

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et les chats :**III) Données bactériologiques et cliniques sur les souches nécrotoxigènes et sur celles positives pour des adhésines**

MAINIL J., WILBAUX M., JACQUEMIN E., OSWALD E. *, IMBERECHTS H.**, VAN BOST S.

Chaire de Bactériologie et de Pathologie des Maladies Bactériennes,
Faculté de Médecine Vétérinaire,
Université de Liège,
Sart Tilman, Bât B43a
B-4000 Liège

* Ecole Nationale Vétérinaire, Chemin des Capelles, 23, F-31076, Toulouse, France

** Centre d'Etudes et de Recherche Vétérinaires et Agrochimiques, Groeselenberg, 99, B-1180 Bruxelles

Correspondance : MAINIL J.

Tél : 32-(0)4-366 40 50

FAX : 32-(0)4-366 41 22

Email : jg.mainil@ulg.ac.be

RÉSUMÉ: Le but de cette étude était de typer 25 souches nécrotoxigènes de type 1 (NTEC1), une souche nécrotoxigène de type 2 (NTEC2) et 16 souches non-nécrotoxigènes d'*Escherichia coli* isolées, entre 1979 et 1993, de matières fécales, de contenu intestinal ou d'organes internes de chiens et de chats, en suivant un schéma uniforme et standardisé de tests, comme cela avait été réalisé précédemment sur des souches NTEC1 et NTEC2 bovines, humaines et porcines (Mainil *et al.*, 1999). Les résultats obtenus par hybridation sur colonies et PCR sur les souches NTEC1 étaient assez homogènes : 18 souches contenaient des séquences reliées aux gènes *prs* et *sfa/foc*; 5 souches contenaient des séquences reliées aux gènes *sfa/foc*; une souche contenait des séquences reliées aux gènes *prs*; et une souche était négative, comme l'était la souche NTEC2. Quelques-unes des souches NTEC1 seulement étaient positives pour la présence de séquences reliées aux gènes *f17*, *afa* ou *cdt*. Toutes les souches NTEC1 et la souche NTEC2 produisaient une zone d'hémolyse sur gélose au sang de mouton et, à une souche près, étaient résistantes à l'activité bactéricide du sérum. Par contre, très peu produisaient une aérobactine ou une colicine. Peu d'antigènes somatiques portés par ces souches ont pu être identifiés avec les immunsérums utilisés, mais toutes les souches NTEC1, sauf une, appartenaient au biotype 9. Le profil le plus typique des souches NTEC1 canines et félines étudiées peut donc se définir comme suit : CNF1+Prs+S+Hly+Bio9+. Les résultats obtenus sur les souches non-nécrotoxigènes étaient plus hétérogènes : deux souches contenaient des séquences reliées aux gènes *pap/prs* et *sfa/foc*; 10 souches contenaient des séquences reliées aux gènes *pap/prs*; et quatre souches contenaient d'autres séquences d'ADN. Les résultats des tests phénotypiques étaient également plus hétérogènes. Les souches NTEC1 avaient été isolées à partir d'animaux essentiellement jeunes (< 3 mois chez 16 animaux sur 22), avec certains individus âgés cependant de plusieurs années. Les pathologies digestives étaient des diarrhées/entérites non hémorragiques dans la majorité des cas. Lorsque des diarrhées/entérites hémorragiques étaient observées, d'autres agents infectieux étaient présents ou soupçonnés (parvovirus, *Salmonella*). Les pathologies extra-intestinales étaient surtout des colibacillooses septicémiques/systémiques, avec un cas de métrite nécro-hémorragique. Les souches NTEC1 et non-NTEC étudiées étaient peu résistantes aux antibiotiques testés. Le plus grand nombre de résistances aux antibiotiques s'exprimaient vis-à-vis de l'ampicilline, l'association triméthoprimé/sulfamidés et la néomycine.

INTRODUCTION

Escherichia coli est une bactérie aéro-anaérobie qui fait partie de la flore commensale de l'intestin des animaux à sang chaud (Bettelheim, 1997). Essentiellement non pathogène, cette espèce bactérienne comprend divers types de souches pathogènes qui ont évolué depuis l'ancêtre commun par acquisition de séquences d'ADN codant pour des facteurs et propriétés de virulence sur des îlots de pathogénicité, sur des plasmides et/ou sur des prophages (O'Brien et Holmes, 1987; Couturier *et al.*, 1988; Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000; Oelschlaeger et Hacker, 2000; Saunders, 2000; Toth, 2000). Ces souches pathogènes montrent différents tropismes de tissus et d'organes (souches entéropathogènes, souches uropathogènes, souches septicémiques, souches systémiques) et sont reconnaissables aux combinaisons de facteurs, de propriétés et de marqueurs de virulence qu'elles produisent (Nataro et Kaper, 1998; De Rycke *et al.*, 1999; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Mainil, 1999; Milon *et al.*, 1999; Nagy et Fekete, 1999).

Ces diverses souches pathogènes sont surtout connues et caractérisées dans l'espèce humaine (Nataro et Levine, 1994; Nataro et Kaper, 1998), ainsi que chez les animaux de rente (De Rycke *et al.*, 1999; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Mainil, 1999; 2000; Milon *et al.*, 1999; Nagy et Fekete, 1999). Certaines existent aussi chez les animaux de compagnie comme les chiens et les chats (Broes, 1993; Peeters, 1994; Beutin, 1999).

Des travaux récents par hybridation ADN-ADN sur colonies (Mainil *et al.*, 1998) ont permis de reconnaître quatre grands groupes de souches potentiellement pathogènes au sein d'une collection d'un millier de souches canines et félines : entéropathogènes au sens strict (EPEC), entérotoxigènes (ETEC), nécrotoxigènes (NTEC) et celles positives seulement avec des sondes dérivées de gènes codant pour des adhésines (P, S, F17 et/ou Afa), que nous appellerons pour la facilité AdEC ("Adhésin-*positive* E. coli"). Les souches NTEC1 et AdEC peuvent être associées à des infections digestives chez ces espèces animales hôtes, mais le sont plus souvent à des infections extra-intestinales, septicémiques, sys-

témiques ou urinaires (Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999).

Nonante-six souches canines et 33 souches félines NTEC1 avaient ainsi été identifiées ainsi que trois souches canines NTEC2 (Mainil *et al.*, 1998). La très grande majorité de ces souches étaient aussi positives avec des sondes génétiques dérivées des sondes dérivées de gènes codant pour des adhésines (P, S, F17 et/ou Afa). D'autre part, 112 souches canines et 23 souches félines AdEC avaient aussi été identifiées (Mainil *et al.*, 1998). Les buts des travaux rapportés ici sur ces souches NTEC et AdEC étaient les suivants :

- (i) déterminer leurs biotypes et leurs sérotypes et compléter leurs pathotypes, afin de les comparer à ceux des souches NTEC1 bovines, humaines et porcines (Mainil *et al.*, 1999);
- (ii) effectuer une enquête anamnesticque rétrospective afin de décrire les troubles cliniques associés à l'infection par ces souches NTEC1 et AdEC;
- (iii) rapporter la sensibilité aux antibiotiques de ces souches.

MATERIELS ET METHODES

Souches bactériennes : Les 38 souches d'*Escherichia coli* canines et les quatre souches félines étudiées (Mainil *et al.*, 1998) ont été isolées, dans les Facultés de Médecine Vétérinaire des Universités de Liège, de Glasgow (Pr David J. Taylor) et de Gent (Pr Fred Haesebrouck et Dr Luc Devriese), à partir des matières fécales ou du contenu intestinal après autopsie (21 souches), de divers organes internes ou de la peau (10 souches), ou du contenu intestinal et d'organes internes (quatre souches), entre 1979 et 1993. L'origine est inconnue pour les sept dernières souches. Ces souches ont été choisies parmi celles qui ont pu être revivifiées *in vitro* à partir de la collection conservée sur milieu Dorset à l'œuf (Cowan et Steel, 1993), sur base du critère d'une souche par animal.

Données cliniques : La recherche des données cliniques s'est faite en consultant les dossiers des services d'Autopsies et de Médecine interne des petits animaux des Facultés de Liège et de Gent.

Tests phénotypiques : Les tests phénotypiques comprennent le sérotypage, le biotypage, la recherche de la production d'une hémolysine (α , β ou entérique), d'une aérobactine, d'une colicine (I, V ou inconnue) et la résistance à l'activité bactéricide du sérum. Ces tests ont été réalisés selon les techniques décrites antérieurement (Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992). Le sérotypage a été limité à la recherche des sérogroupes somatiques O2, O4, O9, O78, O141, O153 et O157, qui correspondent à des sérogroupes somatiques O de souches d'*E. coli* canines et félines (Broes, 1993; Peeters, 1994; Beutin, 1999), ainsi que de souches NTEC1 pour les porcs, les bovins et l'homme (Blanco *et al.*, 1990; 1992; Pohl *et al.*, 1992; Bertin *et al.*, 1998; De Rycke *et al.*, 1999; Mainil *et al.*, 1999).

Tests génétiques : Les sondes génétiques (Tableau I) correspondent à diverses toxines et adhésines avec lesquelles les souches NTEC1 bovines, humaines ou porcines sont positives (Blanco *et al.*, 1990; 1992; 1997; Pohl *et al.*, 1992; Dozois *et al.*, 1997; Mainil *et al.*, 1997; 1999; Bertin *et al.*, 1998; Milon *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001a). Les tests d'hybridation sur colonies ont été réalisés comme décrit antérieurement (Mainil *et al.*, 1997). Les réactions PCR (Tableau II) correspondent à différents variants de ces différentes toxines et adhésines pour lesquelles les souches canines et félines étudiées étaient positives. Les conditions des réactions PCR sont celles décrites dans les références citées (Tableau I). Les souches colibacillaires contrôles positives étaient les suivantes :

J96	(CNF1+Pap+Prs+F1C+),
28c	(CNF1+CDT-IV+Pap+Sfa+),
1404	(CNF2+CDTIII+F17b+),
239KH89	(CNF1+AfaVIII+),
C600[pDS7.96]	(CDTI+),
C600[pCP2123]	(CDTII+),
C600[pANN801.13]	(Sfa+);

la souche contrôle négative était HS, isolée à partir des matières fécales d'un être humain en bonne santé.

Les plasmides ont été extraits des souches NTEC2 et hybridés avec la sonde pEOSW03 (Tableau I), selon une adaptation de la méthode de Kado et Liu décrite antérieurement (Broes *et al.*, 1988). Le plasmide contrôle positif provenait de la souche 1404.

Tableau I : Dérivation et spécificité des sondes génétiques utilisées.

Nom et Référence	Gène d'origine	Obtention	Taille (pb)	Spécificité
pEOSW01	<i>cnf2</i>	<i>Pst</i> I+ <i>Cla</i> I	335	toxines CNF1 et CNF2
pEOSW03 (Oswald <i>et al.</i> , 1994)	<i>cnf2</i>	<i>Xho</i> I+ <i>Pst</i> I	875	toxines CNF2
CDT-I	<i>cdtB-1</i>	PCR	412	toxines CDT-I/(IV)*
CDT-II	<i>cdtB-2</i>	PCR	558	toxines CDT-II/III
CDT-III	<i>cdtB-3</i>	PCR	558	toxines CDT-III/II
CDT-IV (Oswald, données non publiées ; Van Bost <i>et al.</i> , 2001a)	<i>cdtB-4</i>	PCR	350	toxines CDT-IV/(I)*
P	<i>pap21</i>	PCR	328	fimbriae P
S	<i>sfa</i>	PCR	410	fimbriae S
Afa (Le Bouguéneq <i>et al.</i> , 1992)	<i>afa-3</i>	PCR	750	adhésines Afa
AfaE-VIII (Lalioui <i>et al.</i> , 1999)	<i>afaE-8</i>	PCR	302	variant Afa-VIII des adhésines Afa
F17 (Mainil <i>et al.</i> , 1997)	<i>f17</i>	<i>Hind</i> III+ <i>Bam</i> HI	1200	fimbriae F17

* Hybridation croisée observée ou non selon les conditions (84% d'homologie de séquence)

Tableau II : Spécificité des réactions PCR de typage utilisées.

Propriété	Gène	Taille des amplicons	Références
Toxine CNF1	<i>cnf1</i>	760	Oswald, données non publiées ; Van Bost <i>et al.</i> , 2001a
Toxine CNF2	<i>cnf2</i>	760 + 1243	
Fimbriae Pap	<i>papG-II</i>	190	Johnson et Brown, 1996
Fimbriae Prs	<i>papG-III (prsG)</i>	258	
Fimbriae Sfa	<i>sfaS</i>	240	Johnson et Stell, 2000
Fimbriae FIC	<i>focG</i>	360	
Fimbriae F17	<i>f17A</i>	537	Bertin <i>et al.</i> , 1996
Adhésine Afa-VIII	<i>afaE-8</i>	302	Lalioui <i>et al.</i> , 1999

Sensibilité aux antibiotiques: La sensibilité à divers antibiotiques de ces mêmes 42 souches a été étudiée par diffusion en gélose Mueller-Hinton II, selon la méthode des disques en suivant les instructions du fournisseur (Becton-Dickinson, Erembodegem).

RESULTATS

Pathotypie par tests génétiques.

Vingt-trois souches ont été confirmées comme NTEC1 par hybridation

sur colonies et tests PCR (Tableau III). Deux autres souches ont été confirmées comme NTEC1 par PCR ; l'une était négative aux sondes CNF, tandis que l'autre donnait un profil d'hybridation plus typique des souches NTEC2. Une seconde souche donnait ce profil d'hybridation typique d'une souche NTEC2 et fut confirmée comme NTEC2 par PCR (Tableau III). Une bande plasmidique de cette souche hybridait avec la sonde pEOSW03 spécifique du gène *cnf2*. Parmi ces 26 souches NTEC1 ou NTEC2, trois étaient positives par

hybridation sur colonies pour la toxine CDT-IV (Tableau III).

Vingt-quatre des 25 souches NTEC1 étaient positives avec les sondes pour des adhésines de la famille P et/ou S, mais pas avec la sonde Afa, ni avec la sonde F17 (Tableau III). Les 19 souches positives à la sonde P l'étaient à la PCR pour le variant PrsG (PapGIII). Par contre les 23 souches positives à la sonde S donnaient des résultats variables par PCR spécifiques des variants Sfa ou FIC de cette famille (Tableau III). La souche NTEC2 était négative aux sondes P, S, Afa, F17 et CDT (Tableau III). Les résultats négatifs obtenus avec la sonde Afa furent confirmés avec la sonde AfaE-VIII.

Les seize autres souches étaient négatives aux sondes et aux PCR pour les toxines CNF, mais l'une d'entre elles était positive pour la toxine CDT-IV par hybridation sur colonies (Tableau III). Deux autres souches étaient positives aux sondes P et S, et 10 à la sonde P, dont une était aussi positive à la sonde Afa et deux à la sonde F17. Deux autres souches étaient positives à la sonde Afa, et une, à la sonde F17 (Tableau III).

Par contraste avec les souches

Tableau III : Sérogroupes O, biotypes et pathotypes des souches NTEC et AdEC canines et félines étudiées.

No. souche	Séro groupe O	Bio type	Sondes génétiques							Tests PCR					Hé moly sine	Aéro bac tine	Résis tance sérum	Coli cine
			CNF	CDT	P	S	Afa	F17	CNF	P	S	Afa	F17					
11483	-	9	2±	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				α	-	+	I
8528	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				α	-	+	-
8626	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				α	-	+	-
14288	4	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				β	-	+	-
38045	-	9	1+	4+	+	+	-	-	1	Prs	F1C				β	-	+	-
8576	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				β	-	+	-
8610	4	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				β	-	+	-
24874	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				β	-	+	-
687	4	2	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	F1C				β	-	+	-
8567	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	Sfa				α	-	+	-
8495	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	Sfa				β	-	+	-
8529	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	-				α	-	+	-
8579	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	-				α	-	+	-
8577	-	9	1+	4+	+	+	-	-	1	Prs	-				β	-	+	-
8589	-	9	1+	4+	+	+	-	-	1	Prs	-				β	-	+	-
8563	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	-				β	-	+	-
7154	-	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	-				β	-	+	-
8530	9	9	1+	-	+	+	-	-	1	Prs	-				β	-	-	-
6730	141	9	1+	-	+	-	-	-	1	Prs					β	+	+	+
46041	2	9	1+	-	-	+	-	-	1	Sfa/F1C					β	+	+	-
30554	-	9	1+	-	-	+	-	-	1	F1C					β	-	+	V
24892	-	9	1+	-	-	+	-	-	1	F1C					β	-	+	-
31915	-	9	1+	-	-	+	-	-	1	F1C					β	-	+	-
10902	-	9	1+	-	-	+	-	-	1	-					β	-	+	+
12055	-	9	-	-	-	-	-	-	1						β	-	+	+
10725	-	1	2±	-	-	-	-	-	2						β	-	+	-
14368	-	9	-	-	+	+	-	-	-	-	F1C				β	-	+	I
44584	-	9	-	-	+	+	-	-	-	Pap	-				-	-	+	-
43792	-	1	-	-	+	-	-	-	-	Pap					-	+	+	+
25031	-	1	-	-	+	-	-	-	-	Pap					-	-	+	-
43267	-	14	-	-	+	-	-	-	-	Pap					-	-	+	-
25034	-	10	-	-	+	-	-	+	-	-			+		-	+	+	-
37020	-	1	-	-	+	-	-	±	-	-			-		-	-	-	-
24890	-	14	-	-	+	-	-	-	-	-					-	-	+	-
24992	-	1	-	-	+	-	-	-	-	-					-	-	+	-
26968	-	10	-	-	+	-	-	-	-	-					-	+	-	+
42432	9	1	-	-	+	-	-	-	-	-					-	+	-	+
8523	-	10	-	-	+	-	+	-	-	-	VIII				-	+	+	+
8569	-	1	-	-	-	-	+	-	-	-	VIII				-	+	+	-
29434	-	9	-	-	-	-	+	-	-	-			-		-	+	+	-
34955	-	14	-	-	-	-	-	±	-	-			-		-	-	-	-
6927	-	1	-	4+	-	-	-	-	-	-					-	-	+	V

No. souche: les souches 14288, 687, 46041 et 6927 sont d'origine féline

Séro groupe O: identifié (2, 4, 9, 141) ou non identifié (-)

Biotype: numéro du biotype identifié (1 à 16)

Sondes génétiques: profil d'hybridation pour la toxine CNF ou CDT correspondante (1+, 2+, 3+, 4+); hybridation positive (+) ou négative (-) avec les sondes P, S, Afa ou F17 (voir Tableau II)

Tests PCR: test positif pour le variant correspondant (1, Prs, Pap, F1C, Sfa, VIII); tests PCR négatifs (-); tests PCR non faits (cases vides)

Hémolysine: production d'une hémolysine alpha ou beta; souche non hémolytique (-)

Aérobactine: production (+) ou non (-) d'une aérobactine

Résistance au sérum: souche résistante (+) ou sensible (-) à l'activité bactéricide du complément

Colicine: production d'une colicine V ou I; production d'une colicine non identifiée (+); souche non colicinogénique (-)

Test non fait (case vide)

NTEC1, les résultats de typage par PCR des 12 souches positives à la sonde P étaient positifs pour le variant PapGII ou négatifs pour les variants PapGII et PrsG (Tableau III). Les résultats de typage des deux souches positives à la sonde S étaient aussi variés. Deux des trois souches positives à la sonde Afa ont donné des résultats positifs avec la sonde AfaE-VIII et la PCR pour le gène *afaE-8*, tandis que la troisième donnait des résultats négatifs à ces deux mêmes tests (Tableau III). Cette souche n'a pas été étudiée plus loin. Une seule des trois souches positives à la sonde F17 (celle dont le résultat était le plus

contrasté) donnait un résultat positif à la PCR de famille des gènes *f17A* (Tableau III). Cette souche n'a pas été typée plus loin, pas plus que les deux souches négatives. D'après cet ensemble de résultats, quatorze de ces seize souches peuvent être qualifiée de souches AdEC, comme défini dans l'introduction.

Pathotypie par tests phénotypiques.

Toutes les souches NTEC1 et la souche NTEC2 produisent une hémolyse de type α ou β et toutes, sauf une, résistent à l'activité bactéricide

du sérum (Tableau III). Par contre, deux souches seulement produisent une aérobactine et six, une colicine (Tableau III). Les résultats sont différents (surtout la production d'une hémolysine) et plus variables pour les 14 souches AdEC, mais la propriété de résistance à l'activité bactéricide du sérum reste la plus fréquente (Tableau III).

Sérotypie.

Sept souches seulement ont donné une réponse positive vis-à-vis de l'un des sérums utilisés. Le sérotype O4 était le plus fréquent (trois souches).

Tableau IV : Regroupement des souches NTEC et AdEC canines et félines étudiées en fonction des pathotypes les plus fréquents observés.

Pathotype de base	No. souches	Sondes adhésines	PCR adhésines	Phéno type	Bio type	Origine °				
						I	E	I + E	?	
NTEC1	neuf*	P+S+	Prs/F1C	Hly/RS	9***	3	2	2	2	
	deux	P+S+	Prs/Sfa	Hly/RS	9	1		1		
	sept	P+S+	Prs/?	Hly/RS*	9	1	6			
	une	P+	Prs	Hly/RS	9		1			
	une**	S+	Sfa/F1C	Hly/RS	9	1				
	trois	S+	F1C	Hly/RS	9	3				
	une	S+	?	Hly/RS	9				1	
	une	-		Hly/RS	9				1	
	NTEC2	une	-		Hly/RS	1				1
	AdEC	une	P+S+	Pap/?	RS	9	1			
une		P+S+	?/F1C	Hly/RS	9				1	
trois		P+	Pap	RS	var	3				
cinq		P+	?	var	var	5				
une		P+F17+	?/NF	Aer/RS	10	1				
une		P+Afa+	?/VIII	Aer/RS	10		1			
une		Afa+	VIII	Aer/RS	1		1			
une	Afa+	?	Aer/RS	9		1				

No. souches: *dont deux souches d'origine féline (14288 et 687);

**souche d'origine féline (46041)

Sondes adhésines: hybridation avec les sondes P, S, F17 et/ou Afa; absence d'hybridation avec ces quatre sondes (-) (Tableau III)

PCR adhésines: test positif pour le variant correspondant (Prs, Pap, F1C, Sfa, VIII);

variant non identifié (?); tests non faits (NF) (voir Tableau III)

Phénotype: souche hémolytique (Hly); production d'aérobactine (Aer); souche résistante à l'activité bactéricide du complément (RS); résultats différents selon les souches (var)

Biotype: numéro du biotype identifié (1 à 16); différents biotypes identifiés (var); une souche n'appartient pas au biotype 9 (***)

Origine: intestinale (I); extra-intestinale (E)

Tableau V : Données cliniques sur les souches NTEC et AdEC canines et félines étudiées.

Pathotype de base	No. souche	Race	Sexe	Age	Signes cliniques/ Lésions nécropsiques	Origine de la souche	Co-infection ^a
NTEC1	8495	NR	?	?	Diarrhée	matières fécales	NR
	8528	bichon maltais	M	10 s	Entérite catarrhale, dégénérescence cardiaque	intestin + organes internes	Parvovirus ?
	8529	bobtail	M	2 m	Entérite hémorragique, dégénérescence cardiaque	rein	Parvovirus ?
	8563	caniche nain	F	10 s	entérite catarrhale et fibrineuse, néphrose	rein	Parvovirus ?
	8567	bichon maltais	F	2 m	Entérite hémorragique	organes internes	Parvovirus ?
	8576	West Highland white terrier	F	6 s	Morts subites dans la nichée, entérite fibrineuse	foie, rate	-
	8577	teckel	F	7 a	Métrite hémorragique nécrosante, œdème pulmonaire	utérus, foie, rate	-
	8589	NR	?	?	Diarrhée	matières fécales	NR
	8610	NR	?	?	Diarrhée	matières fécales	NR
	8626	yorkshire	M	2 m	Entérite hémorragique, dégénérescence hépatique et rénale, emphysème pulmonaire	ntestin + tous les organes internes	-
	24874	cocker	M	2 m	Diarrhée hémorragique	intestin	-
	24892	collie	F	12 a	Diarrhée hémorragique vomissements	matières fécales	-
	30554	NR	F	?	Diarrhée	matières fécales	ETEC
	31915	caniche	?	?	Diarrhée	matières fécales	spirochètes
	38045	schnauzer	?	?	Diarrhée	matières fécales	-
	46041 ^b	NR	M	8 m	Diarrhée	matières fécales	-
AdEC	8569	labrador	F	2 m	Entérite catarrhale,	poumon, rate	Giardia +++
	8523	yorshire	F	2 m	Entérite hémorragique, dégénérescence des organes	intestin + organes internes	Parvovirus ?
	24890	NR	?	2 m	Diarrhée, pneumonie interstitielle	intestin	-
	24992	West Highland white terrier	?	2 m	Diarrhée	matières fécales	-
	25031	NR	?	?	Diarrhée	matières fécales	<i>Salmonella</i> Typhimurium
	25034	pékinois	?	9 s	Entérite aiguë hémorragique	intestin	-/autopsié
	26968	NR	?	2 m	Diarrhée	matières fécales	-
	29434	bouvier	F	4 a	Diarrhée	matières fécales	-
	34955	NR	M	3 m	Diarrhée	matières fécales	ETEC/levures
	37020	NR	M	6 a	Diarrhée	matières fécales	-
	42432	berger belge	M	2 m	Diarrhée	matières fécales	-
	43267	berger laekenois	F	3 m	Diarrhée hémorragique	intestin	-
	43792	labrador	F	11 m	Diarrhée	matières fécales	-
	44584	NR	?	?	Diarrhée	matières fécales	-

NR = non renseigné ; NF = non fait ; F = femelle ; M = mâle ; j = jours ; s = semaines ; m = mois ; a = année.

^a La recherche de co-infections bactérienne, parasitaire et/ou virale n'a pas été faite systématiquement.

^b Souche d'origine féline

Biotypie.

Les résultats de la biotypie ont montré une grande homogénéité des souches NTEC1, quelle que soit leur origine et en contraste avec les souches AdEC (Tableau III). En effet, 24 d'entre elles sur 25 appartenaient au biotype 9. Trois souches AdEC appartenaient aussi à ce biotype, mais pas la souche NTEC2 (Tableau III).

Combinaison des résultats.

Les résultats de typage peuvent être assemblés pour tenter de définir des profils pour les souches NTEC et AdEC (Tableau IV). Le profil typique d'une souche NTEC1 était : PrsG+S+Hly+RS+biotype9. Ces souches peuvent avoir une origine intestinale comme extra-intestinale. En tout point, les souches AdEC, dont la majorité sont d'origine intestinale, ont donné des profils plus variables (Tableau IV).

Données cliniques.

Les données cliniques recueillies pour 29 chiens de différentes races et un chat montrent une association avec des troubles et lésions autant digestifs que généralisés, essentiellement chez des animaux jeunes (< 3 mois) (Tableau V). Deux tableaux cliniques prédominaient : soit des diarrhées/entérites aiguës, hémorragiques ou non; soit des mortalités suite à un état septicémique. Quand la souche était isolée d'un organe interne, elle était hémolytique sur gélose au sang de mouton, tandis que les souches isolées de l'intestin pouvaient ou non l'être. Les tableaux cliniques et lésionnels chez les quatre animaux âgés de 4 à 12 ans étaient centrés sur le tractus digestif chez trois d'entre-eux et un problème de métrite nécro-hémorragique chez le quatrième.

Des infections bactériennes ou infestations parasitaires concomitantes ont été observées chez cinq chiens. Des infections à parvovirus étaient soupçonnées chez divers animaux avec entérite hémorragique et dégénérescence des parenchymes.

Antibiogramme.

Les 42 souches testées présentaient certaines résistances aux antibiotiques utilisables en pathologie digestive ou systémique (Tableau VI),

notamment l'ampicilline, l'association triméthoprim/sulfamidés et la néomycine. Par contre, l'association amoxicilline/acide clavulanique était encore très fréquemment active. Enfin, aucune résistance n'a été observée vis-à-vis de la gentamicine ou de l'enrofloxacin. Les résistances étaient plus fréquentes parmi les souches AdEC que NTEC.

DISCUSSION

Les souches nécrotoxigènes d'*Escherichia coli* (NTEC1 et NTEC2) sont associées à des pathologies intestinales et extra-intestinales chez diverses espèces animales et chez l'homme (De Rycke *et al.*, 1999). Les souches NTEC les plus étudiées et les mieux caractérisées à ce jour sont celles des bovins, des humains et des porcins. A côté des toxines CNF1 et CNF2, leurs autres facteurs potentiels de virulence sont : toxines CDT, hémolysines α ou β , adhésines fimbriaires (P, S, F17), adhésines afimbriaires (Afa), production de chélateur du Fer (aérobactine) et/ou résistance à l'activité bactéricide du complément ("résistance au sérum") (Blanco *et al.*, 1990; 1992; 1997; Pohl *et al.*, 1992; Dozois *et al.*, 1997; Mainil *et al.*, 1997; 1999; 2000a; Bertin *et al.*, 1998; De Rycke *et al.*, 1999; Gérardin *et al.*, 2000).

Les souches NTEC1 peuvent aussi être isolées d'infections intestinales et extra-intestinales et de matières fécales d'individus sains chez des carnivores domestiques, chiens et chats (Mainil *et al.*, 1998; Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999). Cependant, ces souches sont moins bien caractérisées que les précédentes, mis-à-part la production d'adhésines fimbriaires de la famille P et d'hémolysine α (Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999). Les résultats des tests de typage effectués au cours de ce travail confirment ces données et les étendent à d'autres propriétés, concernant essentiellement les adhésines de la famille S et la résistance au sérum, que ces souches soient d'origine intestinale ou extra-intestinale (Tableau IV).

Les tests de typage par PCR donnent des résultats uniformes pour les adhésines de la famille P (toutes sont du type Prs), mais plus variables pour celles de la famille S (Sfa, F1C ou intypable) (Tableau IV). Toute souche positive à une sonde génétique, mais

négative aux PCR existantes, peut renfermer un nouveau variant de ces gènes. Des résultats similaires ont été obtenus avec des souches NTEC1 et NTEC2, voire non-NTEC, bovines et porcines pour les gènes *pap/prs*, *sfa/foc*, *f17* et *afa* (Bertin *et al.*, 1996; Dozois *et al.*, 1997; Mainil *et al.*, 1997; 1999; 2000a) et ont permis dans le passé la description du variant Afa-VIII de cette famille d'adhésines afimbriaires (Lalioui *et al.*, 1999; Gérardin *et al.*, 2000).

Remarquons que des discordances entre les résultats des tests par hybridation sur colonies et par PCR sont aussi observées pour les gènes *cnf* dans deux souches (11483 et 12055). Ce genre d'observation est régulière quel que soit le gène recherché et trouve son origine dans un problème technique lors de la réalisation du test d'hybridation sur colonies ou dans un problème d'interprétation des résultats, notamment avec les sondes pour les gènes *cnf* pour lesquelles cette interprétation peut être difficile (Oswald *et al.*, 1994).

L'association entre la toxine CNF1, les hémolysines α ou β et les adhésines Prs est tout à fait classique pour les souches NTEC1 bovines, humaines et porcines et les souches NTEC1 canines et félines ne s'éloignent pas de ce profil général (Dozois *et al.*, 1997; Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999; Mainil *et al.*, 1999). Il est donc très probable qu'elles renferment aussi un îlot de pathogénicité de type 5 (Pai-5) sur lequel se retrouvent adjacents les gènes qui codent pour ces trois propriétés (De Rycke *et al.*, 1999; Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000). De même, les proportions de souches positives avec les sondes et/ou les PCR pour les adhésines F17, Afa, Afa-VIII et les toxines CDT sont faibles et comparables à celles observées pour les souches NTEC1 bovines, humaines et porcines (Mainil *et al.*, 1999; Gérardin *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 1994; Mainil, résultats non publiés).

Les résultats des tests de production d'aérobactine pour lesquelles 4% des souches NTEC1 canines et félines sont positives (Tableau III) diffèrent fortement de ceux obtenus sur les souches NTEC1 bovines (78% positives), humaines (40% positives) et porcines (64% positives) tandis que ceux des tests de production de colicine sont comparables (20% posi-

Tableau VI : Sensibilités et résistances aux antibiotiques des souches NTEC et AdEC canines et félines étudiées.

No. souche	N T E C	Antibiotiques						
		Ampicilline	Gentamicine	Enrofloxacin	Triméthopime, Sulfamidés	Amoxicilline/ Acide clavulanique	Céphalotine	Néomycine
11483	1	S	S	S	S	S	S	S
8528	1	S	S	S	S	S	S	S
8626	1	S	S	S	S	S	I	S
14288	1	R	S	S	R	R	R	R
38045	1	S	S	S	S	S	S	S
8576	1	S	S	S	S	S	S	S
8610	1	S	S	S	S	S	I	S
24874	1	S	S	S	S	S	I	S
687	1	S	S	S	S	S	S	S
8567	1	S	S	S	S	S	I	S
8495	1	S	S	S	S	S	S	S
8529	1	S	S	S	R	S	S	S
8579	1	S	S	S	S	S	S	S
8577	1	S	S	S	S	S	S	S
8589	1	S	S	S	S	S	I	S
8563	1	R	S	S	R	S	I	R
7154	1	S	S	S	S	S	S	S
8530	1	S	S	S	S	S	S	S
6730	1	S	S	S	S	S	S	S
46041	1	S	S	S	S	S	I	S
30554	1	S	S	S	S	S	S	S
24892	1	S	S	S	S	S	S	S
31915	1	S	S	S	S	S	S	S
10902	1	S	S	S	S	S	I	S
12055	1	S	S	S	S	S	S	S
10725	2	S	S	S	S	S	I	I
14368	-	S	S	S	S	S	I	S
44584	-	S	S	S	S	S	I	S
43792	-	S	S	S	R	S	S	I
25031	-	S	S	S	R	S	S	R
43267	-	R	S	S	R	S	S	R
25034	-	R	S	S	R	S	S	R
37020	-	R	S	S	S	S	I	R
24890	-	R	S	S	R	S	S	R
24992	-	R	S	S	S	R	R	R
26968	-	R	S	S	S	S	I	R
42432	-	R	S	S	R	I	I	S
8523	-	R	S	S	R	I	I	R
8569	-	R	S	S	R	S	I	R
29434	-	R	S	S	S	S	S	S
34955	-	R	S	S	S	I	S	S
6927	-	S	S	S	S	S	I	S
TOTAL S	1	23	25	25	22	24	16	23
	2	1	1	1	1	1	-	-
	-	5	16	16	8	12	7	6
TOTAL I	1	-	-	-	-	-	8	-
	2	-	-	-	-	3	1	1
	-	-	-	-	-	-	8	1
TOTAL R	1	2	-	-	3	1	1	2
	2	-	-	-	-	-	-	-
	-	11	-	-	8	1	1	9

No. souches: les souches 14288, 687, 46041 et 6927 sont d'origine féline

S = souche sensible à l'antibiotique

I = souche de sensibilité intermédiaire à l'antibiotique

R = souche résistante à l'antibiotique

tives par rapport à 22-34%) (Mainil *et al.*, 1999).

Si les résultats concernant le sérogroupage ne permettent pas d'individualiser les souches NTEC1 canines et félines de leurs homologues bovines, humaines et porcines, les résultats de la biotypie sont, par contre, remarquables puisque 24 des 25 souches appartiennent au biotype 9 (Tableaux III et IV). Par contraste, ce biotype n'est trouvé que chez une minorité de souches NTEC1 bovines, humaines et porcines (Mainil *et al.*, 1999). Il faut remarquer que le biotype 9 fermente le sorbose (Crichton et Old, 1982), une propriété qui, avec la production d'une hémolysine, avait déjà été associée aux souches NTEC1 (Pohl *et al.*, 1993). Nos résultats confortent donc cette association.

La combinaison des différents résultats a ainsi permis de définir un profil assez typique, mais pas exclusif, des souches NTEC1 canines et félines (Tableau IV):

CNF1+Prs+S+Hly+Biotype9. Ce profil est plus précis que ceux obtenus sur souches NTEC1 bovines, humaines et porcines (Dozois *et al.*, 1997; Mainil *et al.*, 1997; 1999; Gérardin *et al.*, 2000). Mais des analyses sur de plus grands nombres de souches d'origines diverses permettront de confirmer ces résultats ou de montrer qu'il s'agit d'un effet du hasard de l'échantillonnage, bien que les souches de cette étude ne soient pas reliées entre elles. Cette homogénéité de résultats contraste avec l'hétérogénéité de ceux obtenus sur les souches AdEC (Tableau IV), notamment pour les biotypes, les adhésines de la famille P et la résistance au sérum. Remarquons aussi que ces souches sont rarement hémolytiques sur gélose au sang, mais produisent plus souvent une aérobactine, bien que leur origine soit essentiellement intestinale.

Nos résultats confirment aussi la possibilité d'isoler de rares souches NTEC2 de carnivores, bien que leurs hôtes préférentiels soient les ruminants (De Rycke *et al.*, 1999; Beutin, 1999). La seule souche NTEC2 étudiée dans ce travail, déjà détectée auparavant (Mainil *et al.*, 1998), est négative aux sondes pour les adhésines, mais produit une hémolysine et résiste à l'activité bactéricide du sérum (Tableau III). L'hybridation sur ADN plasmidique après extraction

confirme que le gène *cnf2* est bien localisé sur un plasmide Vir-like, comme dans les souches NTEC2 des ruminants (De Rycke *et al.*, 1999). La principale question concernant les rares souches NTEC2 isolées de non-ruminants est leur adaptation réelle à ces hôtes. Il est probable que la réponse est négative, puisque ces souches restent exceptionnelles. Cette affirmation n'exclut pas cependant que, lors de circonstances tout aussi exceptionnelles, certaines souches NTEC2 puissent provoquer une pathologie chez ces espèces animales. Seules des études de suivi dans le temps de l'importance de ces souches NTEC2 et de reproduction expérimentale d'une pathologie chez les carnivores apporteront une réponse.

Les données cliniques recueillies ne révèlent aucune surprise ni pour les souches NTEC1, ni pour les souches AdEC (Tableau V). Elles peuvent être isolées de matières fécales d'animaux vivants et d'intestins ou d'organes internes d'animaux autopsiés. Dans ce dernier cas, elles sont présentes dans plusieurs sites en quantités variables, mais, en général, abondantes. Remarquons l'absence de souches d'origine urinaire dans cette collection. S'il n'y a pas d'association particulière avec une race ou un sexe, l'âge de la majorité des animaux est inférieur à 3 mois (16 animaux sur 22). Ces âges correspondent bien à une plus grande incidence des colibacilloses intestinales et généralisées chez les chiens et les chats (Beutin, 1999). Cependant, des colibacilloses intestinales et extra-intestinales (une métrite par exemple) chez des animaux plus âgés ne sont pas exclues (Tableau V). Le rôle exact de ces colibacilles NTEC1 et AdEC reste cependant un des points importants de discussion: s'agit-il de pathogènes? si oui, s'agit-il de pathogènes primaires ou secondaires?

Des expériences d'inoculation *in vivo* dans d'autres espèces animales ne laissent pas de doute quant à la réponse à la première question: les souches NTEC sont bien pathogènes (Smith, 1975; Wray *et al.*, 1993; Fournut *et al.*, 2000; Van Bost *et al.*, 2001b). La réponse à la seconde question est plus complexe. L'ensemble des observations *in vivo*, sur cultures cellulaires et *in vitro* permettent actuellement d'émettre l'hypothèse suivante: les souches NTEC et AdEC représentent avant tout des pathogènes secon-

naires, qui profitent de circonstances adjuvantes (co-infections, faiblesse à la naissance, malnutrition, rétention de fœtus, désordre alimentaire, bref stress en général) pour se multiplier et exercer leurs effets pathogènes, à hauteur de l'intestin (diarrhée), du tractus urinaire (cystite, pyélonéphrite) ou en provoquant une infection généralisée (septicémie, bactériémie). Cette particularité ne diminue en rien leur pouvoir pathogène, lorsque ces circonstances sont présentes. Le tropisme clinique pourrait reposer sur le type et la combinaison d'adhésines produites, car produire différentes adhésines peut avantager les souches qui rencontrent divers environnements (intestin, tractus urinaire, sang, organes). Remarquons que plusieurs anamnèses font état d'infections virales (notamment de parvovirus) ou bactériennes (*Salmonella*) responsables d'entérites hémorragiques, d'infections bactériennes responsables (*Escherichia coli* entérotoxigènes) d'entérite non hémorragiques, ou de déséquilibres de la flore intestinale avec présence de spirochètes, de levures ou de protozoaires (Tableau V).

Quant au traitement, ni les souches NTEC1, ni les souches AdEC ne paraissent présenter de nombreuses résistances aux antibiotiques (Tableau VI). Les antibiotiques les moins fréquemment actifs sont l'ampicilline (31% de souches résistantes), l'association trimétoprime/sulfamidés (26% de souches résistantes) et la néomycine (26% de souches résistantes). Les résultats vis-à-vis de la gentamicine et de l'enrofloxacin doivent être tempérés par l'année d'isolement de la souche, par rapport à l'utilisation en thérapeutique vétérinaire des animaux de compagnie de ces principes actifs, une remarque déjà formulée pour les souches entéropathogènes (Mainil *et al.*, 2000b).

En résumé et en conclusion, les souches NTEC1 canines et félines ressemblent fortement, quant à leurs diverses propriétés, aux souches homologues bovines, humaines et félines, tant sur le plan des pathologies associées, des facteurs et propriétés potentielles de virulence détectés, que des propriétés générales. Comme les souches NTEC1 isolées d'animaux de rente, la question de leur potentiel zoonotique est donc posée régulièrement, notam-

ment en ce qui concerne les infections du tractus urinaire, avec des réponses variables selon les études (Beutin, 1999; Johnson *et al.*, 2000). Il faut donc signaler qu'aucune donnée épidémiologique ne permet jusqu'à présent de soupçonner une telle contamination croisée.

Sur le plan du diagnostic, il apparaît aussi que l'isolement d'une souche hémolytique d'un organe interne doit être considérée comme importante et quasi équivalente à l'isolement d'une souche NTEC1, ce qui est loin d'être vrai pour les souches AdEC. L'isolement d'une culture abondante de colibacilles hémolytiques à partir des matières fécales d'un animal diarrhéique peut aussi l'être. Le typage complet peut, par la suite, se faire par des tests PCR et/ou phénotypiques. Mais, dans tous les cas, il faut, jusqu'à preuve du contraire, considérer ce colibacille comme secondaire dans le processus pathologique et rechercher une cause primaire, infectieuse ou non infectieuse.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les confrères de la clinique de médecine interne des petits animaux et de la clinique d'autopsies de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Prs Henroteaux et Coignoul), ainsi que les Prs Fred Haesebrouck et David J. Taylor, et le Dr Luc Devriese des Facultés de Médecine Vétérinaire des Universités de Gent (Belgique) et de Glasgow (Ecosse, Royaume-Uni). Les auteurs remercient aussi Mr le Pr émérite Albert Kaeckenbeeck pour son intérêt sur le sujet. Les auteurs remercient tout particulièrement Mme Isabelle Noël-Dizier pour la collecte des dossiers cliniques, ainsi que Mmes Martine Marin et Christine Schlicker, du CERVA-CODA, pour leur aide technique précieuse.

SUMMARY

Pathogenic *Escherichia coli* strains from dogs and cats: III) Bacteriological and clinical data on necrotoxicogenic and adhesin-positive *E. coli* strains.

The purpose of this study was to characterize 25 necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 1 (NTEC1), one necrotoxicogenic *E. coli* type 2 (NTEC2) and 16 non-necrotoxicogenic *E. coli* isolated, between 1979 and 1993, from feces, intestinal content or internal organs of dogs and cats using a uniform and standardized typing scheme, as previously described on NTEC1 and NTEC2 isolates from cattle, humans and pigs (Mainil *et al.*, 1999). The results obtained by colony hybridization and PCR on the NTEC1 isolates were homogeneous: eighteen NTEC1 isolates harboured *prs*- and *sfa/foc*-related DNA sequences; five NTEC1 isolates harboured *sfa/foc*-related DNA sequences; one NTEC1 isolate harboured *prs*-related DNA sequences; and one was negative. The only NTEC2 isolate was also negative. Only a few NTEC1 isolates were positive for *f17*-, *afa*- or *cdt*-related DNA sequences. All NTEC1 and the NTEC2 isolates were haemolytic on blood agar and were resistant to the bactericidal activity of the serum (one exception). By contrast a very few produced an aerobactin or a colicin. The strains belonged to various serogroups and many could not be identified with the

immunsera used. On the other hand all but one NTEC1 isolates belonged to biotype 9. The most typical profile identified for NTEC1 from dogs and cats was: CNF1+Prs+S+Hly+Bio9+. The results obtained on the non-necrotoxicogenic *E. coli* isolates were more heterogeneous: two of them harboured *pap/prs*- and *sfa/foc*-related DNA sequences; ten harboured *pap/prs*-related DNA sequences; and four, other DNA sequences. The results of the phenotypic assays were more heterogeneous also. NTEC1 strains were isolated from essentially young puppies and kitties (< 3 months for 16 out of 22), with sometimes older animals (up to 12 years). The digestive pathologies were non haemorrhagic diarrhea/enteritis essentially. When haemorrhagic diarrhea/enteritis were observed, other infectious agents were present or strongly suspected (parvovirus, *Salmonella*). Extraintestinal pathologies were septicemic or systemic colibacillosis, with one case of necrohaemorrhagic metritis. NTEC1 and non-NTEC were not frequently antibiotic resistant. The most frequent resistant were to ampicillin, trimethoprim/sulfonamides and neomycin.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTIN A., MARTIN C., GIRARDEAU J.P., POHL P., CONTREPOIS M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, **162**, 235-239.
- BERTIN A., MARTIN C., OSWALD E., GIRARDEAU J.P. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 2921-2928.
- BETTELHEIM K.A. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : Mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 85-109.
- BEUTIN L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 285-298.
- BLANCO J., ALONSO M.P., GONZALEZ E.A., BLANCO M., GARABAL J.I. Virulence factors of bacteremic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P-fimbriated strains. *J. Med. Microbiol.*, 1990, **31**, 175-183.
- BLANCO J., BLANCO M., ALONSO M.P., BLANCO J.E., GONZALEZ E.A., GARABAL J.I. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Res. Microbiol.*, 1992, **143**, 869-878.
- BLANCO M., BLANCO J.E., ALONSO M.P., MORA A., BALSALOBRE C., MUNOZA F., JUAREZ A., BLANCO J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res. Microbiol.*, 1997, **148**, 745-755.
- BROES A. Les *Escherichia coli* pathogènes du chien et du chat. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 377-384.
- BROES A., FAIRBROTHER J.M., MAINIL J.G., HAREL J., LARIVIERE S. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O8:KX105 and O8:K2829 strains isolated from piglets with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 2402-2409.
- COUTURIER M., BEX F., BERGQUIST P.L., MAAS W.K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.*, 1988, **52**, 305-317.
- COWAN and STEEL's manual for identification of medical bacteria (Barrow G.I., Feltham R.K.A. eds). 3rd ed. (1993). New-York : Cambridge University Press, p194.
- DE RYCKE J., MILON A., OSWALD E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC) : two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 221-234.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316.
- DOZOIS C.M., CLÉMENT S., DESAUTELS C., OSWALD E., FAIRBROTHER J.M. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, **152**, 307-312.
- DOZOIS C., CURTISS R. III. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of "exotic" islands in the gene stream. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 157-179.
- FOURNUT S., DOZOIS C.M., ODIN M., DESAUTELS C., PERES S., HERAULT F., DAIGLE F., SEGAFREDO C., LAFFITE J., OSWALD E., FAIRBROTHER J.M., OSWALD I.P. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 839-847.
- GERARDIN J., LALIOUI L., JACQUEMIN E., LE BOUGUENEC C., MAINIL J.G. The *afa*-related gene cluster in necrotogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa*-8 variant. *Vet. Microbiol.*, 2000, **76**, 175-184.
- HACKER J., KAPER J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 641-679.
- JOHNSON J.R., O'BRYAN T.T., LOW D.A., LING G., DELAVARI P., FASCHING C., RUSSO T.A., CARLINO U., STELLA L. Evidence for commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 3327-3336.
- JOHNSON J.R., STELL J.J. A novel multiply-primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal(α 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1996, **173**, 920-926.
- JOHNSON J.R., STELL A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with uropsepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.*, 2000, **181**, 261-272.
- LALIOUI L., JOUVE M., GOUNON P., LE BOUGUÉNEC C. Molecular cloning and characterization of the *afa*-7 and *afa*-8 gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 5048-5059.
- LE BOUGUÉNEC C., ARCHAMBAUD M., LABIGNE A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1189-1193.
- MAINIL J. Shiga/Verocytotoxins and Shiga/Verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 235-258.
- MAINIL J. Le point des connaissances sur les entérites à *Escherichia coli* chez le veau. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 121-136.
- MAINIL J., BEZ S., JACQUEMIN E., KAECKENBEECK A. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*

- chez les chiens et chats : I) Détection des souches entérotoxigènes (ETEC), entérotoxigènes (EPEC), vérotoxigènes (VTEC), entérohémorragiques (EHEC) et nécrotoxigènes (NTEC). *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 39-46.
- MAINIL J.G., GERARDIN J., JACQUEMIN E. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotoxigenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.*, 2000a, **73**, 327-335.
- MAINIL J.G., JACQUEMIN E., HÉRAULT F., OSWALD E. Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotoxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.*, 1997, **61**, 193-199.
- MAINIL J.G., JACQUEMIN E., POHL P., FAIRBROTHER J.M., ANSUINI A., LE BOUGUÉNEC C., BALL H.J., DE RYCKE J., OSWALD E. Comparison of necrotoxigenic *Escherichia coli* from farm animals and from humans. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 123-135.
- MAINIL J., JANSSEN L., CHARLIER G., JACQUEMIN E., CHINA B., GOFFAUX F. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et chats: II) Données cliniques et bactériologiques sur les souches entérotoxigènes. *Ann. Méd. Vét.*, 2000b, **144**, 335-343.
- MILON A., OSWALD E., DE RYCKE J. Rabbit EPEC : a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 203-220.
- NAGY B., FEKETE P.Zs. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 259-284.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- NATARO J.P., LEVINE M.M. *Escherichia coli* diseases in humans. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 285-333.
- O'BRIEN A.D., HOLMES R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.*, 1987, **51** 206-220.
- OELSCHLAEGER T.A., HACKER J. Pathogenicity islands and their role in virulence of bacteria. In : Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., McDowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe – Pathogenicity and virulence. Proceedings of the IIIrd Workshop of the European Concerted Action CT98-3935, Liège, Belgique, 2000, 73-85.
- OSWALD E., DE RYCKE J., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., MAINIL J., DAUBE G., POHL P. Virulence factors associated with the cytotoxic necrotizing factor type 2 in bovine diarrheic and septicaemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 2522-2527.
- OSWALD E., POHL P., JACQUEMIN E., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., O'BRIEN A.D., MAINIL J. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 or type 2. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 428-434.
- PEETERS J. *Escherichia coli* infections in rabbits, cats, dogs, goats and horses. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 261-283.
- POHL P., DAUBE G., MAINIL J., LINTERMANS P., KAECKENBEECK A., OSWALD E. Virulence factors and phenotypes of sixty-one strains of *Escherichia coli* of bovine origin, producing the cytotoxic necrotizing factor type 1. *Ann. Rech. Vét.*, 1992, **23**, 83-91.
- POHL P., OSWALD E., VAN ROBAEYS G., STOCKMANS F., LINTERMANS P., MAINIL J. Tests simples pour le diagnostic présumé des *Escherichia coli* isolées principalement chez les bovins et productrices des cytotoxines nécrosantes (CNF1). *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 503-505.
- SAUNDERS J.R. Bacterial plasmids and their association with virulence. In : Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., McDowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe – Pathogenicity and virulence. Proceedings of the IIIrd Workshop of the European Concerted Action CT98-3935, Liège, Belgique, 2000, 136-139.
- SMITH H.W. Observations on *Escherichia coli* infection in calves. In: Rutter, J.M. (Ed.), Proceedings of the First Seminar on Pathology in the CEC Programme of Coordination of Research in Beef Production. Perinatal Ill-Health in Calves, 1975, 281-329.
- TOTH I. Phages and their role in virulence of bacteria. In : Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., McDowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe – Pathogenicity and virulence. Proceedings of the IIIrd Workshop of the European Concerted Action CT98-3935, Liège, Belgique, 2000, 1-10.
- VAN BOST S., BABE M.H., JACQUEMIN E., MAINIL J. Characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.*, 2001a, **82**, 311-320.
- VAN BOST S., ROELS S., MAINIL J. Necrotoxigenic *Escherichia coli* type 2 invade and cause diarrhea during experimental infection in colostrum restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.*, 2001b, **81**, 315-329.
- WRAY C., PIERCY D.W.T., CARROLL P.J., COOLEY W.A. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sci.*, 1993, **54**, 290-298.