

FRÉQUENCE DES PILI FY ET K99 PARMI DES SOUCHES DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLÉES DE VEAUX DIARRHÉIQUES EN FRANCE

M. CONTREPOIS¹, J.L. MARTEL², C. BORDAS³, F. HAYERS⁴, A. MILLET⁵, J. RAMISSE⁶ et R. SENDRAL⁷

1. Laboratoire de Microbiologie, INRA, Centre de Theix, 63122 Ceyrat, France

2. Laboratoire National de Pathologie Bovine (Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires), 5 avenue Jules Carteret, BP 7033, 69342 Lyon cedex 7, France

3. Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la Nièvre, rue de la Fosse aux Loups, 58019 Nevers, France

4. Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de l'Allier, Bellevue, 03400 Yzeure, France

5. Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de l'Orne, Avenue de Basingstoke, 61013 Alençon, France

6. Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la Vendée, 18 rue Gallieni 14X, 85021 La Roche-sur-Yon cedex, France

7. Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la Saône-et-Loire, rue des Épinoches, 71025 Macon cedex, France

Summary

FREQUENCY OF FY AND K99 PILI AMONG STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM DIARRHEIC CALVES IN FRANCE. — Epidemiological study of bovine *E. coli* shows that the FY *E. coli* pilus which has previously been described and is also known as Att25, can be found in 30 of 415 fecal samples of diarrheic calves, eight of them carrying both FY and K99 pili. The K99 *E. coli* pilus is present in 86 fecal samples. Strains carrying both FY and K99 pili account for 9 % of K99 enterotoxigenic *E. coli*. K99⁻, FY⁺ *E. coli* do not produce the thermostable enterotoxin (TSa). K99⁺, FY⁻ or K99⁺, FY⁺ *E. coli* are present mainly in calves under three days old but K99⁻ FY⁺ *E. coli* are found whatever the age of the animal.

Différents pili ou fimbriae sont impliqués dans l'adhérence des colibacilles aux entérocytes. Parmi les souches d'*E. coli* entérotoxigènes (ECET), on connaît maintenant chez le veau, l'agneau ou le porcelet les pili K99 (Ørskov *et al.*, 1975), chez le porcelet ou l'agneau F41 (Morris *et al.*, 1983a, 1983b), spécifiquement chez le porcelet K88 (Ørskov *et al.*, 1961) et 987 P (Nagy *et al.*, 1976), spécifiquement chez les humains CFA/I (Evans *et al.*, 1975) et CFA/II (Evans *et al.*, 1978). D'autres pili dont le rôle dans la pathogénie des colibacillooses est moins bien élucidé, ont été découverts ces dernières années: EB775

(Thomas *et al.*, 1982), CFA III (Darfeuille *et al.*, 1983). Dans un de nos Laboratoires, nous avons décrit un pilus FY (Girardeau *et al.*, 1980; Contrefois *et al.*, 1982) découvert chez des souches *E. coli* K99⁻, TSA⁻ et K99⁺, TSA⁺ et d'une morphologie comparable à K99. Il confère de fortes propriétés d'adhérence aux villosités intestinales *in vitro* et le récepteur sur les entérocytes est de type N-acétyl-glucosamine (Girardeau *et al.*, 1980). Lors d'infections expérimentales de jeunes veaux par *E. coli* K99⁺, FY⁺, les anticorps colostraux anti-K99 protègent mal (Contrefois, en préparation). Ce résultat suggère un rôle particu-

lier des pili FY et il paraît intéressant de connaître la fréquence de ces colibacilles FY⁺.

Récemment, Pohl *et al.* (1982) ont décrit des souches porteuses du pilus Att25. Ce dernier, identique au pilus FY selon des critères biochimiques et immunologiques (Contrefois, observations personnelles) a été trouvé avec une fréquence élevée (157 souches sur 401). Nous avons entrepris une étude épidémiologique visant à préciser la fréquence des souches de colibacilles porteuses du pilus FY, seul ou en association avec le pilus K99, en les recherchant dans les matières fécales de 415 veaux atteints de diarrhée dans diverses régions de France.

Matériel et Méthodes

L'enquête a été effectuée de Novembre 1982 à Avril 1983 dans les clientèles vétérinaires de divers départements français (principalement Vendée, Nièvre, Saône-et-Loire, Allier et Orne). L'étude a porté sur 415 cas de diarrhée de veaux de moins d'un mois.

Le praticien, appelé par l'éleveur, prélevait des fèces du veau malade et l'échantillon était acheminé vers le laboratoire par l'éleveur ou par la poste dans un délai maximum de 48 h.

Bactériologie

La détection des caractères K99 et FY était effectuée systématiquement sur cinq souches de colibacilles isolées du prélèvement fécal.

Tableau 1. — Fréquence des colibacilles K99⁺ et (ou) FY⁺ dans les fèces de veaux diarrhéiques

	pili K99		
	présence	absence	total
pili FY			
présence	8	22	30
absence	78	307	385
total	86	329	415

Tableau 2. — Isolement de *E. coli* (K99⁻, FY⁺), (K99⁺, FY⁺), (K99⁺, FY⁻) selon l'âge des veaux (77 veaux dont l'âge était connu).

	âge des veaux (j)								total	
	1	2	3	4	5	6	10	15		>15
<i>pili</i>										
K99 ⁻ FY ⁺	0	4	0	2	0	1	4	4	3	18
K99 ⁺ FY ⁺	1	3	3	0	0	0	0	0	0	7
K99 ⁺ FY ⁻	14	32	0	0	1	1	1	2	1	52
total	15	39	3	2	1	2	5	6	4	77

Les antigènes K99 et FY étaient détectés avec les antisérums spécifiques, par agglutination sur lame d'une culture de 18 h de la souche à étudier, cultivée sur milieu Minca + polyvitex (Guinée *et al.*, 1976, 1977).

Les sérums anti-K99 et anti-FY ont été obtenus par immunisation de lapins respectivement avec *E. coli* K12, K99 et *E. coli* A de sérotype O101:K32:H9, K99, F41, FY selon le protocole de Guinée *et al.* (1981). Le sérum anti-K99 est rendu monospécifique par épuisement à l'aide de *E. coli* K12. Pour FY l'immunsérum est épuisé avec *E. coli* A cultivé à 18 °C (K99 et F41 ne sont pas synthétisés à cette température et FY l'est peu), *E. coli* B41 (O101:K-, K99, F41) cultivé à 37 °C, ce qui élimine les anticorps dirigés contre K99 et F41 et enfin *E. coli* 39a porteur d'un antigène non identifié présent également chez *E. coli* A.

Les agglutinations de souches *E. coli* FY⁺ sur lame sont immédiates et intenses avec cet antisérum dilué au 1/20.

L'entérotoxine thermostable (TSa) est recherchée selon le test du souriceau nouveau-né (Dean *et al.*, 1972).

Résultats

Parmi les 415 échantillons étudiés, *E. coli* FY⁺ a été trouvé chez 30 veaux malades soit 7 %. Vingt-deux, soit 5 %, hébergeaient des souches *E. coli* K99⁻, FY⁺ et 8, soit 2 %, des souches *E. coli* K99⁺, FY⁺ (tabl. 1).

Le pilus K99 était présent chez 86 veaux malades (21 %). Les huit fèces K99⁺, FY⁺ représentent 9 % des échantillons K99⁺ totaux.

La répartition des isolements K99⁺ et (ou) FY⁺, selon l'âge des animaux (tabl. 2) indique une très forte prédominance des isolements K99⁺, FY⁻ et K99⁺, FY⁺ chez les veaux de moins de 3 jours, alors que *E. coli* K99⁻, FY⁺ a été isolé de façon uniforme quel que soit l'âge des veaux.

Parmi les 22 souches *E. coli* K99⁻, FY⁺, 11 ont fait l'objet d'une recherche de la toxine TSa. Ces 11 souches *E. coli* K99⁻, FY⁺ étaient TSa négatives.

Discussion

La fréquence d'isolement de *E. coli* K99⁺ (21 %) confirme les résultats de Martel *et al.* (1981) qui avaient obtenu 20 %. Il semble que la quasi totalité voire tous les colibacilles K99⁺ sauvages produisent la toxine TSa (Renault *et al.*, 1980; Sherwood *et al.*, 1983) et sont donc des ECET. Parmi ces derniers, notre enquête révèle que 9 % portent les pili FY ce qui n'est pas négligeable. L'adhérence observée *in vitro* avec *E. coli* K99⁺, FY⁺, nettement plus intense que celle due aux seuls pili K99 (Contrepois *et al.*, 1982) suggère que les ECET K99⁺, FY⁺ sont particulièrement virulents. Une mauvaise protection par les anticorps anti-K99 du colostrum, chez des veaux infectés expérimentalement par *E. coli* K99⁺, FY⁺, suggère également que FY est impliqué dans la colonisation de l'intestin grêle par ces ECET (Contrepois en préparation).

La prédominance de *E. coli* K99⁺ chez les très jeunes veaux (Martel *et al.*, 1982) est également confirmée. C'est aussi vrai pour les ECET, K99⁺, FY⁺ qui sont tous issus de veaux âgés de moins de trois jours. Par contre les colibacilles K99⁻, FY⁺ sont isolés à une fréquence comparable quel que soit l'âge des animaux. La réceptivité particulière des très jeunes veaux pour *E. coli* K99⁺ n'est pas encore clairement expliquée. Pour FY, le phénomène d'adhérence est dû à des récepteurs de type N-acétyl-glucosamine (Girardeau *et al.*, 1980). Ces derniers sont très largement répandus à la surface des cellules animales et il paraît normal d'isoler *E. coli* FY⁺ quel que soit l'âge des animaux.

Résumé

L'étude épidémiologique des souches *E. coli* isolées de veaux montre que *E. coli* portant le pilus FY décrit antérieurement et qui est également connu sous le nom d'Att25 a été isolé chez 30 des 415 échantillons de fèces de veaux diarrhéiques, huit d'entre eux portant à la fois les pili FY et K99. *E. coli* portant le pilus K99 est présent chez 86 veaux. Les souches portant à la fois les pili FY et K99 représentent 9 % des souches *E. coli* entérotoxigènes. *E. coli* K99⁻, FY⁺ ne produit pas l'entérotoxine thermostable (TSa). *E. coli* K99⁺, FY⁻ ou K99⁺, FY⁺ est présent seulement chez des veaux de moins de trois jours mais *E. coli* K99⁻ FY⁺ est trouvé quel que soit l'âge des animaux.

Références

- CONTREPOIS M., GIRARDEAU J.P., GOUET Ph., DESMETTRE Ph., 1982. Vaccination contre l'antigène K99 et d'autres «adhésines» des *Escherichia coli* bovins. *Proceedings of XIIth World Congress on Diseases of Cattle*. Amsterdam, 3-5 September, 332-338.
- DARFEUILLE A., LAFEUILLE B., JOLY B., CLUZEL R., 1983. A new colonization factor antigen (CFA III) produced by enteropathogenic *Escherichia coli* O128:B12. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **134A**, 53-64.
- DEAN A.J., CHING Y.C., WILLIAM R.G., HARDEN L.B., 1972. Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, **125**, 407-411.
- EVANS D.G., SILVER R.P., EVANS D.J., CHASE D.G., GORBACH S.L., 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, **12**, 656-667.
- EVANS D.G., EVANS D.J., 1978. New surface-associated heat labile colonization factor antigen (CFA II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.*, **15**, 676-678.

Au cours de cette enquête, *E. coli* FY⁺ a été trouvé chez 7 % des animaux malades. Pohl *et al.* (1982) ont trouvé Att 25 (ou FY) chez 157 souches sur 401, soit 39 %. Ces auteurs ont décrit des souches K99⁻, FY⁺, TSa⁺. Pour notre part nous n'avons pas trouvé de telles souches parmi les 11 étudiées ni parmi 14 autres ayant fait l'objet d'une recherche antérieure (J.L. Martel, observations personnelles). Cette contradiction n'existe plus car les souches K99⁻, FY⁺, TSa⁺ de Pohl *et al.* (1982) portaient en fait un antigène K99 masqué (Pohl, communication personnelle).

Enfin, si la seule présence de *E. coli* FY⁺ dans les matières fécales de veaux malades ne permet pas de conclure à un rôle de ces colibacilles dans la pathologie observée, nous pensons qu'associé à K99, les pili FY renforcent l'adhérence aux entérocytes et rendent ces ECET plus virulents. A ce jour nous ne disposons pas de résultats impliquant des souches K99⁻, FY⁺ dans la pathologie colibacillaire strictement intestinale, mais il n'est pas exclu que certaines de ces souches interviennent dans une pathologie extra-intestinale. Dans une étude, en cours, nous avons trouvé *E. coli* K99⁻, FY⁺ dans différents organes de veaux morts de diarrhées ou de septicémies.

Reçu, le 25 novembre 1983.

Accepté, le 16 avril 1984.

Remerciements

Nous remercions I. Ørskov et F. Ørskov pour le typage sérologique de *E. coli* A.

- GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., CONTREPOIS M., 1980. Attachement des *E. coli* entéropathogènes à la muqueuse intestinale. *Bull. Group. Tech. Vet.*, 80-4-B-190, 49-59.
- GUINEE 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.
- GUINEE P.A.M., VELDKAMP J., JANSEN W.H., 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **15**, 676-678.
- GUINEE P.A.M., JANSEN W.H., WADSTROM T., SELLWOOD R., 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: P.W. de Leeuw, P.A.M. Guinee (Eds) *Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea*. **13**, 126-161.
- 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. Vét.*, **12**, 253-257.
- MORRIS J.A., THORNS C.J., WELLS G.A.H., SOJKA W.J., 1983a. The production of F41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88, K99 and 987 P fimbriae. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2753-2759.
- MORRIS J.A., WELLS G.A.H., SCOTT A.C., SOJKA W.J., 1983b. Colonisation of the small intestine of lambs by an enterotoxigenic *Escherichia coli* producing F41 fimbriae. *Vet. Rec.*, **113**, 471.
- NAGY B., MOON H.W., ISAACSON R.E., 1976. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. *Infect. Immun.*, **13**, 1214-1220.
- ØRSKOV I., ØRSKOV F., SOJKA W.J., TEACH J.M., 1961. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, **53**, 404-422.
- ØRSKOV I., ØRSKOV F., SMITH H.W., SOJKA W.J., 1975. The establishment of K99, a thermolabile transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called «Kco» possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, **83**, 31-36.
- POHL P., LINTERMANS P., VAN MUYLEN K., SCHOTTE M., 1982. Colibacilles entérotoxigènes du veau possédant un antigène d'attachement différent de l'antigène K99. *Ann. Méd. Vét.*, **126**, 569-571.
- 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 du 2^e Symposium International des Vétérinaires de Laboratoires de Diagnostic*, Zurich, Suisse, 420-423.
- SHERWOOD D., SNODGRASS D.R., LAWSON G.H.K., 1983. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves in Scotland and Northern England. *Vet. Rec.*, **113**, 208-212.
- THOMAS L.V., CRAVIOTO A., SCOTLAND S.M., ROWE B., 1982. A new fimbrial antigenic types (E8775) which may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect. Immun.*, **35**, 1119-1124.