

Facteurs de virulence et phénotypes de soixante et une souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine, productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF 1)

P Pohl 1,* , G Daube 2, J Mainil 2, P Lintermans 1,
A Kaeckenbeeck 2, E Oswald 3

¹ Institut national de recherches vétérinaires, Groeselenberg 99, 1180 Bruxelles;

² Université de Liège, faculté de médecine vétérinaire, bâtiment B43,
Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique;

³ Institut national de la recherche agronomique, laboratoire de pathologie infectieuse
et immunologie, 37380 Nouzilly, France

(Reçu le 20 septembre 1991; accepté le 29 octobre 1991)

Résumé — Soixante et une souches d'*E coli* d'origine bovine productrices de la toxine CNF1 ont été étudiées. Quatre-vingt-neuf pour cent d'entre elles produisent une aéro bactéine et résistent à l'activité bactéricide du sérum de mouton et sont donc vraisemblablement des souches septicémiques. Aucune des 61 souches ne répond aux sondes correspondant aux gènes des entérotoxines (STaP, STb, LT-I et LT-IIa) ni des vérotoxines (VT-I et VT-II); elles ne produisent pas les adhésines K99, Att25 (FY ou F17), ni Att111. La très grande majorité d'entre elles (93,4%) produit une alpha-hémolysine et fermentent rapidement le sorbose. En revanche, seulement 5,5% de *E coli* CNF⁻ possèdent ces 2 propriétés. Ces propriétés permettent de les distinguer des *E coli* CNF⁻ qui généralement ne produisent pas cette hémolysine, ou si elles la produisent, ne fermentent pas le sorbose.

CNF1 / *E coli* / entérohémolysine / phénotype / virulence

Summary — Virulence factors and phenotypes of 61 strains of *Escherichia coli* of bovine origin that produce the cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). Virulence factors and phenotypes of 61 strains CNF1⁺ were investigated. Eighty-nine percent of the strains produced an aerobactin and were resistant to the bactericidal activity of sheep serum, both of which are properties of septicemic strains of *E coli*. None of the strains reacted either with DNA probes corresponding to the enterotoxins STaP, STb, LT-I and LT-IIa, or to the verotoxins VT-I and VT-II. None produced the adhesins K99, Att25 (FY or F17) and Att111. The great majority (93.4%) of the CNF1⁺ *E coli* produced an α -hemolysin and rapidly fermented sorbose. In contrast, only 5.5% of CNF⁻ *E coli* possessed both properties. These properties allow CNF1⁺ to be distinguished from CNF⁻ *E coli*.

CNF1 / *E coli* / enterohemolysin / phenotype / virulence

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

En étudiant les propriétés toxigènes de souches d'*Escherichia coli* isolées des fèces d'enfants atteints d'entérite, Caprioli *et al* (1983 et 1989) ont découvert que certaines souches d'*E coli* produisent une cytotoxine capable d'induire une multinucléation des cellules de lignées en culture. Cette toxine, ayant aussi un pouvoir nécrosant dans la peau du lapin, fut appelée : facteur cytotoxique nécrosant (CNF). Les travaux ultérieurs de De Rycke *et al* (1987, 1989, 1990) ont montré qu'il existe en fait 2 types de toxines CNF (CNF1 et CNF2) qui sont produites séparément par différentes souches d'*E coli*. À la différence de la toxine CNF1 originellement décrite par Caprioli, CNF2 est codée par le plasmide Vir (Oswald *et al*, 1989) isolée des souches d'*E coli* du groupe Vir (Smith, 1974; Lopez-Alvarez *et al*, 1980). Les 2 toxines présentent une parenté immunologique mais elles n'ont pas la même masse moléculaire (Oswald et De Rycke, 1990) et l'effet de multinucléation induit par les 2 toxines est différent sur les cellules de lignées en culture. *In vivo*, les 2 toxines induisent une nécrose de la peau du lapin (De Rycke *et al*, 1990), mais seule la toxine CNF2 provoque une nécrose de la patte de la souris après injection de la toxine dans le coussinet plantaire (De Rycke *et al*, 1989).

Chez l'homme, les souches d'*E coli* produisant CNF1 ont été isolées d'enfants souffrant de diarrhée (Caprioli *et al*, 1983; Bisicchia *et al*, 1985) et d'adultes souffrant d'infections extra-intestinales (Caprioli *et al*, 1987), plus particulièrement de septicémies (Cherifi *et al*, 1990) et d'infections urinaires (Alonso *et al*, 1987; Brauner *et al*, 1990). Chez l'animal, les souches CNF1 sont principalement d'origine intestinale : porcs diarrhéiques (González *et al*, 1985) et veaux diarrhéiques (Hall *et al*, 1985; De

Rycke *et al*, 1987; Blanco *et al*, 1988), mais on isole aussi des souches CNF1 de cas de mammites de la vache, de septicémies du veau (Tabouret et De Rycke, 1990) et d'infections urinaires des carnivores domestiques (Beutin, comm pers).

Bien que l'on isole des souches produisant CNF1 dans beaucoup de pathologies colibacillaires, on ne connaît pas encore le rôle exact de CNF1 dans la virulence d'*E coli*. Au cours d'une étude portant sur 115 souches bovines d'*E coli*, nous avons recherché si les souches produisant CNF1 avaient un phénotype particulier qui puisse nous fournir des outils de diagnostic supplémentaires et des éléments pour évaluer le pouvoir pathogène de ces souches en pathologie vétérinaire. Nous avons recherché sur ces souches la production de facteurs de virulence associés à des pathologies reconnues. Il s'agit de la production d'aérobactine et de la résistance à l'action bactéricide du sérum, attributs des souches septicémiques; de la sécrétion d'entérotoxines et de la production de facteurs d'adhésion caractéristiques des *E coli* entérotoxigènes (ETEC); enfin de la production des *Shiga-like* toxines. De plus, nous avons déterminé un ensemble de caractères phénotypiques simples à mettre en évidence dans le but de pouvoir distinguer facilement les souches CNF1 des souches qui ne produisent pas la toxine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cent quinze souches d'*E coli* ont été étudiées. Elles proviennent des fèces ou de divers organes internes de bovins. Elles ont été isolées de 1977 à 1990. La toxine CNF1 a été recherchée par son effet multinucléant sur les cellules HeLa, par séroneutralisation et Elisa (De Rycke *et al*, 1987; Tabouret et De Rycke, 1990).

La production d'aérobactine a été détectée par la technique de Schoch modifiée par Pohl (Schoch et Lebek, 1984; Pohl *et al*, 1986). La ré-

sistance au sérum de mouton a été recherchée par la méthode de Fierer (Fierer *et al*, 1972).

On a recherché par hybridation ADN-ADN les gènes correspondants :

- aux entérotoxines STaP, STb, LT-I et LT-IIa (Mainil *et al*, 1986 et 1989);
- aux vérotoxines SLT-I et SLT-II (Newland et Neil, 1988; Mainil *et al*, 1989);
- à la sous-unité F17A de l'adhésine F17 (Lintermans *et al*, 1988a et b).

Les adhésines «classiques» des *E coli* entérotoxigènes des bovins ont été détectées à l'aide des antisérums préparés à partir de pilis K99, Att25 (FY ou F17) et Att111 purifiés (Bertels *et al*, 1989). Les souches à tester ont été cultivées sur milieu Minca pendant 18 h à 37 °C (Guinée *et al*, 1977). Pour mettre en évidence d'éventuelles adhésines qui n'auraient pas encore été caractérisées, nous avons utilisé le test d'adhésion aux villosités intestinales du veau *in vitro* (Girardeau, 1980).

L'antigène O a été déterminé selon les techniques de Sojka (Sojka, 1965). Nous avons utilisé les sérums anti 02, 04, 06, 08, 011, 015, 075, 088, 0123, 0139 et 0153. Ils ont été produits par inoculation aux lapins des souches de références reçues de F et I Ørskov (International *Escherichia* and *Klebsiella* Center, Copenhagen).

Le biotype a été précisé en utilisant le schéma de Crichton (Crichton et Old, 1982) (rhamnose, ornithine, dulcité, sorbose).

Les hémolysines ont été détectées selon Smith et Beutin (Smith, 1963; Beutin *et al*, 1988). Les techniques que nous utilisons permettent de distinguer 3 hémolysines différentes chez les *E coli*: l'alpha, la bêta et l'entérohémolysine (Pohl *et al*, 1991).

La production de colicines a été détectée en utilisant les méthodes de Frédéricq (1957).

RÉSULTATS

Souches productrices de CNF1

Parmi les 115 souches testées, 61 produisent la toxine CNF1. Leurs propriétés sont résumées au tableau I.

Toutes les souches CNF1+ sont hémolytiques : 60 produisent une hémolysine alpha (1 produit une entérohémolysine) et parmi celles-ci, 57 fermentent également le sorbose (tableau II).

Parmi les 61 souches CNF1+, 54 résistent au sérum de mouton et simultanément produisent une aérobactine.

Aucune ne répond aux sondes correspondant aux gènes des entérotoxines des vérotoxines ni de la sous-unité F17A de l'adhésine F17 (Att25).

Elles ne sont pas agglutinées par les sérums anti-K99, Att25 (F17) ni Att111. Toutefois, 25 de ces souches adhèrent aux villosités intestinales de veau *in vitro*.

Vingt-quatre appartiennent au groupe sérologique 0153, 2 au groupe 04, 2 au groupe 078, 1 au groupe 015, 1 au groupe 0149, 1 au groupe 0157, 2 souches sont *rough*, 19 n'ont réagi avec aucun des sérums utilisés; enfin, l'antigène O de 9 souches n'a pas été recherché.

Cinquante-huit de ces 61 souches appartiennent aux biotypes 1PC, 2PC, 3PC, 9PC ou 10 PC; c'est-à-dire qu'elles fermentent le sorbose en 24 h. Trois appartiennent au biotype 5PC (sorbose négatif; tableaux I et III).

Quarante-trois des 61 souches sont colicinogènes, les colicines produites sont généralement de type ColV ou ColI (résultats non présentés) et 47 des 61 souches produisent à la fois une colicine et une hémolysine alpha (tableau I).

Souches ne produisant pas CNF1

Cinquante-quatre des 115 souches étudiées ne produisent pas CNF1 (ni CNF2). Leurs propriétés sont résumées au tableau IV.

Dix d'entre elles résistent au sérum et produisent une aérobactine. Douze

Tableau I. Propriétés des *E coli* d'origine bovine productrice de CNF1.

<i>Ref souches</i>	<i>Organes</i>	<i>Type O</i>	<i>Biotype PC</i>	<i>Villosités^a</i>	<i>Type d'hémolyse^b</i>	<i>Aéro-bactine</i>	<i>Résistance au sérum</i>	<i>Colicine</i>
1KH77	Foie	0153	1	-	A	+	+	+
2KH77	Rein	0153	1	-	A	+	+	+
3KH77	Rate	0153	1	-	A	+	+	+
13KH77	Rate	0153	1	-	A	+	+	+
14KH77	Foie	0153	1	-	A	+	+	+
15KH77	Moelle	0153	1	+	A	+	+	+
17KH77	Moelle	0153	1	+	A	+	+	+
27KH77	Moelle	0153	1	+	A	+	+	-
47KH77	Foie	NT	3	-	A	+	+	-
58KH77	Moelle	0153	1	-	A	+	+	+
70KH77	Fèces	0153	1	-	A	+	+	+
71KH77	Fèces	0153	1	-	A	+	+	+
83KH77	Fèces	0153	1	-	A	+	+	+
93KH77	Moelle	0153	1	+	A	+	+	-
133KH77	Moelle	0153	1	-	Ent	+	+	-
86KH87	Fèces	rough	1	-	A	+	+	+
90KH87	Fèces	04	9	+	A	-	+	-
134KH87	Fèces	NT	1	-	A	-	+	+
231KH87	Fèces	015	1	-	A	+	+	-
8KH88	Fèces	04	1	+	A	+	+	-
16KH88	Fèces	0153	1	-	A	+	+	+
48KH88	Fèces	NT	1	-	A	+	+	+
78KH88	Fèces	NT	2	-	A	+	+	+
79KH88	Fèces	0153	1	+	A	+	+	+
121KH88	Fèces	NT	2	-	A	+	+	-
163KH88	Fèces	0153	1	-	A	+	+	+
208KH88	Fèces	-	1	-	A	+	+	+
210KH88	Organes	0153	1	-	A	+	+	+
220KH88	Fèces	0153	1	+	A	+	+	+
261KH88	Fèces	0153	1	+	A	+	+	+
262KH88	Fèces	0153	1	+	A	+	+	+
269KH88	Intestin	NT	2	-	A	+	+	+
282KH88	Foie	0153	1	+	A	+	+	+
285KH88	Fèces	rough	1	?	A	+	+	+
34KH89	Fèces	0153	1	+	A	+	-	+
1052S89	?	078	5	+	A	+	+	-
84KH89	Fèces	NT	9	+	A	-	+	+
91KH89	Fèces	NT	1	+	A	+	+	+
92KH89	Fèces	NT	2	+	A	+	+	+
99KH89	Fèces	NT	10	-	A	+	+	-
102KH89	Fèces	NT	2	-	A	+	+	+
129KH89	Intestin	078	1	-	A	+	+	+
168KH89	Intestin	0153	1	?	A	+	+	+
207KH89	Fèces	NT	2	+	A	+	+	-
145KH89	Organes	NT	1	+	A	+	+	-
146KH89	Organes	NT	1	+	A	+	+	-
147KH89	Organes	0149	5	-	A	+	+	-

Ref souches	Organes	Type O	Biotype PC	Villosités ^a	Type d'hémolysine ^b	Aéro-bactine	Résistance au sérum	Colicine
239KH89	Organes	?	2	+	A	+	+	+
243KH89	Fèces	?	9	?	A	-	+	-
248KH89	Fèces	?	1	+	A	+	+	+
260KH89	Fèces	?	1	-	A	-	+	+
285KH89	Fèces	NT	2	-	A	-	+	-
296KH89	Fèces	?	1	+	A	+	+	-
332KH89	Avorton	O157	1	+	A	+	+	-
333KH89	Avorton	?	1	-	A	+	+	-
346KH89	Organe	NT	1	-	A	+	+	+
458KH89	Avorton	NT	5	-	A	+	+	+
463KH89	Avorton	N	10	-	A	+	+	+
6KH90	Fèces	NT	9	+	A	+	+	-
13KH90	Fèces	?	1	-	A	+	+	+
43KH90	Poumon	?	1	-	A	+	+	+

^a adhésion aux villosités intestinales du veau; ^b hémolysines A; B; Ent = alpha, bêta, entéro; NT : non typable.

souches ont réagi en présence de la sonde F17A et une en présence de la sonde STaP. Les autres souches n'ont répondu à aucune des sondes essayées.

Trois des souches possèdent l'adhésine Att25 (F17) et 3 l'adhésine Att111.

Les antigènes O n'ont pas été recherchés.

Les biotypes les plus nombreux sont 1PC, 2PC, 5PC, 6PC et 9PC (tableau III).

Vingt souches sont hémolytiques : 4 produisent une alpha-hémolysine et 16 produisent une bêta-hémolysine. Parmi les souches produisant l'hémolysine alpha, 3 fermentent aussi le sorbose (tableau II).

Vingt-cinq souches sont colicinogènes (dans 13 cas la colicine produite est de type Col V ou Col I) et 1 seule produit à la fois la colicine et l'hémolysine alpha (tableau II).

DISCUSSION

Aucune des 61 souches d'*E coli* CNF1 ne répond aux sondes correspondant aux gènes des entérotoxines ni des vérotoxines. Aucune non plus n'est agglutinée par les sérums anti-K99, Att25 (F17) ni Att111. Elles ne peuvent, dès lors, pas être assimilées à des *E coli* entérotoxinogènes ni vérotoxinogènes.

En revanche, 89% de ces souches produisent une aérobactine et sont insensibles au sérum; de plus, toutes sont hémolytiques et dans 98% des cas l'hémolysine produite est de type alpha. La possession de ces caractères de virulence doivent faire considérer les *E coli* CNF1 comme étant des souches potentiellement septicémiques. Des enquêtes épidémiologiques seront nécessaires pour conforter cette hypothèse.

Tableau 1 Propriétés d'*E coli* bovines ne produisant pas CNF1.

Ref	Organes	Biotype PC	Type d'hémolysine ^b	Aérobactine	Résistance au sérum	Colicine	Adhésines ^a ou toxines
44KH89	Fèces	1	-	+	+	+	-
45KH89	Fèces	2	-	+	-	+	-
56KH89	Fèces	9	B	+	-	+	-
57KH89	Fèces	1	B	-	-	-	-
58KH89	Fèces	9	B	+	-	+	-
59KH89	Fèces	5	B	-	-	+	-
61KH89	Intestin	1	-	+	+	+	-
62KH89	Intestin	13	-	-	+	+	-
74KH89	Fèces	9	B	+	+	-	-
149KH89	Fèces	6	B	+	+	-	-
150KH89	Organes	9	A	-	+	-	-
151KH89	Organes	10	A	-	+	-	-
153KH89	Organes	5	A	-	+	-	-
157KH89	Organes	13	-	+	-	-	-
217KH89	Fèces	10	-	+	+	-	Att25
250KH89	?	5	-	+	+	+	-
257KH89	Fèces	6	B	+	+	+	-
262KH89	Fèces	9	B	+	+	-	-
269KH89	Fèces	6	B	+	+	+	-
314KH89	Fèces	5	-	+	+	+	-
319KH89	Fèces	5	B	+	-	-	-
320KH89	Fèces	1	-	-	-	-	-
324KH89	Intestin	1	-	+	+	+	Att111
327KH89	Intestin	1	-	+	+	-	Att25
338KH89	Intestin	14	-	-	-	+	Att25
349KH89	Organes	1	-	+	+	+	-
365KH89	Mamelle	1	B	+	+	-	-
390KH89	?	1	-	+	+	+	-
400KH89	Mamelle	2	B	+	+	-	-
402KH89	Fèces	6	B	+	+	+	-
404KH89	Fèces	13	-	-	+	-	STaP
405KH89	Fèces	1	B	+	-	-	-
406KH89	Intestin	6	-	-	+	-	-
429KH89	Fèces	6	-	-	-	+	-
441KH89	Fèces	6	-	+	-	+	-
443KH89	Intestin	1	-	+	+	-	-
444KH89	Organes	1	-	+	+	+	-
446KH89	Fèces	2	-	+	-	-	Att111
453KH89	Mamelle	6	-	+	-	-	-
462KH89	Poumon	10	-	-	-	+	-
16KH90	Fèces	9	-	+	-	-	-
39KH90	Fèces	1	B	+	-	-	-
48KH90	Intestin	14	-	+	-	-	Att111
67KH90	Avorton	6	B	+	-	-	-
77KH90	Fèces	2	-	-	-	-	-
78KH90	Fèces	10	-	-	+	-	-
79KH90	Fèces	6	-	-	-	-	-
80KH90	Fèces	6	-	-	-	-	-
82KH90	Fèces	1	-	-	-	+	-
83KH90	Fèces	2	-	-	-	+	-
86KH90	Fèces	9	-	-	-	-	-
87KH90	Fèces	5	-	-	+	+	-
88KH90	Fèces	5	-	-	+	+	-
89KH90	?	1	A	+	+	+	-

^a hémolysines α , β , entéro.^b Détectée par agglutination dans les sérums anti K99, Att25 et Att111 ou par sonde d'ADN; NT : non typable.

Abréviations : cf tableau I.

Tableau III. Caractères hémolytique et biotypique des *E coli* bovines productrices ou non de CNF1.

Biotypes	CNF1+ Hémolyse				Total	CNF- Hémolyse				Totaux
	alpha	bêta	entéro	-		alpha	bêta	entéro	-	
1PC	42	-	1	-	43	1	3	-	10	14
2PC	8	-	-	-	8	-	2	-	4	6
3PC	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
5PC	3	-	-	-	3	-	3	-	4	7
6PC	-	-	-	-	-	1	4	-	6	11
9PC	4	-	-	-	4	1	4	-	2	7
10PC	2	-	-	-	2	1	-	-	3	4
13PC	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
14PC	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
Totaux	60	-	1	-	61	4	16	-	34	54

Tableau IV Critères de distinction entre les *E coli* d'origine bovine productrice ou non de CNF1.

Phénotypes	E coli CNF1+ n = 61	E coli CNF- n = 54
	Nombre de souches (%)	
Hémolyse +	61 (100)	20 (37)
Hémolyse alpha +	60 (98,3)	4 (7,4)
Hémolyse alpha + Sorbitose +	57 (93,4)	3 (5,5)
Hémolyse alpha + Colicine +	41 (67,2)	1 (1,8)
Hémolyse alpha + Sorbitose + Colicine +	40 (65,6)	0

Pour réaliser ces enquêtes, il faudrait disposer de critères rapides et fiables qui permettraient de distinguer les souches qui produisent la toxine CNF1 de celles qui ne la produisent pas. Les caractères : hémolyse, fermentation rapide du sorbose et production de colicine permettent de poser un diagnostic de présomption raisonnable.

Ainsi, 93,4% des *E coli* CNF1+ produisent une hémolysine alpha et fermentent le sorbose (contre 5,5% des *E coli* CNF-). Ou encore 67,2% des *E coli* CNF1+ produisent une hémolysine alpha et une colicine (contre 1,8% des *E coli* CNF-).

Toutefois, jusqu'à présent aucun caractère phénotypique n'a permis de détecter avec une certitude absolue toutes les souches CNF1.

C'est pourquoi nous tentons actuellement de mettre au point une sonde d'ADN qui puisse les reconnaître. Nos premiers essais sont encourageants.

Enfin, il faut remarquer qu'il existe de grandes différences quant aux facteurs de virulence des *E coli* productrices de CNF1 et celles qui produisent CNF2.

Les *E coli* CNF1 forment un groupe très homogène dont la très grande majorité possèdent les marqueurs des souches septicémiques : production d'une aéro bactéine et d'une alpha-hémolysine, résistance au sérum. Par contre, les *E coli* CNF2 forment, quant à eux, un groupe très hétérogène qui s'éparpille entre au moins 5 photypes différents (Oswald *et al*, 1991).

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier R Boivin pour sa précieuse collaboration technique.

RÉFÉRENCES

- Alonso MP, Blanco J, Blanco M, González EA (1987) Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections: relation with haemagglutination. *FEMS Microbiol Lett* 48, 391-396
- Bertels A, Pohl P, Schlcker C, Vandriessche E, Charlier G, De Greve H, Lintermans P (1989) Isolatie van het Att111 fimbriële antigeen of *Escherichia coli* geïsoleerd uit kalverdiarree, karakterisatie en evaluatie van de noodzaak tot aanpassing van vaccins ter bestrijding van neonatale colidiarree. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 58, 118-122
- Beutin L, Prada J, Zimmerman S, Stephan B, Ørskov I, Ørskov E (1988) Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriol Hyg A* 267, 576-588
- Bisicchia R, Ciammarughi R, Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM (1985) Toxin production and haemagglutination in strains of *Escherichia coli* from diarrhoea in Brescia, Italy. *J Hyg* 95, 353-361
- Blanco J, González EA, Garcia S, Blanco M, Regueiro B, Bernadez I (1988) Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Vet Microbiol* 18, 297-311
- Brauner A, Katouli M, Tullus K, Jacobson SH (1990) Production of cytotoxic necrotizing factor, verocytotoxin and haemolysin by pyelonephritogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9, 762-767
- Caprioli A, Falbo V, Roda LG, Ruggeri FM, Zona C (1983) Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* 39, 1300-1306
- Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Baldassarri L, Bisicchia R, Ippolito G, Romoli E, Donelli G (1987) Cytotoxic factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extra-intestinal infections. *J Clin Microbiol* 25, 146-149
- Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Minelli F, Ørskov I, Donelli G (1989) Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 27, 758-761
- Cherifi A, Contrepolis M, Picard B, Goulet P, De Rycke J, Fairbrother J, Barnouin J (1990) Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol Lett* 70, 279-284
- Crichton PB, Old DC (1982) A biotyping scheme for the subspecific discrimination of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 15, 233
- De Rycke J, Guillot JF, Boivin R (1987) Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Vet Microbiol* 15, 137-157
- De Rycke J, Oswald E, Boivin R (1989) An *in vivo* assay for the detection of cytotoxic strains of *Escherichia coli*. *Ann Rech Vét* 20, 39-46
- De Rycke J, González EA, Blanco J, Oswald E, Blanco M, Boivin R (1990) Evidence of two types of cytotoxic necrotizing Factors (CNF1 and CNF2) in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 28, 694-699
- Fierer J, Finlay F, Braune AI (1972) A plaque assay on agar for detection of gram-negative bacilli sensitive to complement. *J Immunol* 109, 1156
- Fredericq P (1957) Colicins. *Annu Rev Microbiol* 15, 11, 7-21