

VACCINATION ANTI-K99 ET PROTECTION COLOSTRALE DES VEAUX INFECTÉS EXPÉRIMENTALEMENT AVEC *ESCHERICHIA COLI* K99

M. CONTREPOIS, J.P. GIRARDEAU, H.C. DUBOURGUIER et Ph. GOUET

Avec la collaboration technique de M. CHAVAROT, G. VERT et G. ANDANT

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

Summary

K99 VACCINATION OF COWS AND COLOSTRAL PROTECTION OF EXPERIMENTALLY INFECTED CALVES WITH K99 *ESCHERICHIA COLI*. — Colostral antibodies of cows vaccinated with *E. coli* B41 (O101: K99, F41) protect completely B41 experimentally infected calves. In order to know more precisely the role of K99, F41 antibodies in protection, calves receiving the colostrum of B41 vaccinated cows are infected with *E. coli* B44 (O9: K30: H⁻K99, F41). Vaccination multiplies K99 antibodies in colostrum by seven. In B44 infected calves, specific K99, F41 antibodies protect only 3 out of 6 calves completely. Additive effect of antibodies against K99 and other surface antigens of enterotoxigenic *E. coli* seems desirable for a more complete protection.

Les souches entérotoxigènes de *Escherichia coli*, souches ECET, possèdent deux caractères majeurs de virulence: l'antigène d'adhérence K99 qui permet la colonisation de l'intestin grêle et l'entérotoxine thermostable de type a (TSa) responsable des pertes hydriques et électrolytiques (Smith et Linggood, 1972). Les ECET sont isolés chez 5 à 31% des veaux diarrhéiques (Moon *et al.*, 1976; Myers et Guinée, 1976; Martel *et al.*, 1981) mais cette fréquence est beaucoup plus élevée chez les très jeunes veaux puisqu'elle atteint 33% (Martel *et al.*, 1981) à 62% (Acrez *et al.*, 1977) des veaux âgés de moins de 4 ou 5 jours.

Un colostrum de vaches ne contenant pas ou peu d'anticorps spécifiques anti-K99 ne protège pas les veaux infectés expérimentalement par *E. coli* K99, mais celui de vaches vaccinées par la souche infectante les protège totalement (Contrefois *et al.*, 1978). Pour dissocier la protection spécifique anti-K99 de celle pouvant résulter des anticorps anti-O, la vaccination et l'infection ont

été réalisées avec des souches *E. coli* K99 de sérogroupes O et K différents. Dans ces conditions les anticorps anti(K99 + F41) ne protègent pas complètement les veaux infectés expérimentalement ce qui suggère l'implication d'un ou d'autre(s) antigène(s) de surface dans la virulence de la souche infectante.

Matériel et Méthodes

Souches bactériennes et plan expérimental

Les souches bactériennes utilisées sont *E. coli* B41 (O101: K⁻: H⁻, K99, F41) et *E. coli* B44 (O9: K30: H⁻, K99, F41) qui nous ont été fournies respectivement par le Dr. Sellwood (IRAD de Compton, Grande-Bretagne) et le Dr. J. Morris (CVL de Weybridge, Grande-Bretagne). Elles ont seulement en commun les antigènes majeurs de surface K99 et F41. Les résultats de l'infection expérimentale par *E. coli* B44, de veaux recevant le colostrum de vaches vaccinées par *E. coli* B41 ou de vaches non vaccinées, sont comparés en tenant compte des anticorps colostraux dirigés contre K99 et F41.

Vaccination des vaches et infection expérimentale des veaux

Les modalités de la préparation du vaccin, de la vaccination des vaches et de l'infection expérimentale des veaux (race Frisonne) ont été décrites (Contrepois *et al.*, 1978). Brièvement, deux doses vaccinales d'antigène K99 semi-purifié préparé à partir de *E. coli* B41 ont été utilisées: 100 mg (poids humide) pour les vaches du lot I, 300 mg (poids humide) pour les vaches du lot II. Les vaches témoins (lot III) ne sont pas vaccinées. Les veaux ont bu deux litres de colostrum à un âge compris entre deux et cinq heures. L'infection expérimentale des veaux a été faite par voie orale à raison d'environ 10^{10} *E. coli* B44 (entre 2×10^9 et 10^{11}) immédiatement après la prise du colostrum.

Les observations cliniques ont été un contrôle de la quantité de lait ingéré (lait entier stérilisé selon le procédé UHT) et un examen deux fois par jour de l'état général des veaux, de la consistance des matières fécales et des signes apparents de déshydratation (énophtalmie, pli cutané).

Mesure des anticorps colostraux

Les mesures ont été effectuées dans le sérocolostrum obtenu après traitement à la présure. Les agglutinines anti-O et anti-K99 ont été quantifiées par agglutination, respectivement de la souche vaccinale *E. coli* B41 cultivée à 18 °C (inhibition de la synthèse de K99 et F41) et de *E. coli* B44 cultivée à 37 °C. Les agglutinations ont été réalisées en tubes avec des dilutions au 1/2

du sérocolostrum (première dilution de 1/20) et des suspensions bactériennes à $2,5 \times 10^8$ bactéries/ml.

Les anticorps anti-K99 agglutinants et non agglutinants ont été dosés par une méthode ELISA en plaques de microtitration sensibilisées par des immunoglobulines de lapin anti-K99. Ces dernières ont été obtenues par immunisation avec *E. coli* K12, K99 et épuisement de l'antisérum par *E. coli* K12. Les IgG ont été précipitées par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 50 % de saturation (Eliens *et al.*, 1979).

L'adsorption des immunoglobulines anti-K99 dans les cupules a été effectuée par incubation (18 h à 37 °C) de 50 µl des IgG diluées au 1/500 en tampon Na_2CO_3 , 0,05 M, pH 9,6.

Les plaques ont été rincées quatre fois par du tampon PBS (NaCl 0,14 M, KH_2PO_4 0,0015 M, Na_2HPO_4 0,016 M, KCl 0,003 M) contenant 0,05 % (V/V) de Tween 80.

On a incubé 50 µl d'une préparation de K99 partielle-purifié (préparation UC 110 diluée au 1/500 selon Girardeau *et al.*, 1982) 2,5 h à 37 °C.

Les plaques ont à nouveau été lavées quatre fois par du tampon PBS avec Tween.

Cinquante µl des dilutions au 1/2 du sérocolostrum des vaches (première dilution au 1/100) ont été incubées 2,5 h à 37 °C.

Après quatre rinçages avec du tampon PBS avec Tween on a fait agir 50 µl d'immunoglobulines de lapin anti-immunoglobulines bovines marquées à la peroxydase (Miles, Paris).

Tableau 1. — Titres en anticorps (\log_2 inverse de la dilution) (1^{er} vêlage/2^e vêlage)^a

Groupe expérimental Numéro des animaux	anti-O101	anti-K99	
	Séro-agglutination en tube	Séro-agglutination en tube	ELISA
<i>I: 100 mg d'antigène K99 semi-purifié</i>			
1	9,32/7,32	7,32/... ^b	13,64/12,64
3	9,32/...	7,32/...	14,64/12,64
2	8,32/...	7,32/...	14,64/...
6	8,32/...	7,32/...	12,64/...
7	8,32/...	7,32/...	12,64/...
4	7,32/...	7,32/6,32	14,64/14,64
5	7,32/...	5,32/...	.../14,64
<i>II: 300 mg d'antigène K99 semi-purifié</i>			
8	8,32/6,32	8,32/5,32	14,64/14,64
9	8,32/...	8,32/...	14,64/...
11	8,32/...	7,32/...	13,64/...
12	7,32/...	6,32/...	11,64/...
10	.../...	.../...	13,64/...
<i>III: Vaches témoins non vaccinées</i>			
13	7,32/...	4,32/...	13,64/...
14	6,32/...	—c/...	12,64/...
15	6,32/...	—c/...	12,64/...
16	6,32/...	—c/...	11,64/...
17	4,32/...	—c/...	10,64/...
18	4,32/...	—c/...	10,64/...
19	4,32/...	—c/...	7,64/...

a: après la vaccination; b: non fait; c: inférieur à 4,32

Après cinq rinçages au tampon PBS avec Tween on a ajouté 50 µl du substrat de la peroxydase constitué par 40 mg d'orthophénylènediamine, 40 µl d'H₂O₂ à 30 % (V/V) dans 100 ml de tampon phosphate/citrate pH 5,0 (0,05 M d'acide citrique, 0,1 M Na₂HPO₄). Après 15 min à l'obscurité, la réaction enzymatique a été stoppée par addition de 50 µl d'HCl 0,5 M. L'appréciation visuelle de la dilution la plus élevée donnant encore une coloration maximale a fourni le titre.

Recherche des colibacilles chez les veaux autopsiés

E. coli a été recherché dans les 30 minutes qui suivent la mort des veaux, de façon qualitative, dans les organes, par dissémination d'une empreinte d'environ 1 cm² de l'organe sur un milieu gélosé DCA (Difco) et de façon quantitative par ensemencement de dilutions décimales

en milieu gélosé DCA, du sang, de la bile, du contenu digestif et du mucus associé à la paroi intestinale. Ce dernier a été obtenu par grattage avec une lame de verre. Les colonies ont été dénombrées après 24 h d'incubation à 37 °C.

L'antigène K99 a été recherché par séro-agglutination sur lames des bactéries cultivées sur milieu Minca avec polyvitex (Guinée *et al.*, 1977). Le sérum anti-K99 a été obtenu par immunisation de lapin avec *E. coli* K12, K99 et épuisement de l'antisérum par *E. coli* K12 (Girardeau *et al.*, 1982).

Résultats

Les titres des agglutinines colostrales anti-

Tableau 2. — Évolution clinique des veaux infectés avec *E. coli* B44

Veau	Titre anti-K99 du colostrum	Age lors de l'inoculation (h)	Dose infectante <i>E. coli</i> B44 (x 10 ⁹)	Diarrhée après l'infection orale			Mort après l'infection (h)
				Début (h)	Déshydratation	Durée (h)	
Vaccinés							
1	14,64	3	25	10	+	24	...
2	14,64	3	4,7	...	—
3	13,64	4	100	...	—
4	12,64	2	13	...	—
5	12,64	3	13	10	+	26	36
6	...	3	100	12	+	38	50
Témoins							
7	12,64	3	9	15	+	20	35
8	12,64	2	2,1	15	+	60	...
9	11,64	3	34	14	+	24	38
10	10,64	2	100	8	+	22	30
11	10,64	6	13	7	+	13	20
12	10,64	3	36	13	+	67	80
13	7,64	5	100	11	+	20	31

Tableau 3. — Recherche de *E. coli* B44 chez les veaux autopsiés

Organes	Veaux ^a		
	13	9	6
1. Bactéries/g			
Sang du cœur	0	0	0
Bile	10 ⁶	0	0
Jéjunum			
grattage de la muqueuse	2,6 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁸	40 x 10 ⁸
contenu	nf	0,8 x 10 ⁸	nf
2. Présence de bactéries^b			
Ganglions mésentériques	+++	nf	+
Rate	++	—	+
Rein	+	++	—
Foie	+	+	+

(a) les numéros des veaux sont ceux du tableau 2

(b) +++ : supérieur à 100 colonies; ++ : 10 à 100; + : 5 à 10; — : absence de *E. coli*.

O101 ont été en moyenne d'environ 320 (\log_2 voisin de 8) pour les deux doses de vaccin (tabl. 1) alors qu'ils ont été environ huit fois plus faibles chez les vaches témoins. Les agglutinines anti-(K99 + F41) avaient des titres moyens d'environ 128 (\log_2 voisin de 7) chez les vaches vaccinées alors qu'elles n'étaient pas décelables chez les vaches témoins (titre inférieur au 1/20). Par la méthode ELISA les titres d'anticorps anti-K99 ont été en moyenne d'environ 14000 (\log_2 voisin de 13,7) et d'environ 2000 (\log_2 voisin de 11) respectivement pour les vaches vaccinées et les vaches témoins.

Que les vaches soient vaccinées avec 100 ou 300 mg d'antigène K99 semi-purifié, les réponses sérologiques sont identiques: $7,03 \pm 0,75$ (moyenne \pm erreur standard) contre $7,57 \pm 0,95$ en séro-agglutination et $13,80 \pm 0,98$ contre $13,64 \pm 1,22$ par la technique ELISA. La vaccination a accru d'environ sept fois le taux moyen d'anticorps anti-K99. Lors du vêlage suivant, un an plus tard, les anticorps anti-K99 étaient encore présents en quantités importantes dans le colostrum des vaches vaccinées puisque les titres ELISA étaient identiques chez deux vaches (4 et 8), divisés seulement par deux (vache 1) ou par 4 (vache 3).

L'infection expérimentale des veaux (tabl. 2) par 2 à 100×10^9 *E. coli* B44 a été suivie de la mort de six veaux sur sept en état de déshydratation dans le groupe témoin. Parmi les six veaux recevant le colostrum immun, trois n'ont pas été malades, trois ont eu de la diarrhée, se sont déshydratés et deux sont morts. Les diarrhées observées ont été caractérisées par une émission aqueuse abondante. Les animaux infectés étaient généralement anoréxiques et consommaient peu de lait. Cependant ils en ont toujours consommé un peu (parfois 0,5 l par repas, voire plus, dans quelques cas). L'ingestion de lait a semblé constituer une cause aggravante de la maladie. Ainsi le veau témoin n° 8 a survécu, mais nous avons remplacé le lait par de l'eau pendant deux jours. Par contre, le veau n° 7 avait surmonté un premier épisode diarrhéique et il est mort après avoir absorbé rapidement 3 l de lait, ce qui avait entraîné une nouvelle diarrhée.

Chez trois veaux morts qui ont fait l'objet d'analyses microbiologiques, *E. coli* B44 a été retrouvé en quantité importante associé à la pari de l'intestin grêle et dans plusieurs organes (tabl. 3). Cette colibacillose à localisation spécifiquement intestinale peut donc donner lieu à une bactériémie.

Discussion

Nous avons mis en évidence une protection vaccinale en relation avec les anticorps anti-K99

du colostrum. Cependant cette protection n'est pas totale, ce qui indique une insuffisance quantitative ou qualitative en anticorps colostraux. Dans des conditions voisines, d'autres auteurs obtiennent soit, comme nous, une protection partielle (Myers, 1980; Nagy, 1980), ou totale (Acres *et al.*, 1978; Snodgrass *et al.*, 1982; Altman et Mukkur, 1983).

Dans une expérimentation rigoureusement identique, mais où la souche infectante était *E. coli* B41 nous avons obtenu une protection totale (Contrepois *et al.*, 1978). Cette différence peut s'expliquer soit par une plus grande virulence de la souche *E. coli* B44 comparativement à *E. coli* B41, soit en raison d'une contribution des anticorps anti-O101 présents en quantités importantes dans le colostrum des vaches vaccinées. A l'appui de la première hypothèse, on notera que six veaux témoins sur sept infectés sont morts, alors qu'avec la souche *E. coli* B41 deux sur quatre seulement n'avaient pas survécu (Contrepois *et al.*, 1978). La présence de l'antigène K30 de type A chez *E. coli* B44 pourrait expliquer sa virulence plus grande comparativement à *E. coli* B41 qui ne possède pas d'antigène capsulaire vrai. L'importance des antigènes K de type A dans la virulence, a été soulignée par Sojka *et al.* (1978), Renault *et al.*, (1980) et plus récemment Hadad et Gyles (1982). Dans la seconde hypothèse les anticorps dirigés contre les antigènes somatiques O101 de *E. coli* B41 seraient associés à la protection et s'ajouteraient à celle conférée par les anticorps anti-K99 lors des infections par *E. coli* B41. Cependant Briggs *et al.* (1951) et Gay *et al.* (1964) s'accordent à attribuer un rôle négligeable aux anticorps anti-O et aucune preuve démontrant leur intérêt n'a été apportée depuis (Moon, 1982). C'est pourquoi nous préférons l'hypothèse d'une virulence plus grande de *E. coli* B44 en relation avec son antigène capsulaire K30. Le titre en anticorps anti-O101 nettement plus élevé chez les vaches vaccinées, reflète la contamination du vaccin par le LPS de *E. coli* B41. Il paraît très difficile d'obtenir des pili K99 totalement exempts de LPS. Ce critère de pureté concerne également une contamination possible par le pilus F41 (Morris *et al.*, 1980a). *E. coli* B41, de même que la souche infectante B44, portent des pili K99 et F41. En toute rigueur, la protection vaccinale peut donc être due aux anticorps dirigés contre K99 et F41.

Le titrage des anticorps par séro-agglutination de *E. coli* B44 mesure les agglutinines anti-K99 et anti-F41 et éventuellement des anticorps naturels anti-K30. La méthode ELISA est plus spécifique. Les anticorps anti-K99 ayant servi à sensibiliser les microplaques sont obtenus par immunisation de lapins par *E. coli* K12 ayant reçu le plasmide K99 de *E. coli* B41. Ce transconjugant ne produit pas F41. Par ailleurs, la

méthode ELISA titre les agglutines anti-K99 mais également des anticorps non agglutinants. Ces derniers sont présents en quantités importantes quand on les détecte par la méthode indirecte de Coombs (Contrefois *et al.*, 1978). En définitive, la vaccination augmente d'environ huit fois le taux moyen des agglutinines anti-O101 et d'environ sept fois celui des anticorps anti-K99 (ELISA). Les réponses anticorps ne sont pas significativement différentes avec les deux doses vaccinales. L'effet de la vaccination persiste jusqu'au vêlage suivant puisqu'un taux élevé d'anticorps se maintient dans le colostrum.

Au plan clinique, l'aggravation observée lors de l'ingestion d'une quantité importante de lait par un veau atteint de colibacillose entérotoxique, souligne l'intérêt de son remplacement par une formule hydratante orale.

Enfin si on distingue classiquement chez le veau une pathologie colibacillaire de type septicémique et une forme strictement intestinale (Contrefois *et al.*, 1983), la bactériémie observée chez nos animaux montre qu'une colibacillose entérotoxique peut être interprétée abusivement comme étant une septicémie.

En conclusion, les anticorps spécifiques anti-K99 sont capables de protéger des veaux infectés

par *E. coli* K99⁺, TSa⁺. Compte tenu de l'inhibition de l'adhérence des ECET K99 aux entérocytes *in vitro*, par des anticorps anti-K99 (Girardeau *et al.*, 1980; Morris *et al.*, 1980b) on peut penser que la protection est due à une inhibition partielle ou totale de l'adhérence. Cependant l'adhérence bactérienne aux entérocytes est un phénomène complexe qu'il serait sans doute abusif d'expliquer uniquement par une interaction entre les pili K99 et la bordure en brosse. Les travaux récents de Morris *et al.* (1982) et de Contrefois *et al.* (1982) ont conduit à identifier d'autres pili intervenant dans l'adhérence des colibacilles. Le rôle d'autres structures des enveloppes bactériennes, et en particulier les antigènes capsulaires de type A, ne doit pas être négligé. Pour Hadad et Gyles (1982) l'antigène capsulaire K28 d'une souche K99⁺ est un facteur de colonisation plus important que le pilus K99. Myers (1982) attribue également un rôle majeur aux antigènes capsulaires de type A. Une formule vaccinale doit donc viser à assurer une protection contre toutes les structures bactériennes susceptibles de favoriser la colonisation de l'intestin grêle par les ECET.

Reçu, le 3 janvier 1984.

Accepté, le 18 mai 1984.

Résumé

Les anticorps colostraux de vaches vaccinées avec *E. coli* B41 (O101 : K99, F41) protègent complètement les veaux infectés expérimentalement avec *E. coli* B41. Afin de préciser le rôle protecteur des anticorps dirigés contre K99 et F41, les veaux recevant le colostrum de vaches vaccinées avec *E. coli* B41 sont infectés avec *E. coli* B44 (O9 : K30 : H⁻, K99, F41). La vaccination multiplie par sept le titre des anticorps anti-K99 dans le colostrum. Chez les veaux infectés par *E. coli* B44, les anticorps anti-(K99 + F41) protègent complètement trois veaux sur six seulement. L'effet additif d'anticorps dirigés contre K99 et d'autres antigènes de surface de *E. coli* entérotoxigène semble souhaitable afin d'obtenir une protection plus complète.

Références

- ACRES S.D., SAUNDERS J.R., RADOSTIS O.M., 1977. Acute indifferntiated 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**, 113-121.
- ACRES S.D., ISAACSON R.E., KHACHATOURIANS G., BABIUK L., KAPITANY R.A., 1978. Vaccination of cows with purified K99 antigen, K99⁺ anucleated live *E. coli*, and whole cell bacterins containing enterotoxigenic *E. coli* for prevention of enterotoxigenic colibacillosis in calves. In: S.D. Acres, (Ed) *Proceedings of Second International Symposium on neonatal diarrhea*, 3rd-5th October. University of Saskatchewan, Canada, 443-456.
- ALTMANN K., MUKKUR T.K.S., 1983. Passive immunisation of neonatal lambs against infection with enteropathogenic *Escherichia coli* via colostrum of ewes immunised with crude and purified K99 pili. *Res. Vet. Sci.*, **35**, 234-239.
- BRIGGS C., LOVELL R., ASCHAFFENBURG R., BARTLETT S., KON S.K., ROY J.H.B., THOMPSON S.Y., WALKER D.M., 1951. The nutritive value of colostrum for the calf. 7 - Observations on the nature of the protective properties of colostrum. *Brit. J. Nutr.*, **5**, 356-362.
- CONTREFOIS M., GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., GOUET Ph., LEVIEUX D., 1978. Specific protection by colostrum from cows vaccinated with the K99 antigen in newborn calves experimentally infected with *E. coli* Ent⁺ K99⁺. *Ann. Rech. Vét.*, **9**, 385-388.

- CONTREPOIS M., GIRARDEAU J.P., GOUET Ph., DESMETTRE Ph., 1982. Vaccination contre l'antigène K99 et d'autres « adhésines » des *Escherichia coli* bovins. *XIIIth World Congress on Diseases of Cattle, Amsterdam, The Netherlands* 7th-10th September, 332-338.
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., 1983. Étiologie des colibacilloses chez les bovins. *Recl Méd. Vét.*, **159**, 159-166.
- ELLENS D.J., DE LEEUW P.W., ROZEMOND M., 1979. Detection of the K99 antigen of *Escherichia coli* in calf faeces by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet. Q.*, **1**, 169-175.
- GAY C.C., MC KAY K.A., BARNUM D.A., 1964. Studies on colibacillosis of calves. The antibody acquired by calves as the result of vaccination of the dams. *Can. Vet. J.*, **5**, 248-261.
- 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, 49-60.
- GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., GOUET Ph., 1982. Inhibition of K99 antigen synthesis by L-alanine in enterotoxigenic *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 463-470.
- GUINEE P.A.M., VELDKEP J., JANSSEN W.H., 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **15**, 676-678.
- HADAD J.J., GYLES C.L., 1982. The role of K antigens of enteropathogenic *Escherichia coli* in colonization of the small intestine of calves. *Can. J. Comp. Med.*, **46**, 21-26.
- 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 *E. coli* d'origine bovine en France. *Ann. Rech. Vét.*, **12**, 253-257.
- MOON H.W., 1982. Protective antigens of enterotoxigenic *E. coli*: potential in vaccine development. *XIIIth World Congress on Diseases of Cattle, Amsterdam, The Netherlands*, 7th-10th September, 313-318.
- 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.
- MORRIS J.A., THORNS C.J., SOJKA W.J., 1980a. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 107-113.
- MORRIS J.A., WRAY C., SOJKA W.J., 1980b. Passive protection of lambs against enteropathogenic *Escherichia coli*: role of antibodies in serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen. *J. Med. Microbiol.*, **13**, 265-271.
- MORRIS J.A., THORNS C., SCOTT A.C., SOJKA W.J., WELLS G.A., 1982. Adhesion *in vitro* and *in vivo* associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect. Immun.*, **36**, 1146-1153.
- MYERS L.L., 1980. Passive protection of calves against experimentally induced and naturally occurring enteric colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 1952-1956.
- MYERS L.L., 1982. Vaccination of pregnant cows for the prevention of enteric colibacillosis in their calves. *Proceedings of the XIIIth World Congress on Diseases of Cattle, Amsterdam, The Netherlands*, 7th-10th September, 359-365.
- MYERS L.L., GUINEE P.A.M., 1976. Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Infect. Immun.*, **13**, 1117-1119.
- NAGY B., 1980. Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. *Infect. Immun.*, **27**, 21-24.
- 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.
- SMITH H.W., LINGGOOD M.A., 1972. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains. The transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.*, **5**, 243-249.
- SNODGRASS D.R., NAGY L.K., SHERWOOD D., CAMPBELL I., 1982. Passive immunity in calf diarrhea: Vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. *Infect. Immun.*, **37**, 586-591.
- SOJKA W.J., WRAY C., MORRIS J.A., 1978. Passive protection of lambs against experimental enteric colibacillosis by colostrum transfer of antibodies from K99-vaccinated ewes. *J. Med. Microbiol.*, **11**, 493-499.