

CINÉTIQUE D'EXCRÉTION FÉCALE DE *ESCHERICHIA COLI* K99+ PAR DES VEAUX APRÈS INFECTION EXPÉRIMENTALE

M. CONTREPOIS et Ph. GOUET

avec la collaboration technique de Y. RIBOT et G. ANDANT

Laboratoire de Microbiologie, INRA - CRZV de Theix, 63110 Beaumont, France

Summary

KINETICS OF FECAL EXCRETION OF K99+ *E. COLI* IN EXPERIMENTALLY INFECTED CALVES. — Complete kinetics of fecal excretion of K99+ *E. coli* in colibacillary diarrhoea of young calves is not known. Six calves received two liters of colostrum as a first meal and UHT sterilized milk later. They were kept in isolators. When one week old, they received orally 2.5×10^{10} to 9.8×10^{10} K99+ *E. coli* which are able to grow on adonitol. These bacteria numbered on a minimal medium with adonitol were excreted at a level between 10^5 to 10^8 /g of feces during about eight days. Calves a few weeks old might be healthy carriers of K99+ *E. coli* and contaminate newborn calves which are highly sensitive to enterotoxigenic colibacillary diarrhoea.

L'importance des infections par *Escherichia coli* entérotoxigènes (ECET) chez les veaux atteints de diarrhée est maintenant bien établie (Moon *et al.*, 1976 ; Myers et Guinée, 1976 ; Sivasmamy et Gyles, 1976 ; Morin *et al.*, 1979 ; Contrepois *et al.*, 1979, 1980 ; Ramisse, 1980 ; Martel *et al.*, 1981). Leur fréquence varie entre 34 % (Martel *et al.*, 1981) et 62 % (Acres *et al.*, 1977) chez des veaux âgés de moins de 5 jours. La dissémination de *E. coli* K99+ est largement tributaire du délai et du niveau d'excrétion des veaux infectés. Les premiers résultats sur ce sujet sont dus à Zijderveld *et al.* (1982).

Ce travail a pour but de mesurer la cinétique d'excrétion fécale de *E. coli* K99 chez des veaux âgés d'environ une semaine et recevant une

dose unique de *E. coli* K99+ par voie orale et il montre que ces derniers sont présents dans les matières fécales à un niveau compris entre 10^5 et 10^8 /g pendant au moins 8 jours.

Matériel et Méthodes

Protocole expérimental

Des veaux âgés d'environ une semaine reçoivent un inoculum de *E. coli* par voie orale. Les matières fécales fraîchement émises sont collectées le matin pendant trois semaines pour y dénombrer les *E. coli* totaux et K99+.

Animaux

Dans les trois heures qui suivent leur naissance, six veaux de race Frisonne reçoivent deux litres de colostrum puis sont enfermés et élevés en isolateur stérile, sous air stérile, nourris avec du lait UHT stérile pendant 10 à 11 jours. Ils sont alors sortis et placés en cases individuelles dans un environnement conventionnel.

Souches bactériennes

Les souches utilisées, répertoriées dans le tableau 1 ont en commun la propriété d'utiliser l'adonitol comme substrat carboné. Elles ont toutes été isolées de matières fécales de veaux.

Les souches sont conservées et cultivées sur milieu Minca (Guinée *et al.*, 1976).

Tableau 1. — Souches bactériennes

Souches bactériennes	Sérotypes
<i>E. coli</i> A	O101 : K32 : H9 ^a
<i>E. coli</i> B	
<i>E. coli</i> C	O101 : K28 : H7 ^b
<i>E. coli</i> D	O? : K28 : H7 ^b
<i>E. coli</i> E	O101 : K ? : H7 ^b

- a : établi par le Dr I. Ørskov. Statens Serum Institut, Amarger Boulevard 80, DK 2300 Copenhagen.
 b : établi par Dr Renault : Ets Sanders, 17 quai de l'Industrie, 91200 Athis-Mons.

Inoculum

L'inoculum bactérien, dénombré *a posteriori*, comprend entre 2,5 et $9,8 \times 10^{10}$ *E. coli* viables. Il est administré en suspension dans 10 ml d'eau physiologique.

Numération bactérienne

Dans les fèces, les *E. coli* sont dénombrés sur des milieux constitués par la base minérale du milieu Minca dont le « Casamino acids » est remplacé par 2 g/l de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Le substrat carboné (glucose ou adonitol) est inclus sous forme de solution concentrée stérilisée par filtration (0,22 μ) à raison de 2 g/l. La flore colibacillaire prototrophe totale est dénombrée sur le milieu avec glucose et les *E. coli* proto-

trophes adonitol⁺ sur milieu avec adonitol. Parmi ces derniers, 20 colonies sont repiquées sur le milieu minimum avec adonitol pour la recherche ultérieure du caractère K99 par agglutination sur lame. Le nombre de *E. coli* K99⁺ est mesuré par :

$$\text{nb. total de } \bar{E. coli} \text{ adonitol}^+ \times a/20$$

où a est le nombre de clones K99⁺ parmi les 20 clones adonitol⁺. On ne peut pas estimer le nombre de *E. coli* K99⁺ quand ces derniers représentent moins de 10 % des *E. coli* adonitol⁺.

Le sérum spécifique anti K99 est préparé selon la méthode décrite par Girardeau *et al.* (1982).

Recherche des virus

Les particules virales sont recherchées dans les matières fécales par observation au microscope électronique selon la méthode décrite par Scherrer *et al.* (1976).

Résultats

Avant inoculation, la flore colibacillaire totale des veaux est toujours comprise entre 10^8 et 10^{10} /g. La flore colibacillaire adonitol⁺ était voisine de la flore colibacillaire totale pour les veaux inoculés avec les souches A et B alors qu'elle représentait seulement 10 % de celle des trois autres veaux. Avant inoculation, aucun *E. coli* K99⁺ n'a été détecté.

Après inoculation, *E. coli* K99⁺ adonitol⁺ a été retrouvé en quantités importantes après 24 h (10^5 à 10^7 /g), à l'exception du veau inoculé avec la souche D. Chez les six veaux, il a été retrouvé entre 10^5 et 10^8 /g, pendant 6 à 12 jours, soit environ 8 jours. La limite de détection de *E. coli* K99⁺ est située aux environs de 10^7 ou 10^5 /g respectivement selon que la flore colibacillaire saprophyte adonitol⁺ a été abondante ($> 10^8$ /g chez le veau inoculé avec *E. coli* B) ou plus faible (voisine de 10^8 /g pour le veau inoculé avec *E. coli* E).

Chez le veau inoculé avec *E. coli* B, cette bactérie est retrouvée pendant les trois jours qui suivent l'inoculation, puis n'est plus détectée pendant six jours. Elle a été à nouveau dénombrée à plus de 10^7 /g de fèces au moment où l'on a enregistré un épisode diarrhéique. L'examen des matières fécales par microscopie électronique a alors révélé la présence de rotavirus.

Aucun résultat particulier n'a pu être observé en relation avec le sérotype ou avec la taille de l'inoculum.

Discussion

Les résultats que nous avons obtenus sont tributaires des limites des techniques microbiologiques que nous avons utilisées. Ils indiquent qu'une excrétion fécale importante de *E. coli* K99+ peut exister chez des veaux sains et enfin une observation fortuite permet de souligner qu'une infection par un rotavirus est sans doute propice à la multiplication de *E. coli* K99+ dans l'intestin.

L'absence de milieux sélectifs ne permet pas de dénombrer *E. coli* K99+ lorsqu'il est sous

dominant dans la microflore. Les milieux que nous utilisons, tout comme le milieu Minca, ne sont pas sélectifs de *E. coli* mais ils ont l'avantage d'assurer la synthèse du pilus K99. Ce n'est pas le cas des milieux sélectifs classiques pour *E. coli* (Girardeau *et al.*, 1982). *E. coli* est toujours présent en grand nombre dans les fèces des jeunes veaux et il pousse sensiblement plus vite que d'autres espèces telle que les entérocoques. Il produit par conséquent des grosses colonies faciles à distinguer. Nous avons par ailleurs, mis à profit le caractère adonitol+ que nous avons observé chez 50 % des souches d'ECET de notre collection et qui avait été signalé chez les ECET bovins des sérogroupes O8 et O101 par Braatens et Myers (1977). Ce caractère n'appartient qu'à 5 ou 6 % des souches d'*E. coli* respectivement selon Edwards et Ewing (1972) et Crichton et Old (1982). Pour une

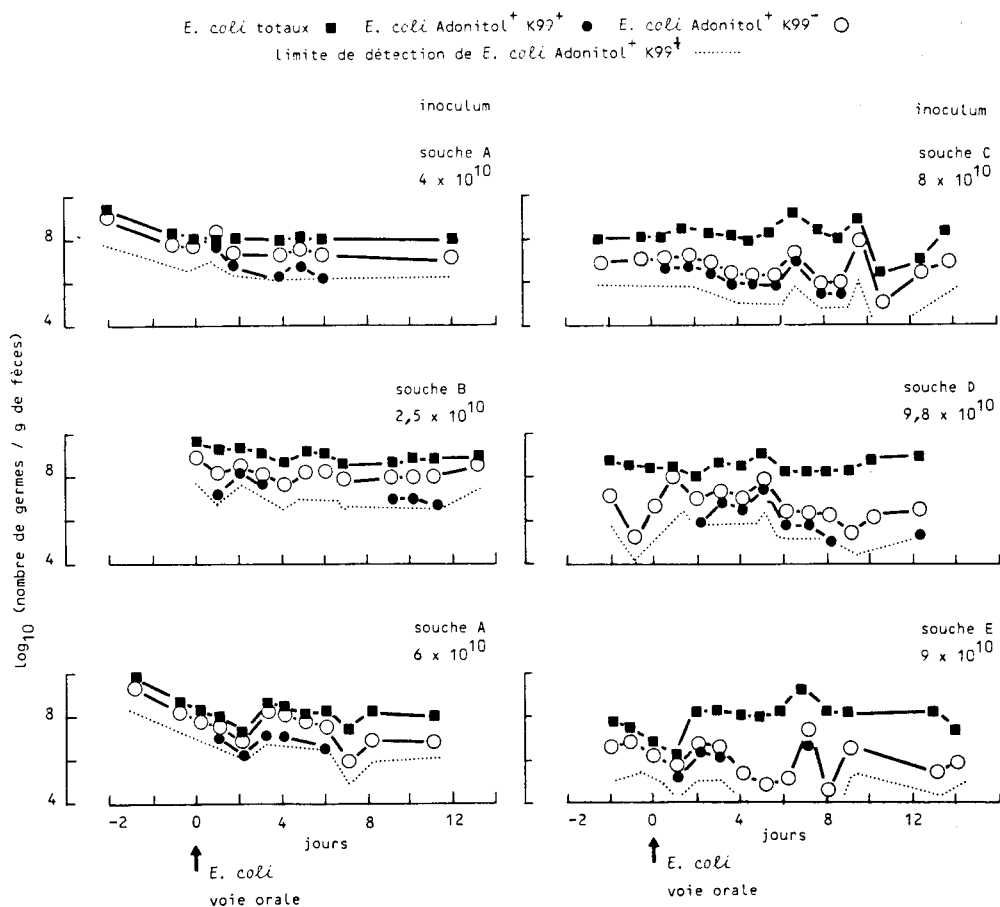


Fig. 1. — Cinétique d'excrétion de *E. coli*.

flore colibacillaire totale qui est toujours comprise entre 10^8 et 10^{10} /g, la sélection par l'adonitol nous a permis d'abaisser de 10 à 1 000 fois le seuil de détection de *E. coli* K99⁺ respectivement selon que la flore saprophyte adonitol⁺ était abondante (10^8 /g) ou non (10^9 /g). Enfin nous avons préféré une sélection par l'adonitol à celle d'une résistance à un antibiotique, car la plupart des *E. coli* bovins sont multirésistants aux antibiotiques (Martel *et al.*, 1981). Zijderveld *et al.* (1982) ont cependant obtenu de bons résultats en utilisant un double marquage aux antibiotiques.

Dans nos conditions expérimentales, où les veaux âgés d'une semaine ne présentaient pas de signes cliniques de diarrhée après inoculation, l'excrétion de *E. coli* K99⁺ en quantités appréciables s'est manifestée pendant plus d'une semaine. Dans des conditions identiques, des spores de *Bacillus stearothermophilus* qui ne se multiplient pas *in vivo* et sont un bon marqueur de transit, sont excrétées à un niveau inférieur à 10^6 /g après trois jours (Contrepois, résultats non publiés). L'absence de signes cliniques était prévisible compte tenu de l'âge des veaux (Smith et Halls, 1967 ; Contrepois *et al.*, 1977) et l'on ne saurait extrapoler ces résultats à ceux qui seraient rencontrés chez des veaux malades âgés de moins de quatre jours et faisant notamment l'objet d'un traitement antibiotique. La situation reproduite expérimentalement ici peut être retrouvée dans les élevages parmi des veaux âgés d'une à deux semaines qui seraient contaminés par le voisinage de jeunes veaux malades excréant de grandes quantités de *E. coli* K99⁺. Ces veaux âgés seraient des porteurs sains. La cinétique d'excrétion fécale pourrait aussi être modifiée par l'absorption de colostrum anti-K99 (Sojka *et al.*,

1978), celui-ci diminuant le nombre d'ECET excrétés ainsi que la durée d'excrétion comparativement à des agneaux recevant un colostrum témoin. Cet effet des anticorps pourrait être l'un des avantages annexes conféré par la vaccination anti-K99.

Il est maintenant bien démontré qu'il existe une synergie ou au moins un effet additif entre infections colibacillaires et virales (Gouet *et al.*, 1978 ; Dubourguier *et al.*, 1978 ; Runnels *et al.*, 1980 ; Wray *et al.*, 1981). Par contre l'observation fortuite de la remontée de *E. coli* à l'occasion d'une diarrhée à rotavirus n'a jamais été rapportée. Elle devra bien entendu être confirmée mais elle peut d'ores et déjà signifier que les désordres physiopathologiques engendrés par l'infection virale favorisent l'émergence de *E. coli* K99⁺.

En conclusion, l'ingestion en une seule prise, par des veaux âgés d'une semaine, de 10^{10} à 10^{11} ECET conduit à une excrétion qui se prolonge pendant plus d'une semaine. Des animaux de cet âge peuvent donc constituer une source potentielle de contamination dangereuse pour leurs très jeunes congénères qui sont hautement sensibles à ces germes. Cette conclusion est en accord avec celle formulée très récemment par Zijderveld *et al.* (1982).

Accepté pour publication, le 17 janvier 1983.

Rémerciements

Nous remercions vivement le Dr Ida Ørskov et le Dr Renault pour le typage sérologique des *E. coli*.

Résumé

L'étude de la cinétique de l'excrétion fécale d'*E. coli* K99⁺ par les jeunes veaux atteints de diarrhée colibacillaire est incomplète. Six veaux reçoivent deux litres de colostrum d'abord puis sont nourris avec du lait UHT stérile. Ils sont élevés en isolateur. A l'âge d'une semaine, ils reçoivent par voie orale un inoculum compris entre $2,5$ et $9,8 \times 10^{10}$ *E. coli* K99⁺. Ces souches sont capables d'utiliser l'adonitol comme substrat carboné. Ces bactéries dénombrées sur un milieu minimum avec adonitol sont excrétées à un niveau compris entre 10^5 et 10^8 /g de fèces pendant environ huit jours. Les veaux âgés de plusieurs semaines peuvent être des porteurs sains d'*E. coli* K99⁺ et contaminer les veaux nouveaux-nés très sensibles à la colibacillose entérototoxique.

Références

- ACRES S.D., SAUNDERS J.R., RADOSTIS O.M., 1977. Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves : The prevalence of enterotoxigenic *E. coli* reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. *Can. Vet. J.*, **18**, 113-122.
- BRAATENS B.A., MYERS L.L., 1977. Biochemical characteristics of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 1989-1991.
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., GOBY J.F., 1977. Production expérimentale de diarrhées colibacillaires chez le veau et l'agneau. Equilibres bactériens dans le tube digestif de veaux et agneaux gnotoxéniques. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, **2**, 118-119.
- CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., BORDAS C., GOUET Ph., 1979. *E. coli* K99+ TS+ et diarrhée du veau. *Recl. Med. Vet.*, **155**, 553-558.
- CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., MANDARD O., NAVETAT H., GOUET Ph., SCHERRER R., 1980. Données épidéziologiques recueillies dans l'Allier. *Bull. G.T.V.*, **80-4bis B**, 47-59.
- CRICHTON P.B., OLD D.C., 1982. A biotyping scheme for the subspecific discrimination of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, **15**, 233-242.
- DUBOURGUIER H.C., GOUET Ph., MANDARD O., CONTREPOIS M., BACHELERIE C., 1978. Scanning electron microscopy of abomasum and intestine of gnotoxenic calves infected either with rotavirus, coronavirus or enteropathogenic *E. coli* or with rotavirus and *E. coli*. *Ann. Rech. Vet.*, **9**, 441-451.
- EDWARDS E., EWING W.H., 1972. *Identification of Enterobacteriaceae*. Third Edition. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 362.
- GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., GOUET Ph., 1982. Inhibition of K99 antigen synthesis by L-alanine in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 463-470.
- GUINÉE P.A.M., JANSEN W.H., AGTERBERG C.M., 1976. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infect. Immun.*, **13**, 1369-1377.
- GOUET Ph., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., RIOU Y., SCHERRER R., LAPORTE J., VAUTHEROT J.F., COHEN J., L'HARIDON R., 1978. The experimental production of diarrhea in colostrum deprived axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic *E. coli*, rotavirus, coronavirus and a combined infection of rotavirus and *E. coli*. *Ann. Rech. Vet.*, **9**, 433-440.
- MARTEL J.L., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., GIRARDEAU J.P., GOUET Ph., BORDAS C., HAYERS F., QUILLERET-ELIEZ A., RAMISSE J., SENDRAL R., 1981. Fréquence de l'antigène K99 et antibiorésistance chez *Escherichia coli* d'origine bovine en France. *Ann. Rech. Vet.*, **12**, 253-257.
- MOON H.W., WHIPP S.C., SKARTVEDT S.M., 1976. Etiologic diagnosis of diarrheal diseases of calves : Frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen production by *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, **37**, 1025-1029.
- MORIN M., LARIVIÈRE S., LALLIER R., BEGIN M., ROY R., ETHIER R., 1979. Neonatal calf diarrhea : Pathology and microbiology of spontaneous cases in dairy herds and incidence of the enteropathogens implicated as etiological agents. In : Acres S.D. (ed.) : *Proceedings, 2nd Int. Symp. Neonatal Diarrhea*, Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, 347-369.
- MYERS L.L., GUINÉE P.A.M., 1976. Occurrence and characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Infect. Immun.*, **3**, 1117-1119.
- RAMISSE J., 1980. Résultats d'une enquête départementale ; la diarrhée des veaux. *Point Vét.*, **11**, (n° 53), 53-61.
- RENAULT L., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., GOUET Ph., BORDAS C., LE BOURHIS E., 1980. Intérêt de l'agglutination capsulaire rapide de l'antigène A dans le dépistage des souches entéropathogènes d'*E. coli* d'origine bovine. *Proceedings, 2nd Int. Symp. Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Lucerne, 420-423.
- RUNNELS P.L., MOON H.W., WHIPP S.C., MATTHEWS P.J., WOODS G.N., 1980. Interaction of rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in gnotobiotic calves. In : Acres S.D. (ed.) : *Proceedings, 3rd Int. Symp. Neonatal Diarrhea*, Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, 343-354.
- SCHERRER R., COHEN J., L'HARIDON R., FEYNEROL C., FAYET J.C., 1976. Reovirus like agent (rotavirus) associated with neonatal calf gastroenteritis in France. *Ann. Rech. Vet.*, **7**, 25-31.
- SIVASMAMY G., GYLES C.L., 1976. The prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the feces of calves with diarrhea. *Can. J. Comp. Med.*, **40**, 241-246.
- SMITH H.W., HALLS S., 1967. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods in *Escherichia coli* infections in pigs, calves lambs and rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.*, **93**, 499-529.

- SOJKA W.J., WRAY C., MORRIS J.A., 1978. Passive protection of lambs against experimental enteric colibacillosis by colostral transfer of antibodies from K99 vaccinated ewes. *J. Med. Microbiol.*, **11**, 493-499.
- WRAY C., DAWSON M., AFSHAR A., LUCAS M., 1981. Experimental *Escherichia coli* and rotavirus infection in lambs. *Res. Vet. Sci.*, **30**, 379-381.
- ZIJDERVELD F.G. (van), MOERMAN A., de LEEUW P.W., OVERDIJK E., BAANVINGER T., 1982. Epidemiological aspects of enterotoxigenic *E. coli* infections in calves. *Proceedings, XIIth World Congress on diseases of cattle*, Dutch Section of the World Association for Buiatrics, Amsterdam, 258-264.