbronne gemaak.

WERKWYSE

5.4 Die bepaling van die coliformgedrag van Tox⁺ *Enterobacteriaceae*

Gegewens in verband met media, oplossings en reagense word in die aanhangsel verstrek. Standaard aseptiese tegnieke is deurgaans gebruik.

Die organismes wat vir hul gedrag as coliforme getoets is verteenwoordig die 20 mees potente Tox⁺ lede van die *Enterobacteriaceae* uit gastroënteritis pasiënte (sien tabelle 2-8 en 2-10).

Agtien uur oue kulture van hierdie organismes in 10 ml BHI-sop is elk in die verhouding van 1:10 in 10 ml vars BHI-sop verdun en voortgekweek (37°C) tot die laat logfase ($\pm 2-5 \times 10^8$ selle ml⁻¹). Tienvoudige verdunnings hiervan is in warm (37°C) soutoplossing (0,85%) van 10⁻¹ tot 10⁻⁸ voorberei. Een ml van elke verdunning is as inokulum vir die membraanfiltermetode (MF-metode) gebruik. Die 18 uur oue kulture is as inokulum vir die aanvullende toetse, wat normaalweg by die klassifikasie van coliformorganismes van toepassing is, gebruik (Windle-Taylor, 1958; Brand *et al.*, 1967; American Health Association *et al.*, 1976).

Volgens die voorskrifte van laasgenoemde outeurs is die volgende reaksies in aanmerking geneem : geel kolonies (suurvorming) op MacConkeymembraansop (Oxoid) by 44,5°C; blou kolonies (suurvorming) op membrane vanaf *m*-FC-medium (Difco) by 44,5°C; suur en gasproduksie in laktose-galsout-medium (MacConkeyperssop, Oxoid) binne 48 uur by 37°C en 44,5°C; indoolproduksie in triptonwater binne 48 uur by 37°C en binne 24 uur by 44,5°C; sitraatverbruik binne 96 uur by 37°C; metielrooireaksie binne 5 dae by 30°C; Voges-Proskauerreaksie binne 48 uur by 30°C; gelatienervloeiing binne 7 dae by 30°C en H₂S-produksie binne 24 uur by 37°C. 'n Klassifikasie van coliformorganismes op grond van hul reaksies met hierdie toetse kan, volgens Brand *et al.* (1967) en American Public Health Association *et al.* (1976), aan die hand van tabel 5-1 gemaak word.

Gelman membraanfilterhouers toegerus met 0,45 µm membrane (Gelman GN6), is elk vooraf benat deur 20 ml hoeveelhede soutoplossing deur te suig. Een ml inokulum is in die verhouding van 1:30 in warm soutoplossing verdun en deurgesuig. Die filters is hierna twee maal met 20 ml hoeveelhede soutoplossing gewas en drooggesuig. Daarna is die membrane oorgeplaas na petribakkies met absorberende skyfies (millipore) deurweek (+ 2 ml) met Herwinningsmembraansop (Oxoid). Na inkubasie by 37°C vir twee uur is die membrane na soortgelyke petribakkies met MacConkeymembraansop (Oxoid) oorgeplaas. Verdere inkubasie is by 44,5°C (+ 0,2°C) vir 16 uur in waterdigte houers in 'n waterbad uitgevoer. Na 'n totale inkubasietyd van 18 uur is membrane met ± 20 tot 150 kolonies geselekteer en is die koloniemorfologie en kleur van elke individuele kolonie ondersoek. Die kleur is onmiddellik na verwydering uit die waterbad nagegaan aangesien dit na 'n paar minute by kamertemperatuur verbleik. Geel kolonies is as positief vir fekale coliformgedrag noteer (Windle-Taylor, 1958; Brand *et al.*, 1967).

Bogenoemde prosedure is ook toegepas met *m*-FC-medium (Difco) volgens die voorskrifte van die American Public Health Association *et al.* (1976). Die inkubasie omstandighede in hierdie geval was 24 uur onder dieselfde toestande as hierbo. Blou kolonies is as tipiese fekale coliformgedrag noteer (American Public Health Association *et al.* (1976). Twee kolonies van elk van bogenoemde twee membraanmedia is verwyder en vir toksienproduksie getoets.

TABEL 5-1. Klassifikasie van coliformorganismes volgens hul biochemiese reaksies

Tipe coliform-organisme	Laktose-galsout-medium		Indoolproduksie	Metielrooi-toets	Voges-Proskauertoets	Sitraatverbruik	Gelatienvervloeiing	H ₂ S-produksie
	48u 37°C	48u 44,5°C						
			48u 37°C	5dae 30°C	48u 30°C	96u 37°C	7dae 30°C	24u 37°C
<i>E. coli</i> I*	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> II	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> III	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. freundii</i> I	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>C. freundii</i> II	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>E. aerogenes</i> I	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. aerogenes</i> II	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	+	-	-	-	+	+	+	-
Irregular II	+	+	-	+	-	-	-	-
Irregular III	+	-	-	+	-	-	+	+
Irregular IV	+	-	-	+	-	+	+	-
Irregular V	+	-	-	-	+	-	-	-
Irregular VI	+	+	-	-	+	+	-	-
Irregular VII	+	-	+	-	-	+	-	-
Irregular VIII	+	-	-	-	-	-	-	-

*Slegs *E. coli* I kan indool produseer by 44,5°C

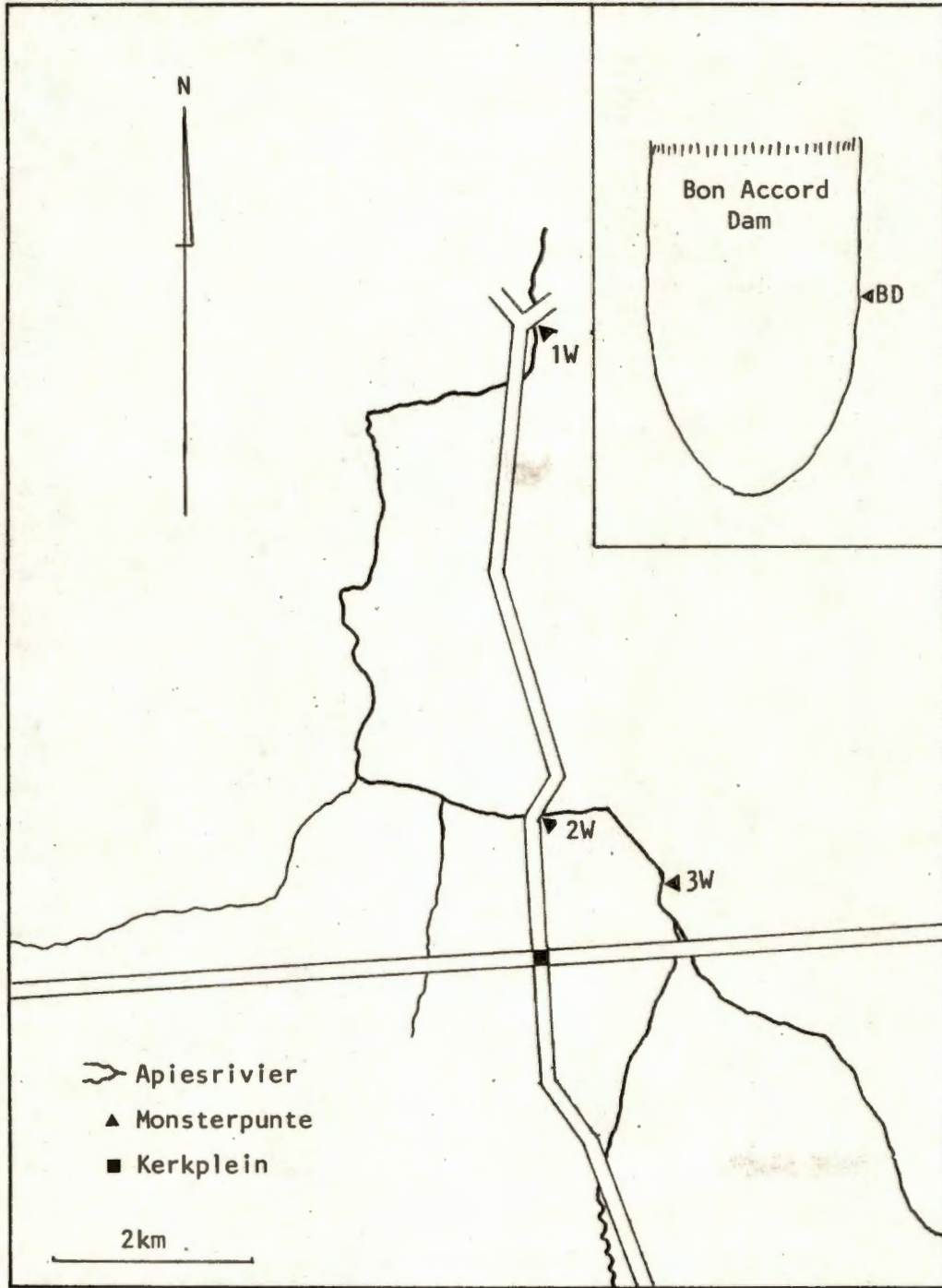
Dit was belangrik om vas te stel of die Tox⁺ organismes onder die omstandighede van bogenoemde coliform-isolasietegnieke die vermoë tot toksienproduksie behou. Om hierdie rede is die kolonies wat vanaf die twee tipes membraanmedia geïsoleer is elk gebruik om op die gewone manier vir toksienvorming te toets. Stabiliteit van die vermoë om toksien te vorm is verder getoets deur 'n lusvol van een van die MacConkeyperssopkulture wat positief gereageer het by 44,5°C direk in 4 ml BHI-sop te inokuleer vir toksienbereiding. 'n Verdere lusvol is gebruik om vars MacConkeyperssop te inokuleer en vir 24 uur by 44,5°C voort te kweek. Die res van die 37°C en 44,5°C positiewe MacConkeyperssopkulture is daarna gesentrifugeer en die boliggende vloeistof vir toksien aktiwiteit getoets. Die vars MacConkeyperssopkultuur is na 24 uur by 44,5°C presies soos hierbo behandel. Hierdie proses is elke 24 uur tot vierkeer herhaal. Daarna is 'n lusvol van die MacConkeyperssopkultuur op Heldergröengalsoutagar (HGG-agar) uitgestryk en by 37°C vir 24 uur voortgekweek. Een kolonie is hierna afgetel en op 'n vars HGG-agarplaat by 37°C vir 24 uur voortgekweek. Terselfdertyd is 'n porsie van die kolonie gebruik om toksien te berei en daarvoor te toets. Hierdie proses is vier keer agtereenvolgens herhaal.

5.5 Die bepaling van enterotoksigene fekale coliformorganismes in riool en water

Een riool- en 4 routwatermonsters, waarvan 3 uit die Apiesrivier en 1 uit die Bon Accord dam afkomstig was, is ondersoek. Die monsterpunte word by benadering in die meegaande skets aangedui (sien figuur 5-1). Die monsters is binne 1 uur na versameling volgens algemene voorskrifte verwerk (Windle-Taylor, 1958; Brand *et al.*, 1967; American Public Health Association *et al.*, 1976).

Die MF-metode soos hierbo beskryf is aangewend om fekale coliformorganismes kwantitatief uit riool en rouwater te isoleer. Herwinningsmembraansop en MacConkeymembraansop is as primêre isolasiemedia by 37°C vir 2 uur en 44,5°C vir 16 uur onderskeidelik gebruik.

Monsters is deeglik geskud voor die bereiding van 10⁻¹ tot 10⁻⁸ verdunnings in warm (37°C) soutoplossing. Een milliliter hoeveelhede van elke verdunning is soos hierbo in vyfvoud gefiltreer en voortgekweek. Membrane met ± 20 tot 150 kolonies is geselekteer vir verdere ondersoek.



Figuur 5-1. Monsterpunte op die Apiesrivier in Pretoria stadgebied en Bon Accorddam. Monsterpunt DP was by Daspoort rioolwerke (nie aangetoon).

Al vyf membrane uit die geselekteerde verdunning is gebruik om al die tipiese geel kolonies elk in 4 ml BHI-sop af te tel en soos vir toetsing vir ST te behandel. Net voor sentrifugering is 'n subkultuur van elk op BHI-agarskunsbodems gemaak waarvandaan te gelegenertyd LT preparate voorberei en getoets is. Weens die moontlikheid van inmenging deur bakterio-siene en/of bakteriofage (Ryder *et al.*, 1976) is elke kolonie afsonderlik getoets vir die vermoë om enterotoksien te vorm. Al die Tox⁺ isolate is volledig geïdentifiseer volgens die coliformreaksies hierbo sowel as met betrekking tot die biochemiese eienskappe volgens tabel 2-3.

5.6 Die bepaling en neutralisering van verhoogde intrasellulêre cAMP

Hierdie eienskap is volgens die metodes onder Hoofstuk 3 by een LT⁺ *E. coli* isolaat, 2W6 uit water, bepaal.

RESULTATE

5.7 Coliformgedrag van Tox⁺ *Enterobacteriaceae*

Die coliformgedrag van Tox⁺ *Enterobacteriaceae* wat uit gastroënteritis pasiënte geïsoleer is word in tabel 5-2 uiteengesit. Dit is hieruit duidelik dat almal behalwe *P. vulgaris* hulle soos coliformorganismes gedra het met betrekking tot die laktosegalsoutmedium by 37°C.

Die 44,5°C toets tref onderskeid tussen tipiese fekale *E. coli* I en ander coliforme (tabel 5-2). Dit is belangrik om in hierdie opsig daarop te let dat *E. coli* H12C, 'n potente produseerder van ST, soos 'n Irregular II gereageer het. Die gedrag van 4 van die *K. pneumoniae* stamme simuleer dié van Irregular VI. Hierteenoor is dit duidelik dat die *Enterobacter* spesies en 'n *K. pneumoniae* stam nie soos tipiese fekale organismes in die 44,5°C toets beide met betrekking tot die MacConkeymembraansop en *m*-FC-medium gereageer het nie (sien tabel 5-2).

Waar aanvanklik gehoop is dat die Mees Waarskynlike Getalmetode (MWG-metode) met MacConkeyperssop by 37°C of by 44,5°C (Brand *et al.*, 1967) aangepas sou kon word vir die skatting van toksienproduseerders

TABEL 5-2. Coliformgedrag van Tox⁺ *Enterobacteriaceae* uit gastroënteritis pasiënte

Stam kode	Mikroorganisme	Suur en gasproduksie in Laktose-galsout medium		MacConkeymembraan= sop	Indoolproduksie		Metielrooi toets	Voges-Proskaner= toets	Sitraatverbruik	Gelatienvervloeiing	H ₂ S-produksie	m-FC-medium	Klassifikasie as coliform
		48u 37°C	48u 44,5°C		48u 37°C	24u 44,5°C							
H2E	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H11R	<i>E. aerogenes</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>E. aerogenes</i> I
H12C	<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	Irregular II
H13B	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H14A	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	Irregular VI
H16H	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H18D	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H20A	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H22L	<i>E. cloacae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>E. cloacae</i>
H23M	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	Irregular VI
H24D	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H26B	<i>E. cloacae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>E. cloacae</i>
H29P	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>E. aerogenes</i> I
H330	<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	<i>P. vulgaris</i>
H36A	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H36P	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H37T	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	Irregular VI
H38J	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I
H38N	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	Irregular VI
H39E	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i> I

was die resultate teleurstellend. Alle pogings om die toksiene in die boliggendevloeistof van MacConkeyperssokulture aan te dui het misluk. Bepalings van die pH van hierdie kulture het gewissel tussen 4,1 en 5,6. Dit is bekend dat labiele toksien gevoelig is vir 'n lae pH en dat die aktiwiteit reeds begin afneem onder pH7,5 (So *et al.*, 1974; Mundell *et al.*, 1976). Stabiele toksien kan suur toestande so laag as pH1 weerstaan (Jacks en Wu, 1974; So *et al.*, 1974; Klipstein en Engert 1976a en b). Die samestelling van die medium sowel as die toestande vir kweking beïnvloed egter ook die produksie van enterotoksien (Gianella, 1976; Mundell *et al.*, 1976; Alderete en Robertson, 1977a en b). Bogenoemde aspekte bied dus moontlike verklarings vir die afwesigheid van enterotoksien.

Die voortkweking van Tox^+ organismes vir vele generasies onder die omstandighede wat vir die isolasie van coliforme gebruik word kon nie een van die organismes van die vermoë om toksien te produseer bevry nie. Hierdie bevinding bevestig die getuienis dat bakterieë tot dusver nog nie van Ent bevry kon word nie (Smith en Halls 1968; Smith en Linggood, 1971; Mitchell en Kenworthy, 1977). Dit het verder die belangrike aanduiding gegee dat die membraanfiltermetode by $44,5^{\circ}C$ as 'n selektiewe tegniek vir die bepaling van tipiese fekale bakterieë ook vir Tox^+ *E. coli* aangewend kan word.

5.8 Die voorkoms van Tox^+ *E. coli* en *K. pneumoniae* in riool en water

Die voorkoms van enterotoksigene *E. coli* in riool en water word in tabel 5-3 uiteengesit. 'n Totaal van 1282 isolate is individueel vir die vermoë om LT en of ST te produseer ondersoek. Twee en twintig isolate afkomstig uit 3 van die vyf monsters het LT produserende organismes opgelewer. Twee hiervan was *K. pneumoniae*. Geen isolaat is gevind wat ST produseer nie (sien tabel 5-3). Die 22 LT^+ stamme voldoen elk aan die tipiese coliformreaksies soos hierbo bespreek en is bevestig volgens die kriteria in tabel 2-3.

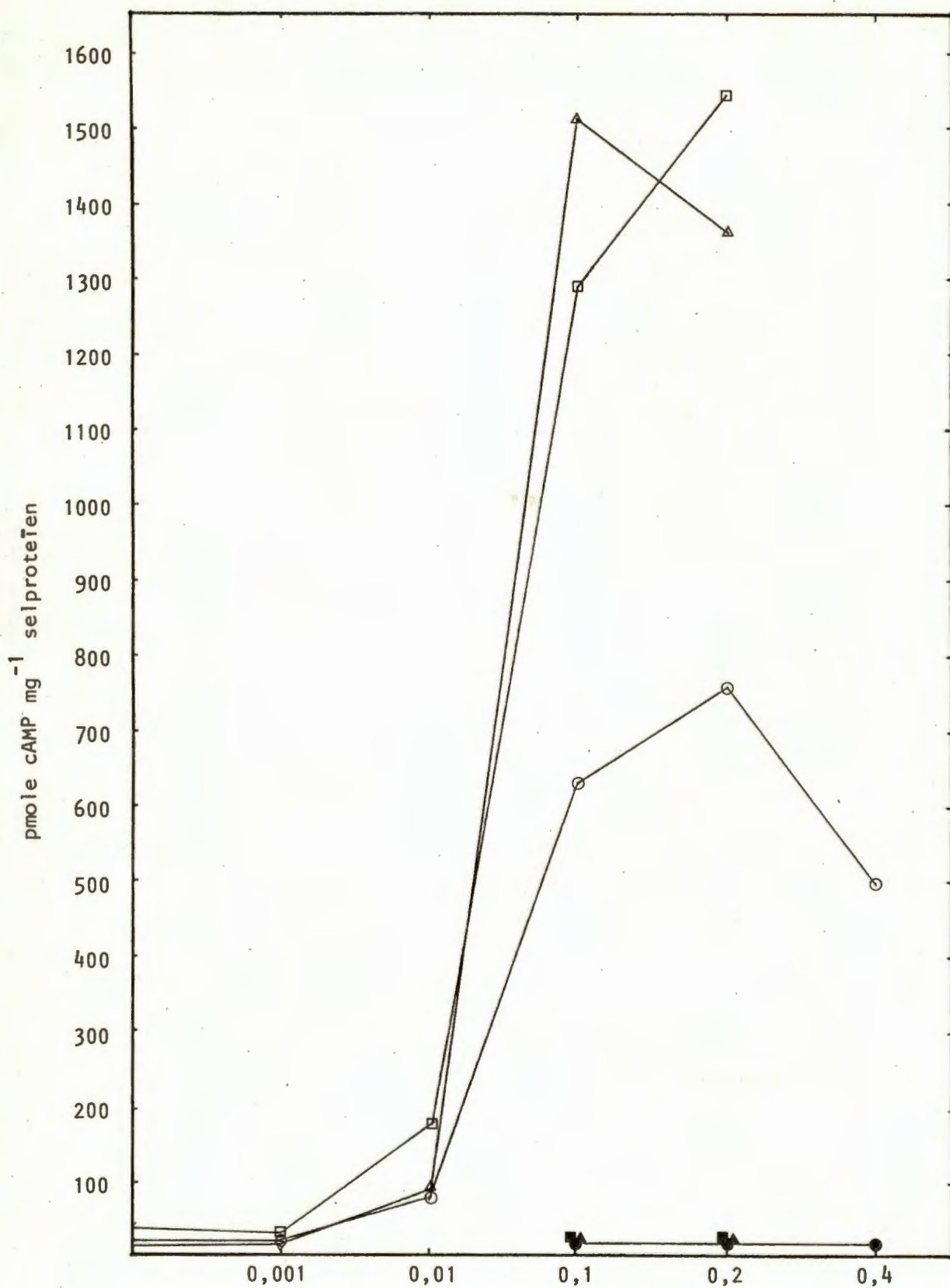
TABEL 5-3. Die voorkoms van LT⁺ *E. coli* en *K. pneumoniae* in riool en water

Monsterpunte	<i>E. coli</i> I telling ml ⁻¹ *	Aantal kolonies getoets vir LT en ST	Aantal <i>E. coli</i> LT ⁺	<i>E. coli</i> I LT ⁺ ml ⁻¹	% <i>E. coli</i> I LT ⁺	Aantal <i>K. pneumoniae</i> LT ⁺	<i>K. pneumoniae</i> LT ⁺ ml ⁻¹	% <i>K. pneumoniae</i> LT ⁺
DP	131000	631	7	1400	1,07	0	0	0,0
1W	3300	156	0	0	0,0	0	0	0,0
2W	52000	251	11	2200	4,23	2	400	0,77
3W	3100	147	0	0	0,0	0	0	0,0
BD**	10700	97	2	1100	10,28	0	0	0,0

* Alle tellings behalwe Tox⁺ *E. coli* en *K. pneumoniae* verteenwoordig veronderstelde *E. coli* I

** Die LT⁺ telling ml⁻¹ en die %LT⁺ is deur berekening gevind.

Volgens tabel 5-3 word die voorkoms en verhouding van LT⁺ organismes tot die veronderstelde *E. coli* I aangedui. Alhoewel die metode daarop gerig was om Tox⁺ *E. coli* I as die grootste moontlikheid te isoleer, is daar ook twee Tox⁺ *K. pneumoniae* stamme geïsoleer. Deur al die geel kolonies van die vyf membrane uit die gekose verdunning te ondersoek is die kans verhoog om Tox⁺ organismes te vind. Kolonies is direk van membrane in 4 ml BHI-sop geïnkubeer en soos vir ST behandel. In alle gevalle is egter bevind dat 'n klein persentasie nie wou groei nie. By monsterpunt BD is slegs 97 kolonies afkomstig van een membraan ondersoek. Die tellings soos in tabel 5-3 aangedui is in dié geval deur berekening gevind.



Labele toksien fraksies en choleraegen 100-1 ng ml⁻¹.

Figuur 5-2. Induksie en neutralisasie van cAMP :
E. coli (LT) 2W6 ○-○, geneutraliseer ●-●;
E. coli B7A △-△, geneutraliseer ▲-▲;
 choleraegen □-□, geneutraliseer ■-■.

5.9 Cholera-geenagtige aard van *E. coli* 2W6 Labiele toksien

Stimulering van intrasellulêre cAMP by CHO-K1 selle en die neutralisering daarvan deur antiserum teen cholera-geen is by *E. coli* 2W6 ondersoek. Die resultate hiervan verskyn in figuur 5-2. Die verwantskap met cholera-geen word aangedui deur die neutralisering van die vermoë om cAMP te induseer. In hierdie verband toon *E. coli* 2W6 uit water dus potensiële enteropatogene vermoëns wat met LT produserende *E. coli* stamme uit suigelingsgastroënteritis vergelyk kan word (sien Hoofstuk 3).

BESPREKING

5.10 Die voorkoms en belang van Tox⁺ *Enterobacteriaceae* in riool en water

Die teenwoordigheid van enterotoksigene bakterieë in betekenisvolle getalle in riool en rouwater skep nuwe gesondheidsgevaar. By implikasie is dit 'n moontlike bron van infeksie in die etiologie van gastroënteritis. Aanbevole standaarde vir die wegdoen van riool in strome, riviere en die brandersone naby baai-plekke laat byvoorbeeld 'n telling van 1000 *E. coli* I per 100 ml toe (Livingstone, 1969; Smith, 1969). Gebaseer op die verhouding van LT⁺ *E. coli* (1,07%) tot *E. coli* I in riool volgens die huidige studie (tabel 5-3) kan teoreties 10,7/100 ml hoogs toksiese LT produserende *E. coli* volgens bogenoemde standaarde teenwoordig wees (sien tabel 5-3). Indien 'n toevallige inname van 10 ml tydens baai plaasvind (Wolf, 1972) impliseer dit dat 'n individu een hoogs toksiese LT⁺ *E. coli* inneem tydens elke toevallige inname. Volgens Grabow *et al.* (1974) word soveel as 10 coliforme per 100 ml drinkwater toegelaat. Die vloeistof inname van 'n mens is ongeveer 1400 ml per dag (Guyton, 1971). As aangeneem word dat sowat 1000 ml hiervan drinkwater met 10 coliforme per 100 ml afkomstig van riool is, kan daar een LT produserende organisme op hierdie wyse per dag ingeneem word. Daar is geen rede om te glo dat klein innames van LT⁺ bakterieë nie die dermkanaal tydelik of permanent kan koloniseer nie. Minstens is dit bekend dat slegs

10 *Shigella dysenteriae* organismes disenterie kan verwek (Gangarosa, Bennett, Wyatt, Pierce, Olarte, Hernandez, Vazquez en Bessudo, 1972). Daarbenewens kan klein getalle R^+ bakterieë (Cooke, Shooter, Kumar, Rousseau en Foulkes, 1970; Hettiaratchy, Cooke en Shooter, 1973) en entero=patogene *E. coli* (Cantey en Blake, 1977) die dermkanaal koloniseer.

Dit is dan ook belangrik om daarop te let dat die verhouding van LT^+ *E. coli* tot *E. coli I* in die Apiesrivier + 4 keer, en die uit die Bon Accord dam + 10 keer, hoër as dié van riool is waarop bogenoemde argument baseer word. Die vermoë tot hoëvlak stimulering van cAMP deur *E. coli* 2W6 uit die Apiesrivier illustreer die potensiële enteropatogene vermoëns van hierdie organismes. Die watergedraagde aard van 'n omvangryke gastroënteritis epidemie, waarby 'n ST + LT produserende *E. coli* onomwonde geïnkrimineer is (Rosenberg, *et al.*, 1977), moet as ondersteuning vir bogenoemde hipotese gesien word. In hierdie verband is dit ook interessant om daarop te let dat slegs een van die suigelingpasiënte uit die onderhawige ondersoek uitsluitlik op borsvoeding toegewys was (tabel 2-1).

Ingestie van bakterieë wat R faktore huisves kan daartoe lei dat die normale dermflora hierdie kenmerk erf en dan as 'n reservoir vir die verspreiding van R-faktore na ander organismes optree (Gardner en Smith, 1969; Watanabe, 1971). Getuienis vir 'n soortgelyke toestand by Ent is reeds gelewer (Wachsmuth *et al.*, 1976). Die teenwoordigheid van R^+ bakterieë in rioolafvloeiels is deur verskeie navorsers nagegaan. Uit Amerika is aangedui dat 0,5-1,0% van die coliforme in riool R faktore huisves (Sturtevant en Feary, 1969; Sturtevant, Cassell en Feary, 1971) terwyl dit in Brittanje so hoog as 31% bevind is (Smith, 1970). In Suid-Afrika is 'n voorkoms van 4% gerapporteer terwyl dit in die uitvloeiels van 'n hospitaal so hoog as 26% was (Grabow en Prozesky, 1973). Die persentasie R^+ bakterieë neem ook toe in verouderings damme tydens die konvensionele behandeling van riool (Grabow, Middendorff en Prozesky, 1973). Die beskikbare informasie dui dan ook daarop dat meer gevorderde suiweringsprosesse nodig is om R^+ bakterieë te verwyder om veilige waterbronne te verseker (Grabow, Prozesky en Smith, 1974). Reeds in terme van hierdie bevindinge word daar om 'n herevaluering van kwaliteit=

standaarde vir water gepleit (Grabow *et al.*, 1974). Smith en Halls (1968) het aangetoon dat Ent na nader *E. coli* stamme sowel as na *S. typhimurium* en *S. choleraesuis* deur konjugasie oorgedra kan word. Soortgelyk kon die oordrag van ST sowel as ST + LT na ander *E. coli* stamme tydens die huidige studie bewerkstellig word (Hoofstuk 4). Toksiensintese is dikwels plasmied gemedieerd (sien Hoofstuk 4). Plasmiede verleen ongekende patogene potensiaal aan mikroorganismes (So *et al.*, 1974). Een organisme mag byvoorbeeld 'n aantal van dieselfde of 'n verskeidenheid verskillende R faktore huisves wat 'n toename in die spektrum en vlak van bestandheid mag meebring (Farrar, Eidson, Guerry, Falkow, Drusin en Roberts, 1972; Van Rensburg, 1972). Dit kan ook bestandheid teen ultraviolet lig (Marsh en Smith, 1969; Siccardi, 1969), kwik, nikkel en kobalt (Smith, 1967; Summers en Silver, 1972), kolisiene (Siccardi, 1966) en bakteriofage verleen (Takano, Watanabe en Fukasawa, 1968). Die oordrag van hierdie plasmiede deur konjugasie kan binne 1 minuut geskied (Watanabe, 1963) en versprei vinnig onder die bakterieë (Datta, 1965; Richmond, 1972). R faktore is ook onderling oordraagbaar tussen *Enterobacteriaceae* en ander organismes soos *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* en *Yersinia* spesies en *Vibrio cholerae* (Aoki, Egusa, Ogata en Watanabe, 1971; Bryan, Van den Elzen en Tseng, 1972; Chatterjee en Starr, 1972; Datta en Hetges, 1972; Yokota, Kasuga, Kaneko en Kuwahara, 1972).

As hierby in gedagte gehou word dat rekombinant plasmiede tussen R faktore en Ent moontlik is (So *et al.*, 1976), is die implikasies gesien in die lig van die voorafgaande bespreking verreikend. Dit mag dan ook hier in gedagte gehou word dat *E. coli* stam H36A 'n R faktor wat veelvuldige bestandheid verleen, sowel as 'n Ent plasmied wat die sintese van ST + LT bepaal, huisves. Hierdie twee genetiese elemente word saam teen 'n hoë frekwensie na ander *E. coli* stamme oorgedra (sien Hoofstuk 4).

Reeds is daar aanduidings dat ander genera die vermoë om enterotoksiene te produseer besit en kon *K. pneumoniae* selfs tydens hierdie studie uit rouwater geïsoleer word (sien tabel 5-3).

Enterobacteriaceae waarby enterotoksiene onder inkriminerende enteropatogene omstandighede uit gastroënteritis getsoleer is sluit onder andere die volgende in : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* en *Serratia* (sien Hoofstuk 1). Uit die huidige studie is 4 genera, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* en *Proteus* betrek waarvan die eerste twee ook uit water getsoleer is. In die lig van die voorafgaande bespreking is dit duidelik dat die status en belang van indikator organismes herevalueer behoort te word.

5.11 Die status en belang van indikatororganismes as kwaliteitstandaarde van water

Die belangrike rol wat watergedraagde ingewandssiektes by die mens speel is welbekend (Windle-Taylor, 1958; American Public Health Association *et al.*, 1976). Kwaliteitsbeheer van water vir menslike gebruik is dus noodsaaklik. Patogene organismes kom egter meestal in klein getalle, indien enigsins, in die normale dermkanaal of daarbuite voor. Terselfdertyd is tegnieke vir die isolasie van ingewandspatogene organismes en veral van virusse uit water omslagtig en dikwels onsuksesvol (American Public Health Association *et al.*, 1976). Die gebruik van die tipiese fekale organisme *E. coli I* as 'n indikator van definitiewe resente fekale besoedeling het dan ook gevloei uit die mens se behoefte aan higiëniese water- en voedselbronne (Windle-Taylor, 1958; American Public Health Association *et al.*, 1976; Drion en Mossel, 1977). Aanvullende indikatororganismes waaronder die coliformgroep, *Staphylococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Proteus* spesies, *Pseudomonas aeruginosa* en bakteriofage kan waardevolle bykomstige besoedelingsinformatie verskaf (Windle-Taylor, 1958; Brand *et al.*, 1967; Livingstone, 1969, 1976; Greeff, 1972; American Public Health Association, 1976). Alhoewel daar geen twyfel oor die fekale oorsprong van *E. coli I* bestaan nie is daar belangrike interpretasieverskille met betrekking tot die betekenis van die coliformgroep as geheel, tussen die Amerikaanse praktyk aan die eenkant en dié van die Brits-Europese-Suid-Afrikaanse aan die anderkant (Windle-Taylor, 1958; American Public Health Association *et al.*, 1976; World Health Organization 1963; Brand *et al.*, 1967; Livingstone, 1969).

Gesien in die lig van bogenoemde aspekte impliseer die resultate uit hierdie studie 'n nuwe dimensie tot die sentrale filosofie van indikatororganismes en verbreed dit die insig aangaande die etiologie van gastroënteritis. Die teenwoordigheid van 'n choleraageenagtige toksien by 'n verskeidenheid spesies behorende tot die *Enterobacteriaceae* verseker dat hierdie organismes nie langer slegs as skadelose indikatore van fekale besoedeling beskou kan word nie. Die coliformgedrag van Tox⁺ organismes uit hierdie studie dui welliswaar daarop dat die meeste *E. coli* stamme as tipiese fekale organismes beskou sal word. Nietemin simuleer die gedrag van een *E. coli* ST positiewe stam, H12C, dié van Irregular II wat van twyfelagtige oorsprong is maar wel as 'n moontlike indikatororganisme beskou word (Brand *et al.*, 1967; Livingstone, 1969). *Proteus* organismes word nie deur die roetine tegnieke vir die bepaling van coliforms geïsoleer nie. Dit word eerder as 'n indikator van organiese materiaal met beperkte betekenis vir fekale besoedeling beskou (Brand *et al.*, 1967; Greeff, 1972).

As gevolg van die assosiasie van die genus *Klebsiella* met die ou genus *Aerobacter* (*Enterobacter*) is dit moeilik om die vroeëre literatuur oor die voorkoms en belangrikheid van *Klebsiella* te interpreteer. Alhoewel die meeste *K. pneumoniae* stamme uit hierdie ondersoek tipiese fekale coliformgedrag toon sou dit volgens hulle reaksies in tabel 5-2 as Irregular VI geklassifiseer word. Volgens Brand *et al.* (1967) en Livingstone (1969) is die Brits-Europese-Suid-Afrikaanse ondervinding dat Irregular VI hoofsaaklik van vesels soos jute afkomstig is. Dit is in die verlede as 'n twyfelagtige indikator van fekale besoedeling beskou. Ontwikkelinge in die taksonomie van die groep het gelei tot die daarstelling van in nuwe genus, *Enterobacter* wat onder andere *E. aerogenes* en *E. cloacae* insluit (Edwards en Ewing, 1972). Laasgenoemde organismes is in die verlede beskou as hoofsaaklik afkomstig van plantmateriaal en moontlik aanduidend van ou fekale besoedeling (Brand *et al.*, 1967; Livingstone, 1969). Die rol van hierdie organismes as ingewandspatogene het egter gedurende die afgelope aantal jare duideliker geword. *Klebsiella pneumoniae* en *Enterobacter cloacae* is onder hoogs inkriminerende omstandighede uit kinders en volwassenes met akute diarree geïsoleer (Olarite *et al.*, 1961; Kean, 1963; Gorbach, 1971; Chakraborty en Shah, 1972; Klipstein *et al.*,

1973). Die demonstrasie van ST (Klipstein *et al.*, 1973; Klipstein en Engert, 1975, 1976a en b) en LT (Guerrant *et al.*, 1975) by hierdie organismes sowel as by *E. aerogenes* (Greeff, 1977, 1978a en b; Greeff *et al.*, 1977) verleen nou konkrete bewyse vir hul enteropatogene vermoë (sien ook Hoofstuk 3).

Klebsiella pneumoniae vorm deel van die normale dermflora by sowat 30-40% van mense en diere (Buttiaux, 1959; Davis en Matsen, 1974). Die gedrag van baie isolate van hierdie organismes uit 'n groot verskeidenheid bronne is dan ook inderwaarheid soos die van tipiese fekale coliforme gerapporteer. Die bevinding dat 85% van bekende patogene *K. pneumoniae* stamme, in teenstelling met slegs 16% van omgewingsisolate, tipiese fekale coliformgedrag openbaar is baie betekenisvol (Dufour en Cabelli, 1976; Bagley en Seidler, 1977). Terselfdertyd is bevind dat 93% van kliniese *E. coli* stamme en 85% van omgewingsisolate, fekale coliform reaksies (m-FC-medium, 44,5°C), ononderskeidbaar van *K. pneumoniae* teweegbring (Bagley en Seidler, 1977). Die isolasie van Tox⁺ *K. pneumoniae* stamme met tipiese fekale coliformgedrag uit water sowel as 'n aantal uit suigeling met akute sporadiese gastroënteritis tydens die onderhawige studie hou in hierdie verband belangrike implikasies in. Minstens verstewig dit die argument vir gelykwaardige status van fekale coliformpositiewe *K. pneumoniae* met *E. coli* (Bagley en Seidler, 1977). Die aanwesigheid van fekale coliformpositiewe *K. pneumoniae* mag in die afwesigheid van *E. coli* aanduidend wees van fekale besoedeling van resente of van vroeëre oorsprong (Bagley en Seidler, 1977). Hierdie benadering impliseer die afwesigheid van klassieke enteropatogene organismes maar inkrimineer *K. pneumoniae* as sulks as patogene organisme. Tewens met die huidige stand van kennis aangaande die patogene vermoëns en genetiese aanpasbaarheid van *Enterobacteriaceae* is dit nie onvanpas om hierdie benadering tot die ander lede van hierdie familie te verbreed nie. Die gebruik van 'n *Enterobacteriaceae* toets vind reeds goeie inslag by die kwaliteitskontrole van voedsel (Drion en Mossel, 1977).

5.12 Gevolgtrekkings

Die isolasie van Tox⁺ *E. coli* en *K. pneumoniae* uit riool en water mag 'n aanduiding wees dat dit as 'n belangrike bron van infeksie in die etiologie van gastroënteritis optree. Indien wel bestaan daar heelwat getuienis vir 'n herevaluering van kwaliteitstandaarde van water en die toepassing daarvan.

Die tradisionele indirekte gebruik van indikator organismes om die aanwesigheid van klassieke enteropatogene organismes aan te dui mag onvoldoende beskerming teen ingewandsiektes bied. Die enteropatogene vermoëns van sogenaamde onskadelike indikator organismes as sulks impliseer 'n aanpassing van veiligheidstandaarde vir water vir menslike gebruik.

6. OPSOMMING

Die bevindings uit hierdie ondersoek dui daarop dat 'n verskeidenheid mikroorganismes, dikwels met mekaar geassosieer, as oorsake van suigelingsgastroënteritis getinkrimineer kan word. Enterotoksien=produserende lede van die *Enterobacteriaceae* en rotavirus is as die belangrikste nuwe groepe enteropatogene organismes uitgewys. Enteropatogene serotipes van *E. coli*, *Salmonella* en *Shigella* spesies, *Candida* spesies, *P. aeruginosa*, *B. cereus* en hemolitiese *E. coli* is ook getsoleer. Enterotoksigene bakterieë is egter meer dikwels as ander organismes as die enigste moontlike oorsake getsoleer.

Al die moontlike kombinasies van toksienvorming is by *E. coli* gedemonstreer. Slegs labiele toksiene word deur *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* en *P. vulgaris* afgeskei. Die labiele toksiene van die verskillende genera vertoon 'n hoë mate van verwantskap met choleraegeen. Diarree word waarskynlik op 'n wyse soortgelyk aan dié van choleraegeen geïnduseer. Die plasmied gemedieerde aard van ST en ST + LT sintese is konjugeerbaar, soms gesamentlik met antibiotiese bestandheidsbepalers, na nie-enteropatogene *E. coli* K12. Diagnostiese en terapeutiese probleme word hierdeur veroorsaak.

Sommige toksigene *Enterobacteriaceae* gedra hul nie as tipiese fekale coliforme nie. Dit, tesame met die betekenisvolle voorkoms van *E. coli* (LT) en *K. pneumoniae* (LT) in riool en water, impliseer 'n moontlike bron van infeksie. 'n Herevaluering van die status van indikatororganismes en kwaliteit standarde van water vir menslike gebruik word bepleit.

7. DANKBETUIGING

Die skrywer betuig graag sy waardering teenoor die volgende persone vir hul aandeel in die totstandkoming van hierdie proëfskrif :

Prof D van Eeden vir sy gewaardeerde leiding en advies by die samestelling van die proëfskrif.

Proff. O W Prozesky en J N Coetzee van die Departement Mikrobiologie, Fakulteit Geneeskunde, Universiteit van Pretoria, waar hierdie ondersoek uitgevoer is, vir hul inspirerende wenke en gewaardeerde besprekings oor talle aspekte van die etiologie van suigelings= gastroënteritis.

Dr W Coetzee van die Mediese Navorsingsraad se Eenheid vir Mikrobiëse Genetika vir sy advies en behulpsaamheid met die isolering van ekstrachromosomale DNA.

Dr J D Nel vir sy behulpsaamheid met die komplementbindingsproewe by sommige pasiënte.

Dr G Lecatsas vir die elektronmikroskopiese identifikasie van rotavirus.

Dr I T Hay en Prof J G Prinsloo van die Departement Pediatrie, Kalafong Hospitaal, Universiteit van Pretoria, vir die kliniese diagnose en monsterneming by pasiënte en kontroles.

Die skrywer se kollegas van die Departement Mikrobiologie, Fakulteit Geneeskunde, Universiteit van Pretoria, vir hul gewaardeerde gedagtewisselings.

Mej H van der Walt vir haar tegniese bystand teen die einde van hierdie ondersoek.

Die skrywer se eggenote en gesin vir hul steun.

Die skrywer se ouers vir hul steun en finansiële bystand.

Mev C Thompson vir die tik van die manuskrip.

8. AANHANGSEL

8.1 Media

Behalwe waar anders aangedui is, is gedehidreerde produkte van Difco gebruik. Dit is berei volgens die voorskrifte van die vervaardiger en aangewend volgens Edwards en Ewing (1972), Cowan en Steel (1974) en Rippon (1974).

8.1.1 Bloedagar

Bloedagarbasis (Difco) is hersaamgestel en gesteriliseer volgens die vervaardiger, afgekoel tot 45°C , waarna $\pm 4\%$ gedefibrineerde perdebloed bygevoeg is. Wanneer bloedagar met kanamisien benodig is, is $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamisien, saam met die bloed bygevoeg. Plate en skuinsbodems is dan gegiet. Columbia-agar (Oxoid) is soortgelyk as basis vir 4% skaapbloed gebruik.

8.1.2 M9 minimale medium

Die volgende basis in driekeer gedistilleerde water is gebruik : $0,12 \text{ M Tris}$, $0,08 \text{ M NaCl}$, $0,02 \text{ M KCl}$, $0,001 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, $0,02 \text{ M NH}_4\text{Cl}$, $0,001 \text{ M MgCl}_2$, $0,0002 \text{ M CaCl}_2$, $0,02 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$, $0,2\%$ Kasaminosure (Difco), $0,5\%$ glukose, pH 7,5. Wanneer 'n soliede medium benodig is, is $1,0\%$ agar bygevoeg. Die medium is onder stoom vir 2 uur gesteriliseer.

8.2 Weefselkweking

8.2.1 Selkweekmedia

Die volgende gedehidreerde produkte van Gibco is volgens die voorskrifte van die vervaardiger hersaamgestel : F12-medium, F10-medium en MEM-medium. Fetale kalfserum en beesserum was ook van Gibco. Antibiotika (Gibco) is in 'n finale konsentrasie as volg gebruik : penisillien 100e ml^{-1} , streptomisien $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ en fungizone $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Die pH is op 7,3 ingestel waarna die volledige medium deur filtrasie gesteriliseer is.

8.2.2 Gliserolvriesmengsel

Weefsel selle is in 2 ml hoeveelhede van die volgende vriesmengsel by -70°C geberg :

36 ml dubbelsterkte F12 medium, 50 ml fetale kalfserum,
13 ml gliserol, 1 ml antibiotika om 'n finale konsentrasie van 100e ml^{-1} penisillien, $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomisien en $0,25\ \mu\text{g ml}^{-1}$ fugizone te gee. Die pH is op 7,3 ingestel waarna die volledige medium deur filtrasie gesteriliseer is.

8.3 Oplossings

8.3.1 Alseveroplossing

Skaapbloed is in die volgende oplossing versamel :

dekstrose, 20,5 gm; natriumsitraat, 8,0 gm; sitroensuur, 0,55 gm; NaCl, 4,20; gedistilleerde water 1 liter.

8.3.2 Tripsienoplossing (ATV)

Weefsel selle is met die volgende oplossing getripsineer :

NaCl, 8,0 gm; KCl, 4,0 gm; dekstrose, 10,0 gm; NaHCO_3 , 5,8 gm; tripsien, 5,0 gm; EDTA, 2,0 gm; gedistilleerde water, 1 liter; pH 7,6. Die oplossing is deur filtrasie gesteriliseer.

8.3.3 Fosfaat gebufferde soutoplossing (FBS)

Die gedehidreerde FTA-buffer van BBL is volgens die voorskrifte van die vervaardigers hersaamgestel en deur filtrasie gesteriliseer.

8.3.4 Hank se geballanseerde soutoplossing

Die gedehidreerde produk van Gibco is volgens die voorskrifte van die vervaardiger hersaamgestel en deur filtrasie gesteriliseer.

8.3.5 Versene gebufferde soutoplossing (VBS)

Die volgende oplossing is berei :

NaCl, 41,90 gm; NaHCO_3 , 1,26 gm; natriumbarbitol, 1,50 gm;
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,50 gm; CaCl_2 , 0,0755 gm; barbitol, 2,30 gm;
 gedistilleerde water, 1 liter. Dit is in die verhouding van
 1:4 in gedistilleerde water verdun en as verdunningsmiddel
 aangewend.

8.3.6 Bouinoplossing

Hela selle is in die volgende oplossing gefikseer :

pikriensuur (1,2%), 750 ml; formalien (40%), 250 ml;
 ysasynsuur, 50 ml.

8.3.7 Sintilasievloeistof

Isotooptellings is in die volgende oplosmiddel bepaal :

4 gm PPO, 500 gm POPOP, 675 ml toluene, triton X-100 om
 1 liter te maak.

8.4 Kleurstowwe

Giemsa-kleuring van Hela selle is met die volgende kleurmiddels uitgevoer :

hematoksilien, 10 gm; kaliumaluin, 15 gm; etanol (95%), 500 ml;
 gliserien, 500 ml, asynsuur, 50 ml; gedistilleerde water 500 ml.
 Eosien is as 'n 1% oplossing in water gebruik.

8.5 Chemikalieë

Met die uitsondering van die volgende is Merck produkte deurgaans
 gebruik :

Brij 58. Servo Feinbiochemica, Heidelberg.

Triton X-100. Rohm en Haas, Johannesburg.

Die volgende is van Radiochemical Centre, Amersham, Engeland, verkry :

[6- ^3H] timidien (29,4 Ci/mmol).

[8- ^3H] adenosien - 3',5'-sikliese monofosfaat (20,000-30,000 mCi/mmol).

adenosien - 3',5'- sikliese monofosfaat.

Bindingsproteïen.

Geaktiveerde houtskool.

8.6 Antibiotika

Streptomisien. Novo Industries, Johannesburg.

Nalidiksiksiur. Winthrop Laboratories, Mobeni.

Kanamisien. Bristol Meyers, Johannesburg.

9. LITERATUURVERWYSINGS

- AL-AWQATI, Q., WALLACE, C.K. & GREENOUGH, W.B. (1972). Stimulation of intestinal secretion in vitro by culture filtrates of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 125, 300.
- ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. (1977a). Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*: Defined medium for production of heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 15, 781.
- ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. (1977b). Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 17, 629.
- ALLWEISS, B., DOSTAL, J., CAREY, K.E., EDWARDS, T.F. & FRETER, R. (1977). The role of chemotaxis in the ecology of bacterial pathogens of mucosal surfaces. *Nature, London* 266, 448.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION (1976). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 14th edition. New York, American Public Health Association, Inc.
- ANDERSON, E.S. (1965). A rapid screening test for transfer factors in drug-sensitive *Enterobacteriaceae*. *Nature, London* 208, 1016.
- ANDERSON, E.S. & LEWIS, M.J. (1965a). Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. *Nature, London* 208, 843.
- ANDERSON, E.S. & LEWIS, M.J. (1965b). Drug resistance and its transfer in *Salmonella typhimurium*. *Nature, London* 206, 579.
- AOKI, T., EGUSA, S., OGATA, Y. & WATANABE, T. (1971). Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. *J. gen. Microbiol.*, 65, 343.
- ARBUCKLE, J.B.R. (1970). The Location of *Escherichia coli* in the pig intestine. *J. Med. Microbiol.*, 3, 333.
- BAGLEY, S.T. & SEIDLER, R.J. (1977). Significance of fecal coliform-positive *Klebsiella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1141.
- BANWELL, J.G., PIERCE, N.F., MITRA, R., CARANASOS, G.J., KEIMOWITZ, R.I., MONDAL, A. & MANJI, P.M. (1968). Preliminary results of a study of small intestinal water and solute movement in acute and convalescent human cholera. *Ind. J. Med. Res.*, 56, 633.
- BARKSDALE, W.L. & PAPPENHEIMER, A.M. (1954). Phage-host relationships in non-toxigenic and toxigenic diphtheria bacilli. *J. Bacteriol.*, 67, 220.

- BASU MALLIK, K.C. & GANGULI, N.C. (1964). Some observations on the pathogenesis of cholera. *Ind. J. Med. Res.*, 52, 894.
- BENNETT, V. & CUATRECASAS, P. (1975). Mechanism of activation of adenylate cyclase by *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Membrane Biol.*, 22, 29.
- BENNETT, P.M. & RICHMOND, M.H. (1976). Translocation of a discrete piece of deoxyribonucleic acid carrying an *amp* gene between replicons in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 126, 1.
- BERGDOLL, M.S. (1972). The enterotoxins. In *The Staphylococci*. Edited by J.O. Cohen. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- BERKENBILE, F. & DELANEY, R. (1976). Stimulation of adenylate cyclase by *Vibrio cholerae* toxin and its active subunit. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 82.
- BERTSCHINGER, H.U., MOON, H.W. & WHIPP, S.C. (1972). Association of *Escherichia coli* with the small intestinal epithelium. I. Comparison of enteropathogenic and non-enteropathogenic porcine strains in pigs. *Infect. Immun.*, 5, 595.
- BISHOP, R.F., BARNES, G.L. & TOWNLEY, R.R.W. (1974). Microbial flora of stomach and small intestine in infantile gastroenteritis. *Acta Paediatr. Scand.*, 63, 418.
- BISHOP, R.F., DAVIDSON, G.P., HOLMES, I.H. & RUCK, B.J. (1973a). Evidence for viral gastroenteritis. *New Engl. J. Med.*, 289, 1096.
- BISHOP, R.F., DAVIDSON, G.P., HOLMES, I.H. & RUCK, B.J. (1973b). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2, 1281.
- BRAND, P.A.J., KEMP, P.H., PRETORIUS, S.J. & SCOONBEE, H.J. (1967). *Water quality and abatement of pollution in Natal rivers. Part I. Objectives of river surveys, description of methods used and discussion of water quality criteria.* Natal Town and Regional Planning Report, Volume 13. Pietermaritzburg, Natal Dorps- en Streeksbeplanningskommissie.
- BRAY, J. (1945). Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli Neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J. Path. Bacteriol.*, 57, 239.
- BRYAN, L.E., VAN DEN ELZEN, H.M. & TSENG, J.T. (1972). Transferable drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Ag. Chemoth.*, 1, 22.
- BUTTIAUX, R. (1959). The value of the association *Escherichia* - group A streptococci in the diagnosis of contaminated foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 22, 153.
- BYWATER, R.J. (1972). Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 5, 337.

- CANTEY, J.R. & BLAKE, R.K. (1977). Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit : a novel mechanism. *J. Infect. Dis.*, 135, 454.
- CARPENTER, C.C.J. (1972). Cholera and other enterotoxin-related diarrheal diseases. *J. Infect. Dis.*, 126, 551.
- CARPENTER, C.C.J. & GREENOUGH, W.B. (1968). Response of the canine duodenum to intraluminal challenge with cholera exotoxin. *J. Clin. Invest.*, 47, 2600.
- CARTER, P.B. (1975). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.*, 11, 164.
- CHAKRABORTY, P. & SHAH, H.H. (1972). Bacterial aetiology of diarrhoea in infants and children. *J. Indian Med. Assoc.*, 58, 200.
- CHANG, F.N., SIH, C.J. & WEISBLUM, B. (1966). Lincomycin, an inhibitor of aminoacyl sRNA binding to ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55, 431.
- CHATTERJEE, B.D. & NEOGY, K.N. (1972). On the etiology of choleraic diarrhoea. *Ind. J. Med. Res.*, 60, 531.
- CHATTERJEE, A.K. & STARR, M.P. (1972). Transfer among *Erwinia* spp. and other enterobacteria of antibiotic resistance carried on R factors. *J. Bacteriol.*, 112, 576.
- CHEN, L.C., ROHDE, J.E. & SHARP, G.W.G. (1971). Intestinal adenyl cyclase activity in human cholera. *Lancet* 1, 939.
- CHIEF MEDICAL OFFICER OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND SOCIAL SECURITY (1974). *Annual Report for Year 1973*. London, H.M.S.O.
- CLEWELL, D.B. & HELINSKI, D.R. (1969). Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli* : Purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 62, 1159.
- COELLO-RAMIREZ, P., LIFSHITZ, F. & ZUNIGA, V. (1972). Enteric microflora and carbohydrate intolerance in infants with diarrhea. *Pediatrics* 49, 233.
- COETZEE, J.N., DATTA, N. & HEDGES, R.W. (1972). R factors from *Proteus rettgeri*. *J. gen. Microbiol.*, 72, 33.
- COETZEE, J.N. & PRETORIUS, H.P.J. (1955). Endemic infantile gastroenteritis in the Pretoria area. The aetiological role of *Escherichia coli*. *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, 1, 188.
- COLE, H.D. STALEY, T.E. & WHIPP, S.C. (1977). Reduction of reactivity of *Escherichia coli* enterotoxins by intestinal mucosal components. *Infect. Immun.*, 16, 374.
- COOKE, E.M., SHOOTER, R.A., KUMAR, P.J. ROUSSEAU, S.A. & FOULKES, A.L. (1970). Hospital food as a possible source of *Escherichia coli* in patients. *Lancet* 1, 436.

- COWAN, S.T. & STEEL, K.J. (1974). *Manual for the identification of medical bacteria*; 2nd edition. London, Cambridge University Press.
- CRAIG, J.P. (1965). A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature, London* 207, 614.
- CRAIG, J.P. (1972). The enterotoxin enteropathies. In *Microbial pathogenicity in man and animals. The society for general microbiology symposium 22*. Edited by H. Smith and J.H. Pierce. London, Cambridge University Press.
- CRAIG, J.P. & PIERCE, N.F. (1976). Introduction. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 3.
- CRUICKSHANK, R., DUGUID, J.P., MARMION, B.P. & SWAIN, R.H.A. (1973). *Medical Microbiology. A guide to the laboratory diagnosis and control of infection*. 12th edition, 2 volumes. London, Churchill Livingstone.
- CRUICKSHANK, J.G., ZILBERG, B. & AXTON, J.H.M. (1975). Virus particles and gastro-enteritis in Black and White children in Rhodesia. *S. Afr. Med. J.*, 49, 859.
- CUATRECASAS, P. (1973a). Cholera toxin-fat cell interaction and the mechanism of activation of the lipolytic response. *Biochemistry* 12, 3567.
- CUATRECASAS, P. (1973b). Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. *Biochemistry* 12, 3558.
- CUATRECASAS, P. (1973c). Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry* 12, 3547.
- CUATRECASAS, P. (1973d). *Vibrio cholerae* choleraegenoid. Mechanism of inhibition of cholera toxin action. *Biochemistry* 12, 3577.
- DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. (1970). *Practical Haematology*, 4th edition. London, J. & A Churchill.
- DAFNI, Z. & ROBBINS, J.B. (1976). Purification of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* 078 : H11 by affinity chromatography with antiserum to *Vibrio cholerae* toxin. *J. Infect Dis. (Suppl.)*, 133, 138.
- DATTA, N. (1965). Infectious drug resistance. *Br. Med. Bull.*, 21, 254.
- DATTA, N. & HEDGES, R.W. (1971). Compatibility groups among f_i^- R factors. *Nature, London* 234, 222.
- DATTA, N. & HEDGES, R.W. (1972). Host ranges of R factors. *J. gen. Microbiol.*, 70, 453.
- DATTA, N., HEDGES, R.W., SHAW, E.J., SYKES, R.B. & RICHMOND, M.H. (1971). Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 108, 1244.

- DAVIDSON, G.P., BISHOP, R.F., TOWNLEY, R.R.W., HOLMES, I.H. & RUCK, B.J. (1975). Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1, 242.
- DAVIDSON, J.N. & HIRSH, D.C. (1976). Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infect. Immun.*, 13, 1773.
- DAVIS, R.W., SIMON, M. & DAVIDSON, N. (1971). Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. In *Methods in enzymology*, 21D. Edited by L. Grossman and K. Moldave. New York, Academic Press Inc.
- DAVIS, T.J. & MATSEN, J.M. (1974). Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: Relation to association with a hospital environment. *J. Infect. Dis.*, 130, 402.
- DE, S.N., BHATTACHARYA, K. & SARKAR, J.K. (1956). A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J. Path. Bacteriol.*, 71, 201.
- DE, S.N. & CHATTERJE, D.N. (1953). An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Path. Bacteriol.*, 66, 559.
- DEAN, A.G., CHING, Y.C., WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L.B. (1972). Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125, 407.
- DEPARTEMENT VAN STATISTIEK, PRETORIA. (1974). Ongetitelde publikasie. Pretoria, Staatsdrukker.
- DONTA, S.T. (1976). Interactions of cholera toxin and GM₁ ganglioside with enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in cultured adrenal cells. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 115.
- DONTA, S.T., KING, M. & SLOPER, K. (1973). Induction of steroidogenesis in tissue culture by cholera enterotoxin. *Nature, London* 243, 246.
- DONTA, S.T. & SMITH, D.M. (1974). Stimulation of steroidogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *Escherichia coli* and its neutralization by specific antiserum. *Infect. Immun.*, 9, 500.
- DORNER, F., JAKSCHE, H. & STOCKL, W. (1976). *Escherichia coli* enterotoxin: Purification, partial characterization, and immunological observations. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 142.
- DREES, D.T. & WAXLER, G.L. (1970a). Enteric colibacillosis in gnotobiotic swine: a fluorescence microscopic study. *Am. J. Vet. Res.*, 31, 1148.
- DREES, D.T. & WAXLER, G.L. (1970b). Enteric colibacillosis in gnotobiotic swine: an electron microscopic study. *Am. J. Vet. Res.*, 31, 1159.

- DRION, E.F. & MOSSEL, D.A.A. (1977). The reliability of the examination of foods, processed for safety, for enteric pathogens and *Enterobacteriaceae*: a mathematical and ecological study. *J. Hyg., Camb.*, 78, 301.
- DUFOUR, A.P. & CABELLI, V.J. (1976). Characteristics of *Klebsiella* from textile finishing plant effluents. *J. Water Poll. Control Fed.*, 18, 872.
- DUGUID, J.P. & GILLIES, R.R. (1957). Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. *J. Path. Bacteriol.*, 74, 397.
- DUNCAN, C.L. & STRONG, D.H. (1969). Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 100, 86.
- DUPONT, H.L., FORMAL, S.B., HORNICK, R.B., SNYDER, M.J., LIBONATI, J.P. SHEAHAN, D.G., LA BREC, E.H. & KALAS, J.P. (1971). Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *New Eng. J. Med.*, 285, 1.
- ECHEVERRIA, P., BLACKLOW, N.R. & SMITH, D.H. (1975). Role of heat-labile toxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in diarrhoea in Boston children. *Lancet* 2, 1113.
- ECHEVERRIA, P., LOURIA, C.J., SMITH, A.L. & SMITH, D. (1977). Variation in enterotoxigenicity of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 135, 195.
- EDITORIAL. (1968). Gastro-enteritis due to *Escherichia coli*. *Lancet* 1, 32.
- EDITORIAL. (1975a). *E. coli* enteritis. *Lancet* 2, 1131.
- EDITORIAL. (1975b). Rotaviruses of man and animals. *Lancet* 1, 257.
- EDITORIAL. (1977). Bacterial adhesiveness and the gut. *Lancet* 1, 1293.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. (1972). *Identification of Enterobacteriaceae*. 3rd edition. Minneapolis, Burgess Publishing Co.
- EICHENWALD, H.F. ABABIO, A., ARKY, A.M., HARTMAN, A.P. (1958). Epidemic diarrhea in premature and older infants caused by ECHO virus type 18. *J. Amer. Med. Assoc.*, 166, 1563.
- ELS, H.J. & LECATSAS, G. (1972). Morphological studies on simian virus S.A. 11 and the 'related' O agent. *J. Gen. Virol.*, 17, 129.
- EVANS, D.J., CHEN, L.C., CURLIN, G.T. & EVANS, D.G. (1972). Stimulation of adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *Nature, London* 236, 137.
- EVANS, D.G., EVANS, D.J. & GORBACH, S.L. (1973a). Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. *Infect. Immun.*, 8, 731.
- EVANS, D.J., EVANS, D.G. & GORBACH, S.L. (1973b). Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8, 725.

- EVANS, D.G., EVANS, D.J. & PIERCE, N.F. (1973c). Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 7, 873.
- EVANS, D.J., EVANS, D.G., RICHARDSON, S.H. & GORBACH, S.L. (1976). Purification of the polymyxin-released, heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 97.
- EVANS, D.G., SILVER, R.P., EVANS, D.J., CHASE, D.G. & GORBACH, S.I. (1975). Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, 12, 656.
- FALKOW, S., WILLIAMS, L.P., SEAMAN, S.L. & ROLLINS, L.D. (1976). Increased survival in calves of *Escherichia coli* K-12 carrying an Ent plasmid. *Infect. Immun.*, 13, 1005.
- FARRAR, W.E., EIDSON, M., GUERRY, P., FALKOW, S., DRUSIN, L.M. & ROBERTS, R.B. (1972). Interbacterial transfer of R factor in the human intestine: *in-vivo* acquisition of R factor-mediated kanamycin resistance by a multiresistant strain of *Shigella sonnei*. *J. Infect. Dis.*, 126, 27.
- FERGUSON, W.W. & JUNE, R.C. (1952). Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 111, B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. *Am. J. Hyg.*, 55, 155.
- FIELD, M. (1971). Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. *New Engl. J. Med.*, 284, 1137.
- FIELD, M., FROMM, D., WALLACE, C.K. & GREENOUGH, W.B. (1969). Stimulation of active chloride secretion in small intestine by cholera exotoxin. *J. Clin. Invest.*, 48, 24.
- FIELD, M., PLOTKIN, G.R. & SILEN, W. (1968a). Cyclic AMP induced secretion of chloride by rabbit ileum *in vitro*. *Gastroenterology* 54, 1233.
- FIELD, M., PLOTKIN, G.R. & SILEN, W. (1968b). Effects of vasopressin, theophylline and cyclic adenosine monophosphate on short-circuit current across isolated rabbit ileal mucosa. *Nature, London* 217, 469.
- FINKELSTEIN, R.A., LARUE, M.K., JOHNSTON, D.W., VASIL, M.L., CHO, G.J. & JONES, J.R. (1976). Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 120.
- FINKELSTEIN, R.A. & LOSPALLUTO, J.J. (1969). Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinogen. *J. Exp. Med.*, 130, 185.
- FINKELSTEIN, R.A. & LOSPALLUTO, J.J. (1970). Production, purification and assay of cholera toxin. Production of highly purified cholera toxin and cholera toxinogen. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 121, 63.
- FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H. & MORRIS, C.A. (1975). Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1, 4.

- FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H., WOODE, G.N., BRIDGER, J.C. & DERRICK, J.M. (1974a). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2, 61.
- FLEWETT, T.H., DAVIES, H., BRYDEN, A.S. & ROBERTSON, M.J. (1974b). Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J. Clin. Path.*, 27, 608.
- FRANKEL, S., REITMAN, S. & SONNENWIRTH, A.C. (1970). *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*; 7th edition, 2 volumes. Saint Louis, C.V. Mosby Co.
- FREEMAN, V.J. (1951). Studies on the virulence of bacteriophage infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.*, 61, 675.
- FREEMAN, V.J. & MORSE, I.U. (1952). Further observations on the change to virulence of bacteriophage-infected avirulent strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.*, 63, 407.
- FREIFELDER, D.R. & FREIFELDER, D. (1968). Studies on *Escherichia coli* sex factors. I. Specific labeling of F⁺lac DNA. *J. Mol. Biol.*, 32, 15.
- FREIMAN, I., HARTMAN, E., KASSEL, H., ROBINS-BROWNE, R.M., SCHOUB, B.D., KOORNHOF, H.J., LECATSAS, G. & PROZESKY, O.W. (1977). A microbiological study of gastro-enteritis in Black infants. *S. Afr. Med. J.* 52, 261.
- FUBARA, E.S. & FRETER, R. (1973). Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies. *J. Immun.*, 111, 395.
- GANGAROSA, E.J., BENNETT, J.V., WYATT, C., PIERCE, P.E., OLARTE, J., HERNANDES, P.M., VAZQUEZ, V. & BESSUDO, M.D. (1972). An epidemic associated episome. *J. Infect. Dis.*, 126, 215.
- GARDNER, P. & SMITH, D.H. (1969). Studies on the epidemiology of resistance (R) factors. I. Analysis of *Klebsiella* isolates in a general hospital. II. A prospective study of R factor transfer in the host. *Ann. Intern. Med.*, 71, 1.
- GERDES, J.C. & ROMIG, W.R. (1975). Genetic basis of toxin production and pathogenesis in *Vibrio cholerae*: Evidence against phage conversion. *Infect. Immun.*, 11, 445.
- GIANNELLA, R.A. (1976). Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: Characteristics of the model. *Infect. Immun.*, 14, 95.
- GIBBONS, R.A., JONES, G.W. & SELLWOOD, R. (1975). An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesin by means of a haemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum. *J. gen. Microbiol.*, 86, 228.
- GILES, C., SANGSTER, G. & SMITH, J. (1949). Epidemic gastro-enteritis of infants in Aberdeen during 1947. *Arch. Dis. Child.*, 24, 45.
- GILL, D.M. (1976). Multiple roles of erythrocyte supernatant in the activation of adenylate cyclase by *Vibrio cholerae* toxin in vitro. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 55.

- GILL, D.M., EVANS, D.J. & EVANS, D.G. (1976). Mechanism of activation of adenylate cyclase in vitro by polymyxin-released, heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 103.
- GILL, D.M. & KING, C.A. (1975). The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. *J. Biol. Chem.*, 250, 6424.
- GILMAN, A.G. (1970). A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 305.
- GILMAN, A.G. & MURAD, F. (1974). Assay of cyclic nucleotides by reseptor protein binding displacement. In *Methods in enzymology*. Edited by J.G. Hardman and B.W. O'Malley. New York, Academic Press Inc.
- GOLDSCHMIDT, M.C. & DUPONT, H.L. (1976). Enteropathogenic *Escherichia coli* : lack of correlation of serotype with pathogenicity. *J. Infect. Dis.*, 133, 153.
- GORBACH, S.L. (1971). Intestinal microflora. *Gastroenterology* 60, 1110.
- GORBACH, S.L. BANWELL, J.G., CHATTERJEE, B.D., JACOBS, B. & SACK, R.B. (1971). Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. *J. Clin. Invest.*, 50, 881.
- GORBACH, S.L. & KHURANA, C.M. (1972). Toxigenic *Escherichia coli* : A cause of infantile diarrhea in Chicago. *New Engl. J. Med.*, 287, 791.
- GORDON, J.E. (1971). Diarrheal disease of early childhood - worldwide scope of the problem. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176, 9.
- GORDON, J.E., BEHAR, M. & SCRIMSHAW, N.S. (1964). Acute diarrhoeal disease in less developed countries. I. An epidemiological basis for control. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 31, 1.
- GORDON, J.E., CHITKARA, I.D. & WYON, J.B. (1963). Weanling diarrhea. *Am. J. Med. Sci.*, 245, 345.
- GRABOW, W.O.K., MIDDENDORFF, I.G. & PROZESKY, O.W. (1973). Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance. *Water Research* 7, 1589.
- GRABOW, W.O.K. & PROZESKY, O.W. (1973). Drugresistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. *Antimicrob. Ag. Chemoth.*, 3, 175.
- GRABOW, W.O.K., PROZESKY, O.W. & SMITH, L.S. (1974). Drug resistant coliforms call for review of water quality standards. *Water Research* 8, 1.
- GRACEY, M., SUHARJONO, M., SUNOTO, M.D. & STONE, D.E. (1973). Microbial contamination of the gut : another feature of malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 26, 1170.
- GREEFF, A.S. (1972). *Die voorkoms van Proteus spesies en hul moontlike aanwending as indikatore van fekale besoedeling van water*. M.Sc. verhandeling. Potchefstroom, P.U. vir CHO.

- GREEFF, A.S. (1977). Some genetic properties of enterotoxigenic bacteria from gastroenteritis. *Bulletin, S.A.V.P.M.*, 12, 18.
- GREEFF, A.S. (1978a). Coliform behaviour of enterotoxigenic *Enterobacteriaceae* from infantile gastroenteritis and the isolation of toxigenic bacteria from sewage and water. *Bulletin, S.A.V.P.M.*, In druk.
- GREEFF, A.S. (1978b). Increased levels of cAMP in CHO-K1 cells stimulated by labile toxins from various genera of *Enterobacteriaceae*: The mechanism of diarrhoea induction. *Bulletin, S.A.V.P.M.*, In druk.
- GREEFF, A.S., SCHOUB, B.D., LECATSAS, G. & PROZESKY, O.W. (1977). Mikrobiologiese aspekte van sporadiese akute suigelingsgastroënteritis. *Bulletin, S.A.V.P.M.*, 12, 10.
- GROMAN, N.B. (1953). Evidence for the induced nature of the change from nontoxigenicity to toxigenicity in *Corynebacterium diphtheriae* as a result of exposure to specific bacteriophage. *J. Bacteriol.*, 66, 184.
- GROMAN, N.B., EATON, M. & BOOHER, Z. (1958). Studies of mono- and polylysogenic *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.*, 75, 320.
- GROSS, R.J., SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. (1976). Enterotoxin testing of *Escherichia coli* causing infantile enteritis in the U.K. *Lancet* 1, 629.
- GUENTZEL, M.N. & BERRY, L.J. (1975). Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 11, 890.
- GUERRANT, R.L., BRUNTON, L.L., SCHNAITMAN, T.C., REBHUN, L.I. & GILMAN, A.G. (1974). Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10, 320.
- GUERRANT, R.L., GANGULY, U., CASPER, A.G.T., MOORE, E.J. PIERCE, N.F. & CARPENTER, C.C.J. (1973). Effect of *Escherichia coli* on fluid transport across canine small bowel: mechanism and time-course with enterotoxin and whole bacterial cells. *J. Clin. Invest.*, 52, 1707.
- GUERRANT, R.L., MOORE, R.A., KIRSCHENFELD, P.M. & SANDE, M.A. (1975). Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *New. Engl. J. Med.*, 293, 567.
- GUYTON, A.C. (1971). *Textbook of medical physiology*. 4th edition. Philadelphia, W.B. Saunders Co.
- GYLES, C.L. (1971). Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *E. coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176, 314.
- GYLES, C.L. (1974a). Immunological study of the heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 9, 564.
- GYLES, C.L. (1974b). Relationships among heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, 129, 277.

- GYLES, C.L. & BARNUM, D.A. (1969). A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J. Infect. Dis.* 120, 419.
- GYLES, C., SO, M. & FALKOW, S. (1974). The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 130, 40.
- HAYES, W. (1968). *The genetics of bacteria and their viruses. Studies in basic genetics and molecular biology.* 2nd edition. London, Blackwell Scientific Publications.
- HEDGES, R.W. & DATTA, N. (1971). fi^- R factors giving chloramphenicol resistance. *Nature, London* 234, 220.
- HEDGES, R.W. & JACOB, A.E. (1974). Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol. Gen. Genet.*, 132, 31.
- HEFFRON, F., RUBENS, C. & FALKOW, S. (1977). Transposition of a plasmid deoxyribonucleic acid sequence that mediates ampicillin resistance: Identity of laboratory constructed plasmids and clinical isolates. *J. Bacteriol.*, 129, 530.
- HEFFRON, F., SUBLETT, R., HEDGES, R.W., JACOB, A. & FALKOW, S. (1975). Origin of the TEM beta-lactamase gene found on plasmids. *J. Bacteriol.*, 122, 250.
- HENTGES, D.J. & FRETER, R. (1962). In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri*. I. Correlation between various tests. *J. Infect. Dis.*, 110, 30.
- HETTIARATCHY, I.G.T., COOKE, E.M. & SHOOTER, R.A. (1973). Colicine production as an epidemiological marker of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 6, 1.
- HEWLETT, E.L., GUERRANT, R.L., EVANS, D.J. & GREENOUGH, W.B. (1974). Toxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* stimulate adenylyl cyclase in rat fat cells. *Nature, London* 249, 371.
- HEYWORTH, B. & BROWN, J. (1975). Jejunal microflora in malnourished Gambian children. *Arch. Dis. Child.*, 50, 27.
- HOHMANN, A.W. & WILSON, M.R. (1975). Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to intestinal epithelium in vivo. *Infect. Immun.*, 12, 866.
- HOLMES, I.H. MATHAN, M., BHAT, P., ALBERT, M.J., SWAMINATHAN, S.P., MAIYA, P.P., PEREIRA, S.M. & BAKER, S.J. (1974). Orbiviruses and gastroenteritis. *Lancet* 2, 658.
- HOLMGREN, J. (1973a). Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. *Infect. Immun.* 8, 851.
- HOLMGREN, J. (1973b). Immunologic and receptorbinding properties of cholera toxin and its subunits. In *Proceedings of the Ninth Joint Conference, U.S. - Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel.* U.S. Department of State publication no 8762.

- HOLMGREN, J. & LÖNNROTH, I. (1975). Oligomeric structure of cholera toxin : characteristics of the H and L subunits. *J. gen. Microbiol.*, 86, 49.
- HOLMGREN, J. & LÖNNROTH, I. (1976). Cholera toxin and the adenylate cyclase-activating signal. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 64.
- HOLMGREN, J., LÖNNROTH, I. & SVENNERHOLM, L. (1973a). Tissue receptor for cholera exotoxin : postulated structure from studies with GM₁ ganglioside and related glycolipids. *Infect. Immun.* 8, 208.
- HOLMGREN, J., SÖDERLIND, O. & WADSTRÖM, T. (1973b). Cross-reactivity between heat labile enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in neutralization tests in rabbit ileum and skin. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 81, 757.
- HORWITZ, M.A., HUGHES, J.M. & CRAUN, G.F. (1976). Outbreaks of waterborne disease in the United States, 1974. *J. Infect. Dis.*, 133, 588.
- HOSKINS, J.M. (1967). *Virological procedures*. 1st edition. London, Butterworths.
- HSIE, A.W., JONES, C. & PUCK, T.T. (1971). Further changes in differentiation state accompanying the conversion of Chinese hamster cells to fibroblastic form by dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate and hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 1648.
- HSIE, A.W. & PUCK, T.T. (1971). Morphological transformation of Chinese hamster cells by dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate and testosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 358.
- HUGHES, J.M., MERSON, M.H., CRAUN, G.F. & McCABE, L.J. (1974). Outbreaks of waterborne disease in the United States, 1973. *J. Infect. Dis.*, 132, 336.
- INSELBURG, J. (1977). Isolation, mapping, and examination of effects of TnA insertions in Col E1 plasmids. *J. Bacteriol.*, 129, 482.
- ISAÄCSON, M. (1975). Practical aspects of a cholera surveillance programme. *S. Afr. Med. J.*, 49, 1699.
- ISAACSON, R.E. (1977). K99 surface antigen of *Escherichia coli*. Purification and partial characterization. *Infect. Immun.*, 15, 272.
- ISAÄCSON, M., CLARKE, K.R., ELLACOMBE, G.H., SMIT, W.A., SMIT, P., KOORNHOF, H.J., SMITH, L.S. & KRIEL, L.J. (1974). The recent cholera outbreak in the South African gold mining industry. *S. Afr. Med. J.*, 48, 2557.
- ISEKI, S. & SAKAI, T. (1953). Artificial transformation of O antigens in *Salmonella* group E. II. Antigen transforming factor in bacilli of group E2. *Proc. Japan Acad.*, 29, 127.
- JACKS, T.M. & WU, B.J. (1974). Biochemical properties of *Escherichia coli* low-molecular-weight, heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 9, 342.

- JACOBS, S.I., HOLZEL, A., WOLMAN, B., KEEN, J.H., MILLER, V., TAYLOR, J. & GROSS, R.J. (1970). Outbreak of infantile gastro-enteritis caused by *Escherichia coli* 0114. *Arch. Dis. Child.*, 45, 656.
- JAWETZ, E., MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. (1972). *Review of Medical Microbiology*. 10th edition. Los Altos, Large Medical Publications.
- JONES, G.W. & RUTTER, J.M. (1972). Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhoea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.*, 6, 918.
- JUNE, R.C., FERGUSON, W.W. & WORFEL, M.T. (1953). Experiments in feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 55, B5, a coliform organism associated with infant diarrhoea. *Am. J. Hyg.*, 57, 222.
- KAHN, E. (1957). The aetiology of summer diarrhoea. *S. Afr. Med. J.*, 31, 47.
- KAHN, E., MALHERBE, H., CASSEL, R., ROUX, P. & SCHRIRE, L. (1963). The role of enteropathogenic bacteria and viruses in acute diarrhoeal disorders of infancy and childhood in Johannesburg III. Sporadic diarrhoea in a premature baby unit. *S. Afr. Med. J.*, 37, 261.
- KAHN, E. & ROBERTSON, G.H. (1952). Summer diarrhoea in Bantu infants on the Witwatersrand. The role of strains of *Bact. coli neapolitanum* in its causation. *S. Afr. Med. J.*, 26, 671.
- KANE, J.G., CHRETIEN, J.H. & GARAGUSI, V.F. (1976). Diarrhoea caused by *Candida*. *Lancet* 1, 335.
- KANTOR, H.S., TAO, P. & GORBACH, S.L. (1974). Stimulation of intestinal adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin: Comparison of strains from an infant and an adult with diarrhoea. *J. Infect. Dis.*, 129, 1.
- KAPIKIAN, A.Z., CLINE, W.L., MEBUS, C.A., WYATT, R.G., KALICA, A.R., JAMES, H.D., VANKIRK, D., CHANOCK, R.M. & KIM, H.W. (1975). New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Nebraska calf-diarrhoea virus used as antigen. *Lancet* 1, 1055.
- KAPIKIAN, A.Z., KIM, H.W., WYATT, R.G., CLINE, W.L., ARROBIO, J.O., BRANDT, C.D., RODRIGUEZ, W.J., SACK, D.A., CHANOCK, R.M. & PARROTT, R.H. (1976). Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *New Engl. J. Med.*, 294, 965.
- KAPIKIAN, A.Z., KIM, H.W., WYATT, R.G., RODRIGUEZ, W.J., ROSS, S., CLINE, W.L., PARROTT, R.H. & CHANOCK, R.M. (1974). Reoviruslike agent in stools: Association with infantile diarrhoea and development of serologic tests. *Science* 185, 1049.
- KAPIKIAN, A.Z., WYATT, R.G., DOLIN, R., THORNHILL, T.S., KALICA, A.R. & CHANOCK, R.M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 10, 1075.

- KAPRAL, F.A., O'BRIAN, A.D., RUFF, P.D. & DRUGAN, W.J. (1976). Inhibition of water absorption in the intestine by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Infect. Immun.*, 13, 140.
- KEAN, B.H. (1963). The diarrhea of travelers to Mexico. Summary of a five-year study. *Ann. Intern. Med.*, 59, 605.
- KENNEDY, D.H., WALKER, G.H., FALLON, R.J. BOYD, J.F., GROSS, R.J. & ROWE, B. (1973). An outbreak of infantile gastroenteritis due to *E. coli* 0142. *J. Clin. Path.*, 26, 731.
- KEUSCH, G.T. & DONTA, S.T. (1975). Classification of enterotoxins on the basis of activity in cell culture. *J. Infect. Dis.*, 131, 58.
- KEUSCH, G.T., GRADY, L.J. MATA, L.J. & McIVER, J. (1972). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. I. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae* I. *J. Clin. Invest.*, 5, 1212.
- KHATOON, H. & IYER, R.V. (1971). Stable co-existence of f_i^- R factors in *E. coli*. *Can. J. Microbiol.*, 17, 669.
- KIMBERG, D.V., FIELD, M., JOHNSON, J., HENDERSON, A. & GERSHON, E. (1971). Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J. Clin. Invest.*, 50, 1218.
- KING, C.A. & VAN HEYNINGEN, W.E. (1973). Deactivation of cholera toxin by a sialidase-resistant monosialosylganglioside. *J. Infect. Dis.*, 127, 639.
- KIRBY, A.C., HALL, E.G. & COACKLEY, W. (1950). Neonatal diarrhoea and vomiting. Outbreaks in the same maternity unit. *Lancet* 2, 201.
- KJELLÉN, L., ZETTERBERG, B. & SVEDMYR, A. (1957). An epidemic among Swedish children caused by adenovirus type 3. *Acta. Paediat.*, 46, 561.
- KLIPSTEIN, F.A. & ENGERT, R.F. (1975). Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. III. Preliminary characterization of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin. *J. Infect. Dis.*, 132, 200.
- KLIPSTEIN, F.A. & ENGERT, R.F. (1976a). Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun* 13, 1307.
- KLIPSTEIN, F.A. & ENGERT, R.F. (1976b). Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 13, 373.
- KLIPSTEIN, F.A., HOLDEMAN, L.V., CORCINO, J.J. & MOORE, W.E.C. (1973). Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. *Ann. Intern. Med.*, 79, 632.
- KOHLER, E.M. (1968). Enterotoxic activity of filtrates of *Escherichia coli* in young pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 29, 2263.
- KONNO, T., SUZUKI, H. & ISHIDA, N. (1975). Reovirus-like agent in Japanese infants with gastroenteritis. *Lancet* 1, 918.

- KOORNHOF, H.J., RICHARDSON, N.J. POLITZER, W.M., UTIAN, H.L. & MALHERBE, H. (1964). A study of summer diarrhoea in White children in Johannesburg. *S. Afr. Med. J.*, 38, 821.
- KOPECKO, D.J. & COHEN, S.N. (1975). Site-specific *recA*-independent recombination between bacterial plasmids : involvement of palindromes at the recombinational loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 1373.
- KOUPAL, L.R. & DEIBEL, R.H. (1975). Assay, characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 11, 14.
- KUBOTA, Y. & LIU, P.V. (1971). An Enterotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.*, 123, 97.
- KUROSKY, A. MARKEL, D.E., TOUCHSTONE, B. & PETERSON, J.W. (1976). Chemical characterization of the structure of cholera toxin and its natural toxoid. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 14.
- KWAN, C.N. & WISHNOW, R.M. (1974). *Escherichia coli* enterotoxin-induced steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *Infect. Immun.*, 10, 146.
- LABREC, E.H., SCHNEIDER, H., MAGNANI, T.J. & FORMAL, S.B. (1964). Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J. Bacteriol.*, 88, 1503.
- LAI, C.Y., MENDEZ, E. & CHANG, D. (1976). Chemistry of cholera toxin : the subunit structure. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 23.
- LANG, D. (1970). Molecular weights of coliphages and coliphage DNA. III. Contour length and molecular weight of DNA from bacteriophages T4, T5 and T7, and from bovine papilloma virus. *J. Mol. Biol.*, 54, 557.
- LANGER, H. (1937). The significance of *B. coli* strains in infant dyspepsia. *S. Afr. J. Med. Sci.*, 2, 57.
- LARIVIERE, S., GYLES, C.L. & BARNUM, D.A. (1973). Preliminary characterization of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* FII(P155). *J. Infect. Dis.*, 128, 312.
- LAWN, A.M., ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. (1977). Morphological distinction between different H serotypes of *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.*, 101, 111.
- LEVINE, M.M., CAPLAN, E.S., WATERMAN, D., CASH, R.A., HORNICK, R.B. & SNYDER, M.J. (1977). Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 17, 78.
- LEVNER, M., WIENER, F.P. & RUBIN, B.A. (1977). Induction of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. *Infect. Immun.*, 15, 132.
- LIVINGSTONE, D.J. (1969). An appraisal of sewage pollution along a section of the Natal coast. *J. Hyg. Camb.*, 67, 209.

- LIVINGSTONE, D.J. (1976). An appraisal of sewage pollution along a section of the Natal coast after the introduction of submarine outfalls. *J. Hyg. Camb.*, 77, 263.
- LOMBARDI, G.H., ROSETO, A.M., STAMBOULIAN, D. & ORO, J.G.B. (1975). Viruses of infantile gastroenteritis in Argentina. *Lancet* 2, 1311.
- LÖNNROTH, I. & HOLMGREN, J. (1973). Subunit structure of cholera toxin. *J. gen. Microbiol.*, 76, 417.
- LOSPALLUTO, J.J. & FINKELSTEIN, R.A. (1972). Chemical and physical properties of cholera exo-enterotoxin (choleragen) and its spontaneously formed toxoid (choleragenoid). *Biochim. Biophys. Acta* 257, 158.
- LOVE, W.C., GORDON, A.M., GROSS, R.J. & ROWE, B. (1972). Infantile gastroenteritis due to *Escherichia coli* 0142. *Lancet* 2, 355.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- MÄKELÄ, P.H. & STOCKER, B.A.D. (1969). Genetics of polysaccharide biosynthesis. *A. Rev. Genetics* 3, 291.
- MALHERBE, H., ROUX, P. & KAHN, E. (1963). The role of enteropathogenic bacteria and viruses in acute diarrhoeal disorders of infancy and childhood in Johannesburg. II. 'Non-specific' gastro-enteritis. *S. Afr. Med. J.*, 37, 259.
- MARÉ, I.J. & COETZEE, J.N. (1965). The isolation of *Enterobacteriaceae* possessing the property of transmissible multiple drug resistance. *S. Afr. Med. J.*, 39, 864.
- MARIER, R., WELLS, J.G., SWANSON, R.C., CALLAHAN, W. & MEHLMAN, I.J. (1973). An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French Cheese. *Lancet* 2, 1376.
- MARSH, E.B. & SMITH, D.H. (1969). R factors improving survival of *Escherichia coli* K-12 after ultraviolet irradiation. *J. Bacteriol.*, 100, 128.
- McDONEL, J.L. (1974). In vivo effects of *Clostridium perfringens* enteropathogenic factors on the rat ileum. *Infect. Immun.*, 10, 1156.
- McNEISH, A.S., TURNER, P., FLEMING, J. & EVANS, N. (1975). Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 2, 946.
- MERSON, M.H., BARKER, W.H., CRAUN, G.F. & McCABE, L.J. (1974). Outbreaks of waterborne disease in the United States, 1971-1972. *J. Infect. Dis.*, 129, 614.
- MEYNELL, G.G. (1972). *Bacterial plasmids*. 1st edition. Cambridge, The M.I.T. Press.
- MIDDELTON, P.J., PETRIC, M., HEWITT, C.M., SZYMANSKI, M.T. & TAM, J.S. (1976). Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J. Clin. Path.*, 29, 191.

- MITCHELL, I. DE G, & KENWORTHY, R. (1977). Attempted elimination of plasmid-determined haemolysin, K88 antigen and enterotoxin from *Escherichia coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, 42, 207.
- MITCHELL, E.E., VAN DEN ENDE, M., GANT, J., RABKIN, J.W. SELZER, G. & PARKER, R.G.F. (1948). Neonatal diarrhoea. A report of an epidemic and attempts at the isolation of a causal agent. *Clin. Proc.*, 7, 251.
- MUCH, D.H. & ZAJAC, I. (1972). Purification and characterization of Epizootic diarrhea of infant mice virus. *Infect. Immun.*, 6, 1019.
- MUNDELL, D.H., ANSELMO, C.R. & WISHNOW, R.M. (1976). Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.*, 14, 383.
- MUTANDA, L.N., HILLMAN, E.S., SHUKLA, J.M., ODUORI, M.L. (1976). Enteropathogenic *E. coli*. *Lancet* 1, 1412.
- NALIN, D.R., McLAUGHLIN, J.C., RAHAMAN, M., YUNUS, M. & CURLIN, G. (1975). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and idiopathic diarrhoea in Bangladesh. *Lancet* 2, 1116.
- NETER, E. & SHUMWAY, C.N. (1950). *E. coli* serotype D433 : Occurrence in intestinal and respiratory tracts, cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 75, 504.
- NYGREN, B. (1962). Phospholipase C-producing bacteria and foodpoisoning. An experimental study on *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, (Suppl.), 169, 11.
- O'BRIEN, A.D. & KAPRAL, F.A. (1976). Increased cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content in guinea pig ileum after exposure to *Staphylococcus aureus* delta toxin. *Infect. Immun.*, 13, 152.
- O'BRIEN, A.D. & KAPRAL, F.A. (1977). Effect of *Staphylococcus aureus* delta toxin on Chinese hamster ovary cell morphology and Y-1 adrenal cell morphology and steroidogenesis. *Infect. Immun.*, 16, 812.
- O'BRIEN, A.D., THOMPSON, M.R., GEMSKI, P., DOCTOR, B.P. & FORMAL, S.B. (1977). Biological properties of *Shigella flexneri* 2A toxin and its serological relationship to *Shigella dysenteriae* I toxin. *Infect. Immun.*, 15, 796.
- OHTOMÔ, N., MURAOKA, T., TASHIRO, A., ZINNAKA, Y. & AMAKO, K. (1976). Size and structure of the cholera toxin molecule and its subunits. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 31.
- OLARTE, W., FERGUSON, W.W., HENDERSON, N.D. & TORREGROSA, L. (1961). *Klebsiella* strains isolated from diarrheal infants. *Am. J. Dis. Child.*, 101, 763.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. (1966). Episome - carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. I. Transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. *J. Bacteriol.*, 91, 69.

- ØRSKOV, F., ØRSKOV, I., EVANS, D.J., SACK, R.B., SACK, D.A. & WADSTRÖM, T. (1976). Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol., Immunol.*, 162, 73.
- ØRSKOV, F., ØRSKOV, I., JANN, B. & JANN, K. (1971). Immuno-electrophoretic patterns of extracts from all *Escherichia coli* O and K antigen test strains. Correlation with pathogenicity. *Acta. Path. Microbiol., Scand.*, 79, 142.
- ORSTAVIK, I., FIGENSCHAU, K.J. & ULSTRUP, J.C. (1974). "Rotavirus" in stored specimens of faecal extracts. *Lancet* 2, 1083.
- OZAWA, A. & FRETER, R. (1964). Ecological mechanism controlling growth of *Escherichia coli* in continuous flow cultures and in the mouse intestine. *J. Infect. Dis.*, 114, 235.
- PARKS, W.P., MELNICK, J.L. QUEIROGA, L.T. & KHAN, H.A. (1966). Studies on infantile diarrhea in Karachi, Pakistan. I. Collection, virus isolation and typing of viruses. *Am. J. Epidem.*, 84, 382.
- PAVER, W.K., CAUL, E.O., ASHLEY, C.R. & CLARKE, S.K.R. (1973). A small virus in human faeces. *Lancet* 1, 237.
- PIERCE, N.F. (1973). Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.*, 137, 1009.
- PIERCE, N.F., CARPENTER, C.C.J., ELLIOT, H.L. & GREENOUGH, W.B. (1971). Effects of prostaglandins, theophylline and cholera exotoxin upon transmucosal water and electrolyte movement in the canine jejunum. *Gastroenterology* 60, 22.
- PIERCE, N.F. & WALLACE, C.K. (1972). Stimulation of jejunal secretion by a crude *Escherichia coli* enterotoxin. *Gastroenterology* 63, 439.
- PUCK, T.T., WALDREN, C.A. & HSIE, A.W. (1972). Membrane dynamics in the action of dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and testosterone on mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 1943.
- PUNYASHTHITI, K. & FINKELSTEIN, R.A. (1971). Enteropathogenicity of *Escherichia coli*. I. Evaluation of mouse intestinal loops. *Infect. Immun.*, 4, 473.
- RAMOS-ALVAREZ, M. & OLARTE, J. (1964). Diarrheal diseases of children. The occurrence of enteropathogenic viruses and bacteria. *Am. J. Dis. Child.*, 107, 218.
- RAPPAPORT, R.S., SAGIN, J.F., PIERZCHALA, W.A., BONDE, G., RUBIN, B.A. & TINT, H. (1976). Activation of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin by trypsin. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 41.
- REANNEY, D. (1976). Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bact. Rev.*, 40, 552.

- RICHMOND, M.M. (1972). Some environmental consequences of the use of antibiotics : or 'what goes up must come down'. *J. Appl. Bacteriol.*, 35, 155.
- RIPPON, J.W. (1974). *Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 1st edition. Philadelphia, W.B. Saunders.
- ROBBINS, P.W. & UCHIDA, T. (1962). Studies on the chemical basis of the phage conversion of O antigens in the E-group Salmonellae. *Biochemistry I*, 323.
- ROBINS-BROWNE, R.M. & KOORNHOF, H.J. (1977). Recent advances in infantile gastroenteritis research. *S. Afr. J. Sci.*, 73, 105.
- RODGER, S.M., SCHNAGL, R.D. & HOLMES, I.H. (1975). Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. *J. Virol.*, 16, 1229.
- ROSENBERG, M.L., KOPLAN, J.P., WACHSMUTH, I.K., WELLS, J.G., GANGAROSA, E.J., GUERRANT, R.L. & SACK, D.A. (1977). Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*. A large waterborne outbreak. *Ann. Intern. Med.*, 86, 714.
- ROUX, P., KAHN, E., MALHERBE, H. & CASSEL, R. (1963). The role of enteropathogenic bacteria and viruses in acute diarrhoeal disorders of infancy and childhood in Johannesburg. I Summer diarrhoea. *S. Afr. Med. J.*, 37, 256.
- ROWE, B., GROSS, R.J. & SCOTLAND, S.M. (1976). Serotyping of *E. coli*. *Lancet* 2, 38.
- RUDOY, R.C. & NELSON, J.D. (1975). Enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am. J. Dis. Child.*, 129, 668.
- RUTTER, J.M., BURROWS, M.R., SELLWOOD, R. & GIBBONS, R.A. (1975). A genetic basis for resistance to enteric disease caused by *E. coli*. *Nature, London* 257, 135.
- RYDER, R.W., SACK, D.A., KAPIKIAN, A.Z., McLAUGHLIN, J.C., CHAKRABORTY, J., RAHMAN, A.S.M.M., MERSON, M.H. & WELLS, J.G. (1976). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in rural Bangladesh. *Lancet* 1, 659.
- SACK, R.B. (1975). Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29, 333.
- SACK, R.B. (1976a). Enterotoxigenic *Escherichia coli* - an emerging pathogen. *New Engl. J. Med.*, 295, 893.
- SACK, R.B. (1976b). Serotyping of *E. coli*. *Lancet* 1, 1132.
- SACK, R.B. & FROEHLICH, J.L. (1977). Antigenic similarity of heat-labile enterotoxins from diverse strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 5, 570.

- SACK, R.B., GORBACH, S.L., BANWELL, J.G., JACOBS, B., CHATTERJEE, B.D. & MITRA, R.C. (1971). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect., Dis.*, 123, 378.
- SACK, R.B., HIRSCHHORN, N., BROWNLEE, I., CASH, R.A., WOODWARD, W.E. & SACK, D.A. (1975). Enterotoxigenic *Escherichia coli* - associated diarrheal disease in Apache children. *New Engl. J. Med.*, 292, 1041.
- SACK, D.A. & SACK, R.B. (1975). Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.*, 11, 334.
- SACK, R.B., SACK, D.A., MEHLMAN, I.J., ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I. (1977). Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *J. Infect. Dis.*, 135, 313.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K. & NAKAMURA, A. (1974a). Further studies on enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhoeal diseases in children and adults. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 27, 7.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K., NAKAMURA, A., KURATA, T., GOHDA, A. & TAKEUCHI, S. (1974b). Enteropathogenicity and enterotoxigenicity of human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 27, 19.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K., PRESCOTT, L.M., BENCIC, Z., SANYAL, S.C. & SINHA, R. (1971). Bacteriological examination of diarrheal stools in Calcutta. *Ind. J. Med. Res.*, 59, 1025.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K. & SAITO, M. (1967). Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. *Japan. J. Med., Sci. Biol.*, 20, 387.
- SANDEFUR, P.D. & PETERSON, J.W. (1976). Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 14, 671.
- SANDEFUR, P.D. & PETERSON, J.W. (1977). Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect. Immun.*, 15, 988.
- SANTOS, D.S., PALCHAUDHURI, S. & MAAS, W.K. (1975). Genetic and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. *J. Bacteriol.*, 124, 1240.
- SANYAL, S.C., GAUR, S.D., SHRIVASTAVA, D.L., SEN, P.C., MARWAH, S.M. & SINGH, H. (1972). Enteric infections in Sunderpür slum area. *Ind. J. Med. Res.*, 60, 979.
- SANYAL, S.C., SINGH, S.J. & SEN, P.C. (1975). Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *J. Med. Microbiol.*, 8, 195.
- SCHAFER, D.E., LUST, W.D., SIRCAR, B. & GOLDBERG, N.D. (1970). Elevated concentration of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in intestinal mucosa after treatment with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 851.

- SCHOUB, B.D., GREEFF, A.S., LECATSAS, G., PROZESKY, O.W., HAY, I.T. & PRINSLOO, J.G. (1976a). Enterotoxinogenic bacteria in Africa. *Br. Med. J.*, 2, 473.
- SCHOUB, B.D., GREEFF, A.S., LECATSAS, G., PROZESKY, O.W., HAY, I.T., PRINSLOO, J.G. & BALLARD, R.C. (1977). A microbiological investigation of acute summer gastroenteritis in Black South African infants. *J. Hyg. (Camb.)*, 78, 377.
- SCHOUB, B.D., JACOBS, Y.R., ROBINS-BROWNE, R.M., KOORNHOF, H.J., LECATSAS, G. & PROZESKY, O.W. (1976b). Experimental techniques in the determination of the aetiology of acute infantile gastroenteritis. *S. Afr. J. Med. Sci.*, 3, 213.
- SCHOUB, B.D., KOORNHOF, H.J., LECATSAS, G., PROZESKY, O.W., FREIMAN, I., HARTMAN, E. & KASSEL, H. (1975). Viruses in acute summer gastroenteritis in Black infants. *Lancet* 1, 1093.
- SCHOUB, B.D., NEL, J.D., LECATSAS, G., GREEFF, A.S., PROZESKY, O.W., HAY, I.T. & PRINSLOO, J.G. (1976c). Rotavirus as a cause of gastroenteritis in Black South African infants. *S. Afr. Med. J.*, 50., 1124.
- SCHRANK, G.D. & VERWEY, W.F. (1976). Distribution of cholera organisms in experimental *Vibrio cholerae* infections: Proposed mechanisms of pathogenesis and antibacterial immunity. *Infect. Immun.*, 13, 195.
- SCHROEDER, S.A., CALDWELL, J.R., VERNON, T.M., WHITE, P.C., GRANGER, S.I. & BENNETT, J.V. (1968). A waterborne outbreak of gastroenteritis in adults associated with *Escherichia coli*. *Lancet* 1, 737.
- SELLWOOD, R., GIBBONS, R.A., JONES, G.W. & RUTTER, J.M. (1975). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J. Med. Microbiol.*, 8, 405.
- SERÉNY, B. (1955). Experimental Shigella keratoconjunctivitis: A preliminary report. *Acta. Microbiol. Acad. Scient. Hungar.*, 2, 293.
- SEXTON, M., DAVIDSON, G.P., BISHOP, R.F., TOWNLEY, R.R.W., HOLMES, I.H. & RUCK, B.J. (1974). Viruses in gastroenteritis. *Lancet* 2, 355.
- SHARP, G.W.G. & HYNIE, S. (1971). Stimulation of intestinal adenylyl cyclase by cholera toxin. *Nature, London* 229, 266.
- SHERRAT, D. (1977). Plasmids and pathogenicity. *Nature, London* 265, 297.
- SICCARDI, A.G. (1966). Colicin resistance associated with resistance factors in *Escherichia coli*. *Genet. Res.*, 8, 219.
- SICCARDI, A.G. (1969). Effect of R factors and other plasmid on ultraviolet susceptibility and host cell reactivation property of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 100, 337.
- SILVER, R.P. & FALKOW, S. (1970). Specific labeling and physical characterization of R-factor deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 104, 331.
- SKERMAN, F.J., FORMAL, S.B. & FALKOW, S. (1972). Plasmid-associated enterotoxin production in a strain of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.*, 5, 622.

- SMITH, H.W. (1963). The haemolysins of *Escherichia coli*. *J. Path. Bacteriol.*, 85, 197.
- SMITH, D.H. (1967). R factors mediate resistance to mercury, nickel, and cobalt. *Science* 156, 1114.
- SMITH, L.S. (1969). Public Health aspects of water pollution control. *Wat. Pollut. Control* 68, 544.
- SMITH, H.W. (1970). Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R factors. *Nature, London* 228, 1286.
- SMITH, H.W. & GYLES, C.L. (1970). The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J. Med. Microbiol.*, 3, 387.
- SMITH, H.W. & HALLS, S. (1967a). Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Path. Bacteriol.*, 93, 499.
- SMITH, H.W. & HALLS, S. (1967b). Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bacteriol.*, 93, 531.
- SMITH, H.W. & HALLS, S. (1967c). The transmissible nature of of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls haemolysin production. *J. gen. Microbiol.*, 47, 153.
- SMITH, H.W. & HALLS, S. (1968). The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. gen. Microbiol.*, 52, 319.
- SMITH, H.W. & LINGGOOD, M.A. (1970). Transfer factors in *Escherichia coli* with particular regard to their incidence in enteropathogenic strains. *J. gen. Microbiol.*, 62, 287.
- SMITH, H.W. & LINGGOOD, M.A. (1971). The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 4, 301.
- SMITH, H.W. & LINGGOOD, M.A. (1972). 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, 243.
- SMITH, N.W. & SACK, R.B. (1973). Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, 127, 164.
- SO, M., BOYER, H.W., BETLACH, M. & FALKOW, S. (1976). Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *J. Bacteriol.*, 128, 463.

- SO, M., CRANDALL, J.F., CROSA, J.H. & FALKOW, S. (1974). Extrachromosomal determinants which contribute to bacterial pathogenicity. In *Microbiology, 1974*. Edited by D. Schlessinger. Washington, American Society for Microbiology.
- SO, M., CROSA, J.H. & FALKOW, S. (1975). Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. *J. Bacteriol.*, 121, 234.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. (1969). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 1st edition. San Francisco, W.H. Freeman and Co.
- SPENCE, L., FAUVEL, M., BOUCHARD, S., BABUIK, L. & SAUNDERS, J.R. (1975). Test for reovirus-like agent. *Lancet* 2, 322.
- SPENCER, I.W.F. & COSTER, M.E.E. (1969). The epidemiology of gastroenteritis in infancy. *S. Afr. Med. J.*, 43, 1391.
- SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M. (1972). *Bacillus cereus* - induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Appl. Microbiol.*, 24, 341.
- STAIR, E.L., RHODES, M.B., WHITE, R.G. & MEBUS, C.A. (1972). Neonatal calf diarrhea: Purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.*, 33, 1147.
- STALEY, T.E., JONES, E.W. & CORLEY, L.D. (1969). Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am. J. Path.*, 56, 371.
- STARK, R.L. & DUNCAN, C.L. (1971). Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.*, 4, 89.
- STARK, R.L. & DUNCAN, C.L. (1972). Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.*, 6, 662.
- STEINBERG, S.E., BANWELL, J.G., YARDLEY, J.H., KEUSCH, G.T. & HENDRIX, T.R. (1975). Comparison of secretory and histological effects of *Shigella* and cholera enterotoxins in rabbit jejunum. *Gastroenterology* 68, 309.
- STORZ, J. & BATES, R.C. (1973). Parvovirus infections in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 163, 884.
- STOTT, E.J., BELL, E.J., EADIE, M.B., ROSS, C.A.C. & GRIST, N.R. (1967). A comparative virological study of children in hospital with respiratory and diarrhoeal illnesses. *J. Hyg., Camb.*, 65, 9.
- STURTEVANT, A.B., CASSEL, G.H. & FEARY, T.W. (1971). Incidence of infectious drug resistance among fecal coliforms isolated from raw sewage. *Appl. Microbiol.*, 21, 487.
- STURTEVANT, A.B. & FEARY, T.W. (1969). Incidence of infectious drug resistance among lactose-fermenting bacteria isolated from raw and treated sewage. *Appl. Microbiol.*, 18, 918.
- SUMMERS, A.O. & SILVER, S. (1972). Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 112, 1228.

- SUTTER, V.L., VARGO, V.L. & FINEGOLD, S.M. (1975). *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. 1st edition. University of California.
- TAKANO, T., WATANABE, T. & FUKASAWA, T. (1968). Mechanism of host-controlled restriction of bacteriophage λ by R factors in *Escherichia coli* K12. *Virology*, 34, 290.
- TAN, G.S., TOWNLEY, R.R.W., DAVIDSON, G.P., BISHOP, R.F., HOLMES, I.H. & RUCK, B.J. (1974). Virus in faecal extracts from children with gastroenteritis. *Lancet* 1, 1109.
- TAYLOR, J. BETTELHEIM, K.A. (1966). The action of chloroform-killed suspensions of enteropathogenic *Escherichia coli* on ligated rabbit-gut segments. *J. gen. Microbiol.*, 42, 309.
- TAYLOR, J., POWELL, B.W. & WRIGHT, J. (1949). Infantile diarrhoea and vomiting. A clinical and bacteriological investigation. *Br. Med. J.*, 2, 117.
- TORRES-MEDINA, A., WYATT, R.G., MEBUS, C.A., UNDERDAHL, N.R. & KAPIKIAN, A.Z. (1976a). Diarrhea caused in gnotobiotic piglets by the reoviruslike agent of human infantile gastroenteritis. *J. Infect. Dis.*, 133, 22.
- TORRES-MEDINA, A., WYATT, R.G., MEBUS, C.A., UNDERDAHL, N.R. & KAPIKIAN, A.Z. (1976b). Patterns of shedding of human reovirus-like agent in gnotobiotic newborn piglets with experimentally-induced diarrhea. *Intervirology* 7, 250.
- TUFVESSON, B. & JOHNSON, T. (1976). Occurrence of reo-like viruses in young children with acute gastroenteritis. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 84, 22.
- UETAKE, H., LURIA, S.E. & BURROUS, J.W. (1958). Conversion of somatic antigens in *Salmonella* by phage infection leading to lysis or lysogeny. *Virology*, 5, 68.
- VAN HEYNINGEN, S. (1974). Cholera toxin : interaction of subunits with ganglioside GM₁. *Science* 183, 656.
- VAN HEYNINGEN, W.E. (1974). Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. *Nature, London* 249, 415.
- VAN HEYNINGEN, S. (1976). The subunits of cholera toxin : structure, stoichiometry, and function. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 133, 5.
- VAN HEYNINGEN, W.E., CARPENTER, C.C.J., PIERCE, N.F. & GREENOUGH, W.B. (1971). Deactivation of cholera toxin by ganglioside. *J. Infect. Dis.*, 124, 415.
- VAN RENSBURG, A.J. (1972). The molecular nature of a drug resistance factor in *Proteus mirabilis*. *S. Afr. Med. J.*, 46, 200.
- VASIL, M.L., HOLMES, R.K., FINKELSTEIN, R.A. (1975). Conjugal transfer of a chromosomal gene determining production of enterotoxin in *Vibrio cholerae*. *Science* 187, 849.

- VAUGHAN, M., PIERCE, N.F. & GREENOUGH, W.B. (1970). Stimulation of glycerol production in fat cells by cholera toxin. *Nature, London* 226, 658.
- VERNON, E. (1969). Food poisoning and *Salmonella* infections in England and Wales, 1967. *Publ. Hlth., London* 83, 205.
- WACHSMUTH, I.K., FALKOW, S. & RYDER, R.W. (1976). Plasmid-mediated properties of a heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.*, 14, 403.
- WADSTRÖM, T., AUST-KETTIS, A., HABTE, D., HOLMGREN, J., MEEUWISSE, G., MÖLLBY, R. & SÖDERLIND, O. (1976a). Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease *Arch. Dis. Child.*, 51, 865.
- WADSTRÖM, T., AUST-KETTIS, A., HABTE, D., HOLMGREN, J., MEEUWISSE, G., MÖLLBY, R. & SÖDERLIND, O. (1976b). New enterotoxigenic bacteria isolated. *Br. Med. J.*, 1, 1401.
- WADSTRÖM, T., LJUNGH, A. & WRETLIND, B. (1976c). Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 84, 112.
- WATANABE, T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, 27, 87.
- WATANABE, T. (1971). Infectious drug resistance in bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 56, 43.
- WELSH, A.B. (1971). Purification, morphology and partial characterization of a reovirus-like agent associated with neonatal calf diarrhoea. *Can. J. Comp. Med.*, 35, 195.
- WHITE, G.B.B., ASHTON, C.I., ROBERTS, C. & PARRY, H.E. (1974). "Rotavirus" in gastroenteritis. *Lancet* 2, 726.
- WILLIAMS, P.H., EVANS, N., TURNER, P., GEORGE, R.H. & McNEISH, A.S. (1977). Plasmid mediating mucosal adherence in human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 1, 1151.
- WINDLE-TAYLOR, E. (1958). *The examination of waters and water supplies* (Thresh, Beale & Suckling). 7th edition. London, J & A Churchill Ltd.
- WOLF, H.W. (1972). The coliform count as a measure of water quality. In *Water Pollution Microbiology*. Edited by R. Mitchell. New York, Wiley.
- WOODE, G.N. (1969). Transmissible gastroenteritis of swine. *Vet. Bull.*, 39, 239.
- WOODE, G.N., BRIDGER, J.C., HALL, G.A. & DENNIS, M.J. (1974). The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum-deprived calves in Great Britain. *Res. Vet. Sci.*, 16, 102.

- WOODE, G.N., BRIDGER, J., HALL, G.A., JONES, J.M. & JACKSON, G. (1976). The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis of piglets. *J. Med. Microbiol.*, 9, 203.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1963). *International standards for drinking-water*. 2nd edition. Geneef, Palais des nations.
- YOKOTA, T., KASUGA, T., KANEKO, M. & KUWAHARA, S. (1972). Genetic behaviour of R factors in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 109, 440.
- YOW, M.D., MELNICK, J.L., BLATTNER, R.J. & RASMUSSEN, L.E. (1963). Enteroviruses in infantile diarrhea. *Am. J. Hyg.*, 77, 283.
- ZENSER, T.V. & METZGER, J.F. (1974). Comparison of the action of *Escherichia coli* enterotoxin on the thymocyte adenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate system to that of cholera toxin and prostaglandin E₁. *Infect. Immun.*, 10, 503.
- ZIEVE, P.D., PIERCE, N.F. & GREENOUGH, W.B. (1970). Stimulation of glycogenolysis by purified cholera enterotoxin in disrupted cells. *Clin. Res.*, 18, 690.